



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**OTİZMDE İNSÜLİN DEGRADE EDİCİ ENZİMİN
DEĞERLENDİRİLMESİ, D VİTAMİNİ VE BAZI
BİYOKİMYASAL PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

OTHMAN İBRAHİM ABDULATEEF

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR/2023



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**OTİZMDE İNSÜLİN DEGRADE EDİCİ ENZİMİN
DEĞERLENDİRİLMESİ, D VİTAMİNİ VE BAZI
BİYOKİMYASAL PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

OTHMAN İBRAHİM ABDULATEEF

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Zuhal ALİM

II. DANIŞMAN

Dr. Omar Ali KANOSH

KIRŞEHİR / 2023

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirim.

OTHMAN İBRAHİM ABDULATEEF



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliđi'nin 9/2 ve 22/2 maddeleri uyarınca; Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi'nin bu yüksek lisans tezine abone olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenen kriterlere uygun bir rapor elde edilmiştir.



ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans ders ve tez sürecimde sürekli desteği, sabrı, motivasyonu için Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zuhâl ALİM'a büyük bir içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca bu tez çalışmasında eş danışmanım olan Tikrit Üniversitesi, Temel Bilimler Eğitim Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Dr. Omar Ali KANOSH'a araştırmam boyunca değerli yorumları ve desteği için teşekkür ederim. Son olarak bu tezi araştırma ve yazma sürecim boyunca bana sürekli destek ve teşvik sağlayan aileme çok derin şükranlarımı sunarım.

Ocak, 2023

OTHMAN İBRAHİM ABDULATEEF

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|---|----------|
| ÖNSÖZ | iv |
| İÇİNDEKİLER | v |
| ŞEKİL LİSTESİ | vii |
| TABLO LİSTESİ | viii |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ | ix |
| ÖZET | x |
| ABSTRACT | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL KISIMLAR | 3 |
| 2.1. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB)..... | 3 |
| 2.1.1. OSB'nin Tanımı | 3 |
| 2.1.2. OSB Epidemiyolojisi | 3 |
| 2.1.3. OSB'nin İşaret ve Semptomları | 4 |
| 2.1.4. OSB'nin Taranması ve Tanısı..... | 5 |
| 2.2. İnsülin Degrade Edici Enzim (IDE)..... | 6 |
| 2.2.1. Otizmde IDE'nin Rolü | 7 |
| 2.3. D Vitamini | 8 |
| 2.3.1. Otizmde D Vitamininin Rolü | 9 |
| 2.4. Antioksidanlar | 11 |
| 2.4.1. Otizmde Antioksidanların Rolü | 12 |
| 2.5. Lipit profili | 13 |
| 2.5.1. Otizmde Lipid Profilinin Rolü | 14 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 16 |
| 3.1. Materyal | 16 |
| 3.1.1. Ekipman | 16 |
| 3.1.2. Çalışma Tasarımı | 16 |
| 3.2. Yöntem | 16 |
| 3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması | 16 |
| 3.2.2. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü | 17 |
| 3.2.2.1. <i>İnsülin Degrade Edici Enzim (IDE)Miktarının Ölçülmesi..</i> | 17 |
| 3.2.2.2. <i>Serum Glukoz Konsantrasyonunun Ölçülmesi</i> | 17 |
| 3.2.2.3. <i>D Vitamini Miktarının Ölçülmesi</i> | 18 |
| 3.2.2.4. <i>Kolesterol Miktarının Ölçülmesi</i> | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.2.5. <i>Trigliserit Miktarının Ölçülmesi</i> | 20 |
| 3.2.2.6. <i>HDL Miktarının Ölçülmesi</i> | 20 |
| 3.2.2.7. <i>VLDL ve LDL Değerlerinin Ölçülmesi</i> | 21 |
| 3.2.2.8. <i>Malondialdehit (MDA) Miktarının Ölçülmesi</i> | 21 |
| 3.2.2.9. <i>Glutasyon (GSH) Miktarının Ölçülmesi</i> | 22 |
| 3.2.2.10. <i>Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi</i> | 22 |
| 3.2.2.11. <i>Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçülmesi</i> | 23 |
| 3.2.2.12. <i>İstatistiksel Analiz</i> | 23 |
| 4. BULGULAR | 25 |
| 4.1. <i>Biyokimyasal Parametre Testleri</i> | 25 |
| 4.1.1. <i>İnsülin Degrade Edici Enzim (IDE) Miktarı</i> | 25 |
| 4.1.2. <i>D Vitamini Miktarı</i> | 26 |
| 4.1.3. <i>Glukoz Miktarı</i> | 26 |
| 4.1.4. <i>Kolesterol Miktarı</i> | 27 |
| 4.1.5. <i>Trigliserit Miktarı</i> | 27 |
| 4.1.6. <i>HDL Miktarı</i> | 28 |
| 4.1.7. <i>LDL Miktarı</i> | 28 |
| 4.1.8. <i>VLDL Miktarı</i> | 28 |
| 4.1.9. <i>Malondialdehit (MDA) Miktarı</i> | 29 |
| 4.1.10. <i>Glutasyon (GSH) Miktarı</i> | 30 |
| 4.1.11. <i>Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Miktarı</i> | 30 |
| 4.1.12. <i>Katalaz (CAT) Enzim Miktarı</i> | 30 |
| 4.2. <i>Hasta Grubunda ve Kontrol Grubunda IDE Enzimi'nin Biyokimyasal Parametrelerle İlişkisi</i> | 31 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 32 |
| KAYNAKLAR | 35 |
| EKLER | 40 |
| ÖZGEÇMİŞ | 43 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. IDE şematik yapısı. | 7 |
| Şekil 2.2. Otizm spektrum bozukluğu ile bağlantılı olabilecek D vitamini ve steroid hormon aktivite yolları: OSB, otistik spektrum bozukluğu;SLOS, Smith-Lemli Otizm sendromu; +/- anormal seviyeleri gösterir. | 11 |
| Şekil 4.1. Otizm hasta grubu ve kontrol grubundaki IDE düzeyi | 26 |
| Şekil 4.2. Araştırma gruplarının kolesterol (mg/dL) ve trigliserit (mg/dL) diyagramı. | 28 |
| Şekil 4.3. Araştırma gruplarının HDL, LDL ve VLDL (mg/dL) diyagramı. | 29 |



TABLO LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 3.1. Bu çalışmada kullanılan araç ve gereçler | 16 |
| Tablo 3.2. Glukoz ölçümünde kullanılan çözeltiler..... | 18 |
| Tablo 4.1. Hem Otizm hastaları hem de kontrol grupları için insülin degrade edici enzimin ortalama \pm SD'si | 25 |
| Tablo 4.2. Otizm hastaları ve kontrol grubunda D vitamini ve glukoz miktarlarının ortalama \pm SD'si. | 26 |
| Tablo 4.3. Otizm hastaları ve kontrol gruplarında kolesterol ve trigliserit miktarlarının ortalama \pm SD'si. | 27 |
| Tablo 4.4. Otizm hastalarında ve kontrol gruplarında HDL, LDL ve VLDL'nin ortalama \pm SD'si. | 29 |
| Tablo 4.5. Otizm hasta grubunda ve kontrol grubunda MDA, GSH, SOD ve CAT'nin ortalama \pm SD'si | 30 |
| Tablo 4.6. Hastalarda ve sağlıklı bireylerde IDE enzimi ile diğer biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon | 31 |

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

SİMGELER

| | |
|--------|---------------------------------------|
| % | : Yüzde |
| µL | : Mikrolitre |
| mg/dL | : Miligram/desilitre |
| mg/L | : Litre başına miligram |
| mL | : Mililitre |
| mmol/L | : Litre başına milimol |
| ng | : Nano gram |
| nm | : Nanometre |
| U/mL | : Mililitre Başına Uluslararası Birim |

KISALTMALAR

| | |
|-------|---|
| Aβ | : Amiloid-β |
| OSB | : Otizm spektrum bozukluğu |
| CARS | : Çocukluk Otizm Derecelendirme Ölçekleri |
| CAT | : Katalaz |
| CE | : Kolesterol esteraz |
| CO | : Kolesterol oksidaz |
| DSM-5 | : Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı |
| GSH | : Glutasyon |
| GR | : Glutasyon redüktaz |
| GPx | : Glutasyon peroksidaz |
| HDL | : Yüksek yoğunluklu lipoprotein |
| IDE | : İnsülin degrade edici enzim |
| LDL | : Düşük yoğunluklu lipoprotein |
| LPL | : Lipoprotein lipaz |
| MDA | : Malondialdehit |
| OD | : Optik yoğunluk |
| ROS | : Reaktif oksijen sistemi |
| SOD | : Süperoksit Dismutaz |
| SLOS | : Smith-Lemli Otizm Sendromu |
| TH | : T yardımcı hücreler |
| UVB | : Ultraviyole B |
| VDR | : D vitamini reseptörü |
| VLDL | : Çok düşük yoğunluklu lipoprotein |

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OTİZMDE İNSÜLİN DEGRADE EDİCİ ENZİMİN DEĞERLENDİRİLMESİ, D VİTAMİNİ VE BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

Othman Ibrahim ABDULATEEF

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zuhal ALIM

II. Danışman: Dr. Omar Ali KANOSH

Bu çalışmanın temel amacı, Iraklı otizm hastalarında, insülin degrade edici enzim (IDE) ile D vitamini konsantrasyonu, glukoz konsantrasyonu, lipid konsantrasyonu (Kolesterol, Trigliserit, HDL, LDL ve VLDL), bazı antioksidan parametlerin konsantrasyonları (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA)) arasındaki ilişkiyi belirlemektir. Tikrit Eğitim Hastanesi/Otizm Merkezi'nde tanısı konulan 1-20 yaş arası 60 otistik hasta ve 30 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Otizmin erken tespiti ve tedavisi için kullanılabilir biyokimyasal göstergeleri bulmak için bu çalışmada otizm hastalarında ve kontrol grubunda IDE aktivitesi ve kan biyobelirteçleri ölçülmüştür. Otizimli hasta grubunda kontrol grubuna göre IDE aktivitesinde anlamlı düşüşler gözlenmiştir ($p<0,001$). Otizimli hasta grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, D vitamini, glukoz, HDL, GSH konsantrasyonları ve CAT, SOD aktiviteleri anlamlı olarak azalırken ($p<0,001$) MDA, kolesterol, trigliserit, LDL ve VLDL konsantrasyonları anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). IDE ile D vitamini ($r=0.984$), glukoz ($r=0.970$), CAT ($r=0.927$), SOD ($r=0.927$), GSH ($r=0.927$), MDA ($r=-0.841$), kolesterol ($r=-0.842$), trigliserit ($r=-0.842$), HDL ($r=0.915$), LDL ($r=-0.940$) ve VLDL ($r=-0.842$) arasında anlamlı düzeylerde güçlü korelasyon görülmüştür. Sonuç olarak, bu çalışmada otizimli hasta grubunda IDE ve

diğer biyokimyasal parametrelerin istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona sahip olduğu belirlenmiş olup, otizmin önlenmesi ve tedavisinde, hekimlerin otizmlı hastalarda D vitamini, lipid ve antioksidan düzeylerini daha sık tarama ve tedavi etmelerinin büyük fayda sağlayacağı tavsiye edilmektedir.

Ocak 2023, 43 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, glukoz, insülin degrade edici enzim, lipid profili, otizm.



ABSTRACT

M.Sc. THESIS

EVALUATION of INSULIN DEGRADING ENZYME in AUTISM, ITS RELATIONSHIP with VITAMIN D and SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS

Othman Ibrahim ABDULATEEF

Kırşehir Ahi Evran University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zuhail ALIM

Co-Supervisor: Dr. Omar Ali KANOSH

The main purpose of this study was to determine the relationship between insulin degrading enzyme (IDE) and vitamin D concentration, glucose concentration, lipid concentration (Cholesterol, Triglyceride, HDL, LDL and VLDL), some antioxidants parameters's concentration (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA)) in Iraqi autism patients. 60 autistic patients aged 1-20 years diagnosed in Tikrit Training Hospital/Autism Center and 30 healthy individuals were included in the study. In order to find biochemical markers that can be used for early detection and treatment of autism, IDE activity and blood biomarkers were measured in autism patients and control group in this study. Significant decreases in IDE activity were observed in the autistic patient group compared to the control group ($p < 0.001$). Vitamin D, glucose, HDL, GSH concentrations and CAT, SOD activities decreased significantly in the autistic patient group compared to the control group ($p < 0.001$), while MDA, cholesterol, triglyceride, LDL and VLDL concentrations increased significantly ($p < 0.001$). Strong correlation showed between IDE and Vitamin D ($r = 0.984$), glucose ($r = 0.970$), CAT ($r = 0.927$), SOD ($r = 0.927$), GSH ($r = 0.927$), MDA ($r = -0.841$), cholesterol ($r = -0.842$), triglyceride ($r = -0.842$), HDL ($r = 0.915$), LDL ($r = -0.940$), and VLDL ($r = -0.842$). As a

result, in this study IDE and other biochemical parameters were found to have a statistically significant correlation in the autistic patient group, and it is recommended that physicians screen and treat vitamin D, lipid and antioxidant levels more frequently in autism patients in the prevention and treatment of autism.

January 2023, 43 pages

Keywords: Antioxidants, glucose, insulin degrading enzyme, lipid profile, autism.



1. GİRİŞ

3-8 yaş arası çocuklarda sık görülen otizm, çocuğun yaşamının tüm evrelerini etkileyebilir. Otizm veya otizm spektrum bozukluğu (OSB), etiyojisi bilinmeyen bir grup nörogelişimsel bozukluğu ifade eden bir terim olup öncelikle davranışsal gözlemler temelinde teşhis edilir. Otizm, genlerden, diyetten ve çevreden etkilenenler de dahil olmak üzere çok çeşitli risk faktörleriyle ilişkilendirilmiştir. OSB'nin gelişiminde hem genetik hem de çevresel faktörlerin rol oynadığı bilindiğinden, araştırmacıların odak noktası son yıllarda ikisi arasındaki etkileşimleri incelemektir. Sosyal etkileşim ve iletişim zorluklarının yanı sıra tekrarlayan ve basmakalıp davranışlar, OSB'nin ayırt edici özellikleridir. Dört hastadan üçü zihinsel gerilikten muzdarip olmakla beraber, erkeklerin bu durumdan muzdarip olma olasılığı kızlardan dört kat daha fazladır. (Adams, J.B. ve diğ., 2018; Landa, R.J., 2018; Li, J. ve diğ., 2020).

Otizm prevalansı giderek artmaktadır. Hastalık Kontrol Merkezleri, yakın zamanda, 2016'da ABD'de 8 yaşındakiler arasında otizm insidansının 54'te 1 olduğunu ve 2016'da erkek-kadın oranının 4/1 olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kendi kendini yaralama ve otoriteyi reddetme gibi sorunlu davranışların yanı sıra sosyal kaygı, dikkat eksikliği, hiperaktivite bozukluğu, uyku-uyanıklık anormallikleri ve obsesif-kompulsif bozukluklar genellikle otizm ile ilişkilidir. Uygun ve erken bakım alan otizimli kişiler, hem belirtilerinde hem de yaşam kalitelerinde önemli gelişmeler görebilirler (Mazahery, H. ve diğ., 2016; Saraff, V., ve Shaw, N., 2016; Bivona, G. ve diğ., 2019).

IDE, insülin degradasyonundan sorumlu bir metaloproteaz enzimidir. Bakteri, mantar, bitki ve hayvanlarda bulunan yüksek oranda korunmuş bir Zn^{2+} metalloproteazdır (Sen Y. ve diğ., 2006). IDE sitozol ve hücre yüzeyinde bulunur. IDE substratlarında bulunan ikincil ve üçüncül yapıları tanır ve biyolojik olarak aktif hormonlar ve çözünür amiloidojenik peptitler, kalsitonin, amilin ve glukagon gibi hastalıkla ilişkili peptitler dahil olmak üzere çok sayıda küçük molekül üretme yeteneğine sahiptir. Peptidleri, insülini, IGF-1'i ve atriyal natriüretik peptidi tanıma ve parçalama potansiyeline sahiptir. Değişmiş IDE düzeyleri hücreler için oldukça toksiktir (Pivovarova, O. ve diğ., 2016).

D vitamininin iki formu olan ergokalsiferol (D2) ve kolekalsiferol (D3), esas olarak UVB radyasyonuna dermal maruziyetten elde edilen, diyetle yalnızca eser miktarlarda bulunan yağda çözünen vitaminlerdir. 20 ng/mL veya daha düşük bir kan konsantrasyonu yetersiz olarak kabul edilir ve sağlık için 30 ng/mL veya daha fazlası gereklidir (Fahmy, S.F. ve diğ., 2016; Holick, M.F., 2017). Bununla birlikte, D vitamini eksikliği ile otizm spektrum bozukluğu (OSB) arasındaki bağlantı iyi anlaşılmamıştır. OSB tanısı konan çocuklarda nörodejeneratif hastalığı olmayanlarla karşılaştırıldığında D vitamin eksiklik düzeyleri üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır (Eyles, D.W. ve diğ., 2013; Fahmy, S.F. ve diğ., 2016; Arastoo, A.A. ve diğ., 2018; Şengenç, E. ve diğ., 2020).

D vitamini eksikliği, daha yüksek OSB insidansı ile ilişkilendirilmiştir. D vitamini, beyin homeostazı, embriyogenez ve nörogelişim, bağışıklık modülasyonu, anti-oksidasyon, anti-apoptoz, sinirsel farklılaşma, gen kontrolü ve gen ekspresyonu için önemlidir. OSB'si olanların, OSB'si olmayan çocuklara göre serum D vitamini düzeyleri önemli ölçüde daha düşüktür. Bu nedenle hamilelik ve erken çocukluk döneminde D vitamini eksikliği OSB'nin bir nedeni olarak görülmektedir (Lord, C. ve diğ., 2018; Lai, M.C. ve diğ., 2019; Maenner, M.J. ve diğ., 2021).

Oksidatif stres genellikle OSB'nin gelişiminde rol oynar. OSB hastaları, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi nedeniyle aşırı ROS üretimi, azalmış antioksidan kapasite ve mitokondriyal disfonksiyon yaşarlar (Manivasagam, T. ve diğ., 2020). Oksidatif stres düzeyi yüksek olan otistik hastalarda antioksidan GSH plazma seviyeleri çok daha düşüktür ve bu durum, beyin gelişimi üzerinde uzun vadeli etkileri olabilecek gen ekspresyonunun metilasyona bağlı epigenetik kontrolünü etkileyebilir. Otistik çocuklar ise, özellikle 6 yaşın altındaki küçük çocuklarda, artan lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunma mekanizmalarındaki eksiklikler onları oksidatif strese karşı daha savunmasız yapmaktadır. Yapılacak bir değerlendirme, daha onarılamaz beyin hasarına neden olmadan önce oksidatif stresi azaltabileceğinden prognozu iyileştirebilir (Meguid, N.A. ve diğ., 2011).

Bu tez çalışmasında, otizm hastalarında, insülin degrade edici enzim (IDE) ile D vitamini konsantrasyonu, glukoz konsantrasyonu, lipid konsantrasyonu ve antioksidan parametleri arasındaki ilişkiyi belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB)

2.1.1. OSB'nin Tanımı

Otizm spektrum bozuklukları (OSB), genetik olarak çeşitli olan bir dizi nöro-davranışsal hastalık olup, iletişim, sosyal etkileşim problemleri ve basmakalıp tekrarlayan davranışlar olmak üzere üç davranış alanındaki eksikliklerle tanımlanır (Genovese, A., ve Butler, M.G., 2020). Davranış bozukluklarına ek olarak, gastrointestinal bozukluklar ve bağırsak mikrobiyotası, otoimmün bozukluklar ve zeka geriliği otizmlili kişilerde yaygındır (Al-Gadani, Y. ve diğ., 2009). Son yıllarda, otizm prevalansında artış olmuştur. Bunun nedeni genişletilmiş tanı kriterleri ve tıp uzmanları arasında artan farkındalık olabilir. Ancak, bu gelişmelerin artışı ne ölçüde açıkladığı belirsizdir (Al-Gadani, Y. ve diğ., 2009). Bilim insanları, OSB'nin yaygınlığını azaltmaya çalışırken en rahatsız edici semptomlarından bazılarını hafifletebilecek tedaviler bulmaya yönelmektedirler (Landrigan, P.J. ve diğ., 2012).

2.1.2. OSB Epidemiyolojisi

OSB insidansı son yıllarda artmış, bu da otizm pandemisi iddialarını ve olası mekansal çeşitlilik kaynaklarını belirleme yöntemlerini güçlendirmiştir. OSB'nin yaygınlığına ilişkin tahminlere, ya mevcut sağlık ve eğitim kayıtlarını kullanan izleme sistemleri ya da özel nüfus anketleri aracılığıyla artık küresel olarak erişilebilir. Sonuçlar, muhtemelen vaka tespitindeki metodolojik farklılıkların ve her alandaki yaygınlık tahminlerindeki istikrarlı artışların bir sonucu olarak, dünya genelinde yaygınlık açısından geniş bir aralık göstermektedir (Chiarotti, F. ve Venerosi, A. 2020). ABD, İngiltere, Avrupa ve Asya'da yürütülen yaygınlık araştırmaları, 3 ila 10 yaş arasındaki 10.000 çocuktan 3.4'ünün otizm geliştireceğini tahmin etmektedir (Al-Gadani, Y. ve diğ., 2009).

OSB'de kalıtımın etkisinin yüksek olduğunu gösteren çok sayıda çalışma olmasına rağmen, belirli bir risk faktörünün üzerinde hiçbir gen bulunamamıştır. Otizm ayrıca intrauterin enfeksiyonlar, alkole maruz kalma ve yetersiz obstetrik bakım gibi doğum öncesi çevresel değişkenlerle de ilişkilidir (Al-Gadani, Y. ve diğ., 2009).

Otizm nedenleri üzerine yaptıkları çalışmada Deth ve diğ. (2008), kırsal alanların, bulutlu ve yağmurlu yerlerin, güneşten UVB'ye en az maruz kalan alanların ve yüksek düzeyde hava kirliliği olan alanların aksine kentsel konumların daha yüksek otizm oranlarına sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Otizm, hava kirliliği ve bulutlu havanın yanı sıra mevsimsel faktörler, koyu tenli göçmenlerin kutup bölgelerine göçü, gestasyonel diyabet, preeklampsi, sezaryen ve ailesel otoimmün hastalıklar ile ilişkilidir. Doğumlar arasında 18 ay ve daha küçük yaştakilerde %14,4 iken, 4 yaş ve üzerinde ailesel OSB tekrarlama olasılığı %6,8 olup, gebelik sırasında gestasyonel diyabete maruz kalan çocuklarda OSB riski 4,4 kat daha fazladır. Gebe kadınlarda D vitamini eksikliği sezaryen şansını dört kata kadar artırabilir. D vitamini, nöbetler ve gastrointestinal problemler dahil olmak üzere çeşitli OSB komplikasyonlarını azaltır (Grant, W.B., ve Cannell, J.J., 2013; Bener, A., ve Kamal, M., 2014).

OSB insidansının doğru bir şekilde ölçülmesi, çevresel ve coğrafi değişkenler nedeniyle hangi grupların hastalığa daha duyarlı olduğunu ve ayrıca gelişimsel bir değerlendirme için hangi grupların sağlık hizmetlerine eşit olmayan erişime eğilimli olduğunu belirlemeye de yardımcı olacaktır. Prevelans tahminlerindeki önemli aralık, çalışmalar arasındaki metodolojik farklılıklarla tam olarak açıklanamaz. Bu, prevalanstaki farklılıkları anlamak için, OSB'nin genetik ve çevresel risk faktörlerine maruz kalmayla ilgili diğer yönlerin yanı sıra, OSB'yi saptama ve teşhis etme kapasitesinin araştırılması gereklidir (Chiarotti, F., ve Venerosi, A., 2020).

2.1.3. OSB'nin İşaret ve Semptomları

Araştırmacılar, 1960'larda ve 1970'lerde temel OSB semptomlarının nesnel değerlendirmelerini oluşturmak için çalışmış olup, bu durum, şimdi OSB tanısında yardımcı olmak için kullanılan derecelendirme ölçeklerinin oluşturulmasına yol açmıştır. Çocukluk otizmi ortaya çıkan en önemli ölçümlerden birisi olmuştur. Çocukluk Çağı Otizm Derecelendirme Ölçekleri (CARS), bakıcı raporlarına ve gözlemlerine dayalı olarak otizmle ilgili 15 semptomu değerlendirmek için kullanmıştır. CARS ayrıca, bir kişinin otizmi olup olmadığını değerlendirmek için bir eşik puanının yanı sıra genel bir OSB şiddet puanı da oluşturmuştur (Chlebowski, C. ve diğ., 2010). Ebeveynler ve öğretmenler tarafından verilen semptomları ve klinik bulguları analiz etme tekniklerini standart hale getirmek ve ayrıca OSB semptomlarının varlığını ve yoğunluğunu belirlemek için ek testler tasarlanmıştır. En eski araçlar çocukları test etmek için tasarlanmış olsa da, OSB değerlendirmeleri bebeklikten

olgunluğa kadar olan semptomları içerecek şekilde gelişmiştir (Kim, S.H. ve diğ., 2013). Araştırmacılar ayrıca genel popülasyonda OSB ile ilgili özelliklerin yaygınlığına bakmakta olup, daha geniş otizm fenotipini araştırmak için OSB ölçümlerinden yararlanmaktadırlar (Loucas, T. ve diğ., 2008).

OSB'nin erken belirtileri arasında olağandışı sosyal yönelim, olağandışı sosyal katılım, sınırlı bir dizi jest ve diğer iletişim araçları ve tekrarlayan motor aktiviteler bulunur. OSB, 14 aylıkken tespit edilebilir. Bununla birlikte, 30 aylıktan önce teşhis edilen çocukların üçte birine kadarı, kararsız bir tanıya sahip olabilir (Landa, R.J., 2018). Otoimmünite, nöroinflamasyon, oksidatif stres ve immünolojik düzensizliklerin tümü OSB'li kişilerde görülür. Bağışıklık düzensizliği, kronik sistemik inflamasyon, sitokin ekspresyonunun düzensizliği ve gastrointestinal sorunlar OSB hastalarında yaygındır (Szachta, P. ve diğ., 2016).

2.1.4. OSB'nin Taranması ve Tanısı

OSB, sosyal etkileşim ve iletişimde niteliksel eksikliklerle karakterize, sıklıkla basmakalıp ve tekrarlayan davranış kalıpları içeren bir grup nörogelişimsel bozukluktur. Etyolojileri heterojen olduğundan OSB için yerleşik bir tıbbi teşhis veya tedavi yoktur (Landa, R.J., 2018). OSB, iki yaşın altındaki çocuklarda nadiren tanımlanır, çünkü teşhis sadece davranışsal testlere dayanır (Frustaci, A. ve diğ., 2012). Otizm, toksik metallere aşırı maruz kalma ve zayıflamış antioksidan savunma sistemi gibi çeşitli nedenlerle ilişkilidir (Vergani, L. ve diğ., 2011).

OSB'li çocukların çoğuna 3 ila 6 yaşları arasında tanı konmasına rağmen, bazı çocukların hayatlarının ikinci yılında teşhis edilebileceğine dair artan kanıtlar vardır. Erken teşhis, sosyal etkileşim ve iletişim gibi temel yetenekleri geliştirmeyi amaçlayan erken davranış temelli terapilerle sağlanır. OSB'nin daha iyi sonuçlar vermesi muhtemeldir, bu nedenle erken teşhis ve tedavi müdahalesi çok önemlidir (Landa, R.J., 2018).

Deneysel olarak tanımlanmış alt grupları keşfetmeye çalışan çalışmalar, alt gruplar hakkında daha fazla bilgi sağlamaktadır. Temel OSB semptomlarının temel bileşen analizini yaparken, sosyal bozulmaları, iletişim sorunlarını ve/veya tekrarlayan faaliyetlerin baskınlığını öne süren bir, iki veya üç değişken bulmak mümkündür (Frazier, T.W. ve diğ., 2014). Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı 5 "DSM-5", biri karşılıklı sosyal iletişim ve etkileşimde bozulma ve diğeri sınırlı, tekrarlayan davranış kalıpları, hobiler veya etkinlikler

olmak üzere iki alt grup belirtmektedir (Vahia, V.N., 2013). Temel bileşen analizi ve küme analizi metodolojilerine göre OSB'nin heterojenliğini karakterize etmede duygusal ve davranışsal kontrolün yanı sıra diğer düzenleyici süreçler (uyku ve yemek gibi) önemlidir (Wiggins, L.D. ve diğ., 2012).

Veriler, çocukların küçük bir bölümünün başlangıçta belirsiz teşhis semptomları göstermesine rağmen, otizm teşhisi gözlem programı-bebek modülünün erken teşhis ve takip teşhisini öngörmedeki değerini göstermektedir. OSB'li çocuklar, bozukluğun belirtileri olabilecek daha gelişmiş sosyal iletişim becerilerine ve tekrarlayan aktivitelere sahiptir (Guthrie, W. ve diğ., 2013). OSB tanısının ve genetik ve çevresel risk faktörlerine maruz kalma ile ilgili diğer yönlerinin araştırılması gereklidir.

2.2. İnsülin Degrade Edici Enzim (IDE)

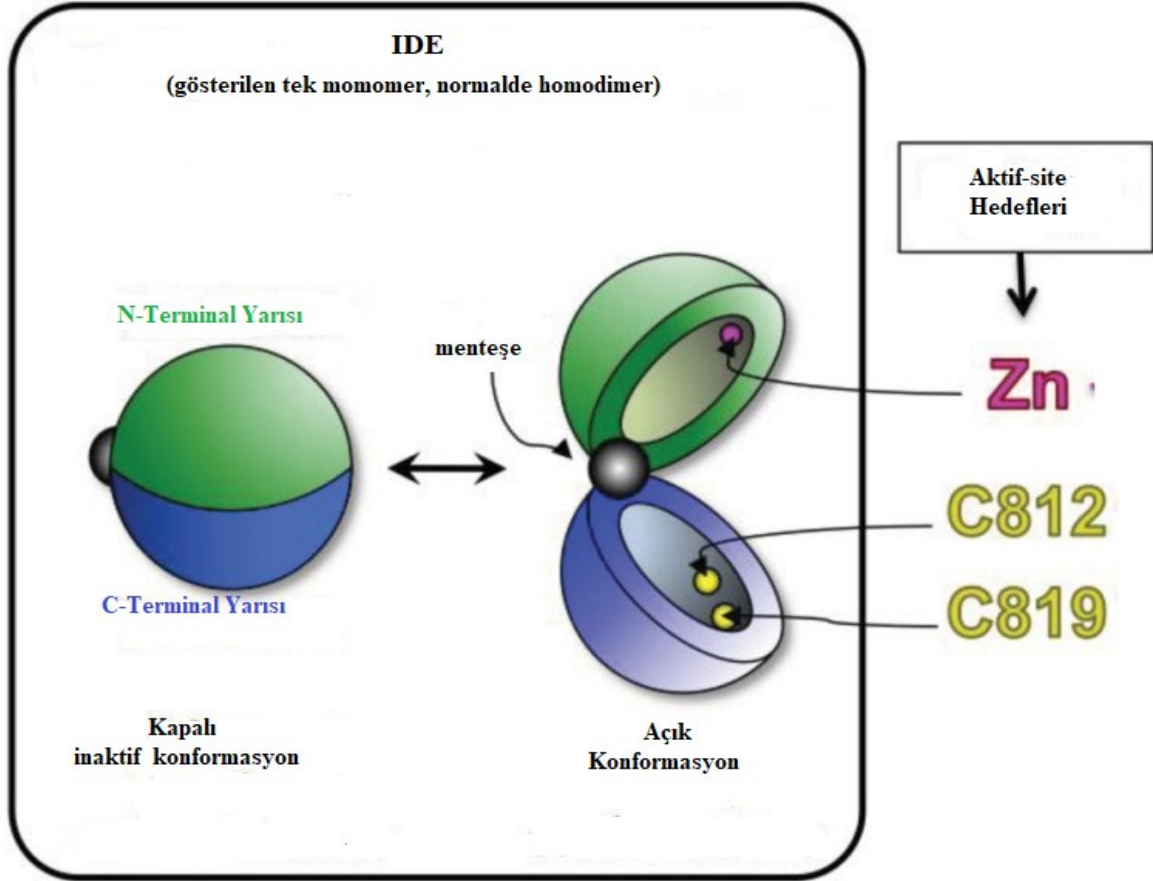
İnsülin degrade edici enzim (IDE), inverzincin ailesine ait bir çinko metallopeptidazdır. Tüm insan dokularında bulunur, ancak özellikle beyin, kas ve karaciğerde bol miktarda bulunur. IDE, plazma membranında, endozomlarda, peroksizomlarda ve mitokondride az miktarda sitozolik lokalizasyon baskınlığı sergiler. İlk olarak insülin katabolizmasından sorumlu enzim olarak bulunduğu için diyabet gelişimindeki rolü kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Ayrıca IDE'nin amiloid- β ($A\beta$), amilin ve glukagon dahil olmak üzere çeşitli farklı polipeptitleri bozabilir olması, IDE düzensizliğinin nörodejeneratif ve nörogelişimsel hastalıklar gibi agregopatilerde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Son on yılda, bu enzimin çeşitli temel hücresel süreçlerdeki çok işlevli önemine işaret ederek, IDE biyolojisi üzerine benzersiz bir senaryo gelişmiştir. IDE, protein döngüsü ve hücre homeostazında hayati bir role sahiptir. Ayrıca yeni bulgular, IDE'nin glukoz metabolizmasını *in vivo* insülin parçalanmasında yaygın olarak kabul edilen rolü dışındaki nedenlerle düzenlediğini göstermektedir. Artan deneysel veriler, IDE aktivitesinin bozulmasının çeşitli metabolik bozuklukların oluşumunda rolü olduğunu göstermektedir (Tundo, G.R. ve diğ., 2017).

İnsan IDE'si (hIDE), kromozom 10'da yer alan bir gen tarafından kodlanan 1019 kalıntılı (yaklaşık MW 114.000 Da) tek bir polipeptit olarak sentezlenir (Tundo, G.R. ve diğ., 2017). IDE'nin aktif bölgesi, IDE kristal yapısında görülebilen belirli N ve C terminal birimleri tarafından oluşturulan bir proteolitik odada bulunur. IDE'nin iki farklı konformasyonda var olabileceği görülmektedir: birincisi, substratların aktif bölgeye erişebildiği açık bir

konformasyon ve ikincisi, aktif bölgenin iki içbükey alan tarafından oluşturulan hazne içinde bulunduğu kapalı bir konformasyon (Şekil 2.1).

IDE fonksiyonları iki farklı sistein kalıntısına (C812 ve C819) bağlıdır. (Şekil 2.1). (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK148499/>).



Şekil 2.1. IDE şematik yapısı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK148499/>).

2.2.1. Otizmde IDE'nin Rolü

Pankreas tarafından üretilen insülinin çoğu, reseptör bazlı bir taşıyıcı yoluyla beyin tarafından emilir. Beynin farklı bölümleri, kan-beyin bariyerini geçtiğinde çeşitli oranlarda insülin alır. Bulgular, tip 2 DM'li veya zayıf glukoz toleranslı kişilerde görülen bazı bilişsel anormalliklerin beyin insülini veya beyin insülin duyarlılığındaki azalmadan kaynaklanabileceğine işaret etmektedir. IDE enziminin insülinin parçalanması için çok önemli olduğu gösterilmiş olup, aktivitedeki bir azalma, A β birikmesine neden olur. Bazı durumlarda, yüksek insülin düzeylerinin, insülin ve beta-amiloid mücadelesi nedeniyle

amiloid birikimini artırabileceği öne sürülmüştür. Bununla birlikte, diyabetin veya yüksek insülin düzeylerinin tek başına nörofibriler yumakların amiloid birikimini desteklediğine dair bir kanıt olmaması, diyabetin hastalıkların patogenezinde katkıda bulunan bir faktör olmadığını göstermektedir. Aslında insülin, nörodejeneratif ve nörogelişimsel (AH ve OSB gibi) hastalıkları olan kişilerde zaten var olan patolojileri daha da kötüleştirebilir (Messier, C., ve Teutenberg, K., 2005).

OSB ve AH'nin ekspresyonu, birlikte ele alınan birkaç faktörden etkilenmektedir. Bazı hassas genlerin bu hastalıklarda rol oynaması ve bunların hayatın çeşitli dönemlerinde ortaya çıkması gerçekten merak uyandırıcıdır. Bu kalıtsal temel nedeniyle, bu hastalıklar demiyelinizasyon, iltihaplanma, oksidatif stres, hafıza bozukluğu ve bilişsel anormallikler gibi özellikleri paylaşır. Hem hücrel oksidatif stresi azaltmak hem de enflamatuvar yolları hedeflemek, her iki hastalık için ana güncel tedavidir (Khan, S.A. ve diğ., 2016).

Ancak, çok az sayıda araştırmacı otizm gelişimine bakmıştır. Yapılan çalışmalarda IDE gibi koruyucu enzimlerin, beyindeki amiloid- β peptitlerinin veya amiloid genlerinin parçalanmasında çok önemli olduğu ve bunların terapötik potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, bu peptidazın yüksek düzeyleri çeşitli yan etkilere neden olduğundan, çeşitli agonist ve antagonist bazlı kombinasyon terapötik yaklaşımların kullanılması da IDE'nin homeostatik regülasyonu için uygun gösterilmiştir. Bu nedenle değişen IDE düzeyleri, hücreler için oldukça toksik olan A β birikimine yol açmakta ve toksik A β birikimi, nöronların normal işleyişine müdahale ederek nöronal morfolojide değişikliklere, hafıza kaybına ve bunun sonucunda hücre hasarına neden olmaktadır (Pivovarova, O. ve diğ., 2016).

2.3. D Vitamini

Vücuttaki D vitamininin çoğu, deride güneş ışığının başlattığı biyosentez yoluyla elde edilir. Cilt güneşe maruz kaldığında, bir kolesterol öncüsü olan 7-dehidrokolesterol, sırasıyla ultraviyole B (UVB) radyasyonu ve termal uyarı ile previtamin D3 ve vitamin D3'e (kolekalsiferol) dönüştürülür (Zella, J.B., ve DeLuca, H.F., 2003). D vitamininin %30'dan azı diyet yoluyla alınabilir (Holick, M.F., 1996). Gıdalarda bulunan D vitamini iki şekilde bulunabilir: Güneşte kurutulmuş mantar gibi bitkisel kaynaklarda bulunan D2 Vitamini (ergokalsiferol); ve çoğunlukla yağ açısından zengin balıklarda bulunan D3 vitamini. Hem D2 vitamini hem de D3 biyolojik olarak aktif formları olan 1 α ,25-dihidroksivitamin D3

($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ veya kalsitriol'e iki kez hidroksilasyondan geçerek dönüşür (DeLuca, H.F., ve Cantorna, M.T., 2001). Hidroksilasyonun ilk aşaması, D vitamininin 25-hidroksilaz ile kalsidiol [$25(\text{OH})\text{D}$]'ye dönüştürüldüğü karaciğerde meydana gelir ve hidroksilasyonun ikinci aşaması, 1α -hidroksilaz tarafından katalize edilir ve esas olarak böbrekte meydana gelir. $25(\text{OH})\text{D}$ 'den $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ üretilir. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ daha sonra nükleer D vitamini reseptörüne veya plazma membranı nükleer D vitamini reseptörüne bağlanarak biyolojik etkiler uygular. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün başlıca biyolojik etkilerine, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün gen ekspresyonunu kontrol ettiği nükleer D vitamini reseptörü aracılık eder. D vitamininin genomik etkisi, kemik metabolizmasının homeostatik kontrolü, bağışıklık hücresi büyümesi ve damar tonusunun düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde temel roller oynayan fonksiyonel aktiviteleri olan 200'den fazla genin ekspresyonunda yer alır (Kim, D. H. ve diğ., 2020). D vitamini vücuttaki çeşitli biyolojik aktivitelerde yer alır ve bu nedenle çoğu doku ve hücrede D vitamini reseptörü bulunmuştur (Holick, M.F., 2004). D vitamininin en iyi bilinen etkisi, kalsiyum ve kemik mineralizasyonunun homeostazı ile ilişkilidir. D vitamini ve D vitamini reseptörü, esas olarak bağırsaklarda kalsiyum emilimini teşvik etme işlevi görür (Lakshmi, S.V.V. ve diğ., 2009). D vitamini, çocukluğun oluşum yıllarında kemiğin gelişimi, büyümesi ve mineralizasyonu için gerekli olan temel bir bileşendir; bununla birlikte, D vitamini her yaşta yetişkinde yaşam boyu optimal kemik sağlığının korunmasında önemli bir rol oynamaya devam etmektedir (Hingorani, A.D., 2001). D vitamini çeşitli hücrelerde önemli roller oynarken, D vitamininin etkisi, D vitamini biosentezinin azalması, hücrelerde D vitamini hidroksilazlarının olmaması ve D vitamini reseptörü içeriğinin azalması gibi bir dizi faktör tarafından engellenebilir; bu nedenle bozulmuş D vitamini etkisi osteoporoz, diyabet, ateroskleroz ve kanser gibi birçok kronik hastalığın gelişimine katkıda bulunabilir (Hausler, M.R. ve diğ., 2013).

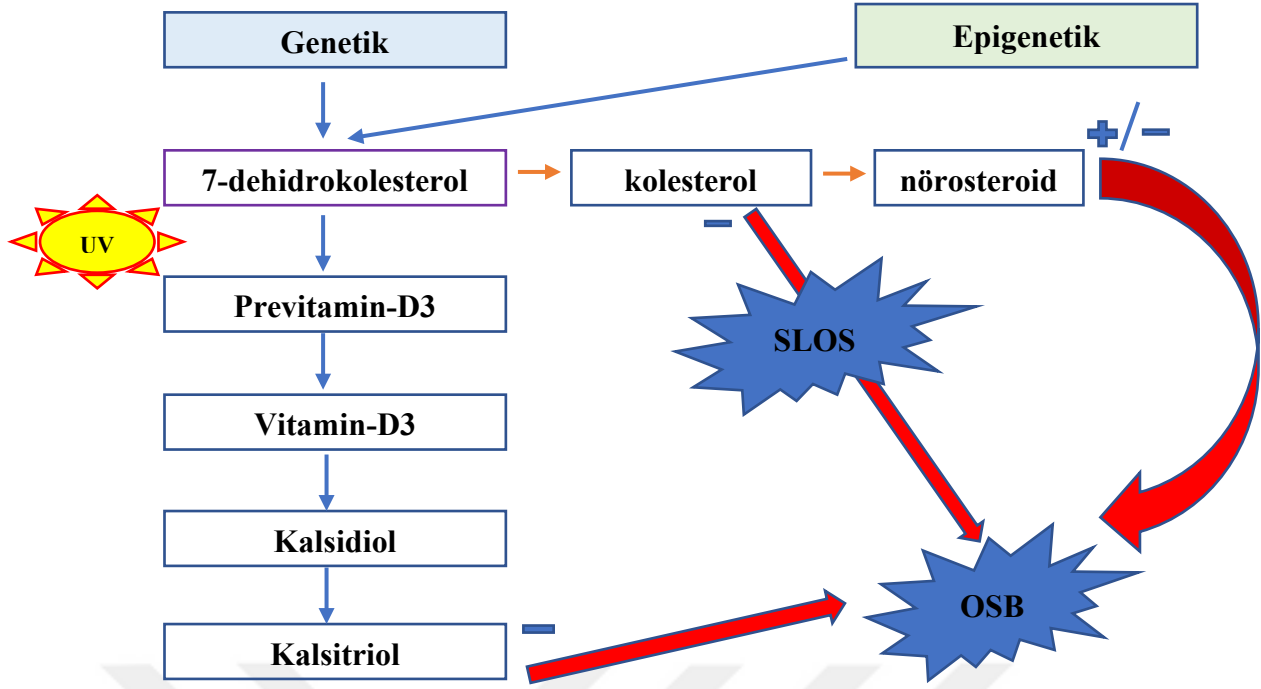
2.3.1. Otizmde D Vitamininin Rolü

Konuyla ilgili artan ilgiye rağmen, D vitamini ile otizm arasındaki bağlantının nedeni hala bilinmemektedir. Kesin olmamakla beraber, D vitamini eksikliği genetik veya çevresel faktörlerden kaynaklanabilir. D vitamini eksikliğinin OSB gelişimi için bir risk faktörü olup olmadığı hala açık değildir. OSB hastalarında D vitamini eksikliği, D vitamini eksikliğinin OSB'nin bir nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu konusu araştırılmaktadır. Bağışıklık hücreleri, plasenta ve gelişmekte olan ve yetişkin beyninin, büyük miktarlarda D vitamini yüzey reseptörleri içermesi, D vitamini ile beyin fonksiyonu arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. D vitamini metabolik enzimleri ve reseptörleri de bu dokularda yaygın

olarak eksprese edilir (Bivona, G. ve diğ., 2019). Bivona ve diğ. (2019) tarafından yapılan araştırmaya göre, D vitamininin immünomodülasyon, sinaptik plastisiteyi modüle etme, oksidatif stresi düşürme ve dopaminerjik sistemin ontogenisi dahil olmak üzere beyin gelişimi ve işlevi üzerinde önemli etkileri vardır. Ek olarak, D vitamininin gen ekspresyonunun kontrolünde önemli bir rolü olması, OSB ile ilişkili genlerin ekspresyonunun D vitamini tarafından etkilenebileceğini düşündürmektedir (Trifonova, E. A. ve diğ., 2019). Başka bir çalışma, D vitamininin beyin gelişiminde önemli bir nöroprotektif işlevi olduğunu göstermekte ve D vitamini eksikliğinin otizm de dahil olmak üzere nöropsikiyatrik durumlarla ilişkili olduğunu belirtmektedir (Máčová, L. ve diğ., 2017). OSB'li çocukların D vitamini düzeylerini inceleyen bir dizi vaka kontrol çalışması, otizmlili çocukların D vitamini düzeylerinin düşük olduğunu bulmuştur (Arastoo, A.A. ve diğ., 2018). Ayrıca, otizm gelişimi ile anne ve yenidoğan D vitamini eksikliği arasındaki ilişkide, Lee ve diğ. (2021) tarafından yapılan bir araştırma, anne D vitamininin OSB ile ilişkili olmadığını, yenidoğan D vitamininin daha sonraki sakatlık riski ile orta derecede ilişkili olduğunu bulmuştur.

D vitamini eksikliği şüphesiz otizm için bir risk faktörüdür (Şekil 2.2), ancak sadece kanda D vitamini tayininin otizmde D vitamini durumunu değerlendirmek için yeterli bir belirteç değildir. Otizmde D vitamininin önemi genetik çalışmalarla da desteklenmelidir. Yakın tarihli bir makale, D vitamini reseptörünün ebeveyn ve çocuk alellerinin, çocuklarda bir CYP2R1 aleli olduğu gibi, otizm riski ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bildirdi. Bu gen, D vitaminini kalsidiol 25(OH)D'ye dönüştüren enzim olan 25-hidroksilaz üretimini kodlayan genidir (Máčová, L. ve diğ., 2017).

D vitamininin triptofan ve serotonin üretimi üzerindeki etkileri yoluyla otizm riskini nasıl etkileyebileceği analiz edilmiştir ve otizmlili hastalarda serotonerjik sistemin bozulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2.2). Serotonin, toplum yanlısı davranışları ve duyguların değerlendirilmesini destekleyen bir nörotransmitterdir. Yetersiz seviyeleri, hayvan modellerinde bilişsel eksikliklerle birlikte nöroanatomik bozukluklara yol açmaktadır (Máčová, L. ve diğ., 2017).



Şekil 2.2. Otizm spektrum bozukluğu ile bağlantılı olabilecek D vitamini ve steroid hormon aktivite yolları (Máčová, L. ve diğ., 2017): OSB, otistik spektrum bozukluğu; SLOS, Smith-Lemli Opitz sendromu; +/- anormal seviyeleri gösterir.

2.4. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” adı verilir (Şener, G., ve Yeğen Berrak, Ç., 2009). Antioksidanlar, radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddelerdir (Dündar, Y., ve Aslan, R., 1999). Antioksidanların rolleri arasında serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirmek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı sağlamak sayılabilir (Pham-Hy, L.A. ve diğ., 2008). Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere iki grup altında toplanır. Endojen ve eksojen antioksidanlar, oksidan/antioksidan dengesini sağlamak için serbest radikallerden vücudu korur ve serbest radikalleri etkisizleştirmek için kullanılırlar (Sen, S., ve Chakraborty, R., 2011). Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılır (Pham-Hy, L.A. ve diğ., 2008; Aydemir, B., ve Karadağ Sarı, E., 2009; Sen, S. ve diğ., 2010). Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimatik savunma hattını oluşturan enzimsel antioksidanlardır (Valko, M. ve diğ., 2007; Pham-Hy, L.A. ve diğ., 2008; Sen, S. ve diğ., 2010; Sen, S., ve

Chakraborty, R., 2011). SOD, reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını oluşturur (Sen, S. ve diğ., 2010; Sen, S., ve Chakraborty, R., 2011). SOD, süperoksit radikalini (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır. Hidrojen peroksit daha sonra, CAT ya da GPx ile ortamdaki uzaklaştırılır (Young, I.S., ve Woodside, J.V., 2001). CAT, hidrojen peroksitin, H_2O ve O_2 'ye dönüşümünü katalize eder (Limon-Pacheco, J., ve Gonsebatt, M.E., 2009). GPx, elektron kaynağı olarak glutatyonu (GSH) kullanarak H_2O_2 'yi ve organik hidroperoksitleri (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) metabolize eden bir enzimdir. GR ise, flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir enzimdir. GR, NADPH kullanarak okside glutatyonun indirgenmesini sağlar (Özkan, A., ve Fışkın, K., 2004; Sen, S. ve diğ., 2010). Enzimsel olmayan antioksidanlar arasında glutatyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10, selenyum, α -lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin sayılabilir (Droge, W., 2002; Willcox, J.K. ve diğ., 2004; Valko M. ve diğ., 2007; Pham-Hy, L.A. ve diğ., 2008; Sen, S. ve diğ., 2010; Sen, S., ve Chakraborty, R., 2011). Eksojen kaynaklı antioksidanlar ise α -Tokoferol (Vitamin E), β -karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C) ve folik asit (Vitamin B9) vitaminleri ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlardır (Dündar, Y., ve Aslan, R., 1999; Şener, G., ve Yeğen Berrak, Ç., 2009; Aydemir, B., ve Karadağ Sarı, E., 2009).

Serbest radikallerin canlı vücudunda artması sonucu meydana gelebilecek hücre hasarları, sağlık açısından önemli sorunlar oluşturma potansiyeline sahiptir. Çünkü serbest radikallerin artışı gastrointestinal hastalıklardan infertiliteye, kardiyovasküler hastalıklardan solunum ve boşaltım sisteminde bozukluklara kadar birçok rahatsızlığa karşı yatkınlığı arttırabilir. Serbest radikal seviyeleri ile doğrudan ilişkili olan bu hastalıkların önlenmesi için oksidan maddelerin antioksidanlar ile dengede olması sağlanmalıdır. Dolayısı ile oksidan kaynaklı hastalıkların görülme riskini azaltmak ve daha kaliteli ve uzun yaşam için antioksidanlar önemli bir savunma mekanizması oluşturmaktadır (Karabulur, H., ve Gülay, M.Ş., 2016).

2.4.1. Otizmde Antioksidanların Rolü

Artan oksidatif stres ve antioksidan kapasitede azalma OSB hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Otizmde oksidatif stresi araştırmak için lipid peroksidasyon ürünleri, detoksifiye edici ajanlar (glutatyon gibi) ve reaktif oksijen türleri (ROS) savunma sisteminde yer alan

antioksidanların tespiti kullanılmıştır (Manivasagam, T. ve diğ., 2020). Lipid peroksidasyonunun etki mekanizmalarını incelemek, OSB'nin patofizyolojisini anlamak için önemli bir stratejidir (Yui, K. ve diğ., 2020). Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler, çeşitli çalışmalarda otizmle ilişkilendirilmiştir. Artan inflamasyon, eksitotoksisite, mitokondriyal ve immünolojik işlev bozukluğunun yanı sıra değişen glutatyon düzeyleri ve homosistein/metionin metabolizmasının tümü otizmle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, otizmde oksidatif stres duyarlılığı çevresel ve genetik risk faktörleri tarafından daha da kötüleşebilir (Manivasagam, T. ve diğ., 2020). Bu bulgular, yüksek oksidatif stresin otizmin etiolojisinde ve klinik belirtilerinde rolü olduğunu göstermektedir. Antioksidan takviyesinin yanı sıra birbirine bağlı trans metilasyon ve transkültürasyon yollarındaki değişmiş metabolit düzeylerini artırma yöntemleri, otistik semptomlarda ve şiddetinde bir azalma ile ilişkilendirilmiştir (Manivasagam, T. ve diğ., 2020).

2.5. Lipit profili

Lipit profili, kanınızdaki lipitler olarak adlandırılan belirli yağ moleküllerinin miktarını ölçen bir kan testidir. Lipit paneli, lipit testi, kolesterol paneli, koroner risk paneli, tokluk lipit paneli veya tokluk olmayan lipit paneli de testin diğer yaygın isimleridir. Bir lipid profili genellikle toplam kolesterol, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve trigliserid ölçümünü içerir. Bunlar standart bir lipit panelindeki ana ölçümler olsa da, testin bazı versiyonları başka ölçümler içerebilir. Toplam kolesterol, LDL, VLDL ve HDL'nin birleşiminden oluşan genel kolesterol seviyesidir. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), "kötü kolesterol" olarak bilinen kolesterol türüdür. Kan damarlarında birikebilir ve kardiyovasküler hastalık riskini artırabilir. Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), çoğunlukla son zamanlarda yenilen yiyeceklerden geldiği için kan örneği açlık numunesi olduğunda genellikle çok düşük miktarlarda bulunan bir kolesterol türüdür. Açlık örneğinde bu tip kolesterolde bir artış, anormal lipit metabolizmasının bir işareti olabilir. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), "iyi kolesterol" olarak bilinen kolesterol türüdür. Kan damarlarınızda LDL birikimini azaltmaya yardımcı olur. Trigliseritler, yenilen yiyeceklerden elde edilen bir yağ türüdür. Kanda aşırı miktarda trigliserit, kardiyovasküler hastalık ve pankreas iltihabı ile ilişkilidir. Kanda çok fazla lipit (kolesterol ve trigliseritler) olması, kan damarlarında ve atardamarlarda birikmeye yol açarak hasara neden olabilir ve kardiyovasküler problem riskini artırabilir. Bu

nedenle, sağlık uzmanları kalp hastalığı, kalp krizi (miyokard enfarktüsü) ve inme gibi kardiyovasküler hastalık riskini değerlendirmek için hem çocuklar hem de yetişkinler için lipid panelleri kullanır. Ayrıca karaciğer hastalıkları gibi diğer tıbbi durumların teşhis edilmesine yardımcı olmak için lipit profiline bakılır (<https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/17176-lipid-panel>).

2.5.1. Otizmde Lipid Profilinin Rolü

Otizmin geleneksel tedavisi, davranış terapisi ve farmakoterapinin kombinasyonuna dayanır. Ne yazık ki, mevcut farmakoterapi, OSB'nin birçok karmaşık semptomunun tamamen ortadan kaldırılmasını garanti etmemektedir. Ayrıca, yaygın olarak reçete edilen ilaçlar çeşitli yan etkilere neden olur. Bu yan etkilerden bazıları, örneğin iştahın azalması veya artması, kusma, ishal ve gastrointestinal tahriş gibi beslenmeyle ilişkilidir (Geraghty, M., ve Gina, D., 2010). Bilim adamları, beslenmenin hem beyin fonksiyonu hem de biyokimyası üzerinde kanıtlanmış önemli etkisi nedeniyle, OSB'li kişilerin beslenme, diyet takviyeleri ve terapilerinin rolü üzerine araştırmalar yürütüyorlar. Beyindeki önemli nörotransmitterlerin (dopamin, serotonin, asetilkolin ve γ -aminobütirik asit) işlevinin ilişkisi ve birçok diyet bileşeninin şu anda davranış ve bilişteki değişikliklerle ilişkili olduğundan şüphelenilen besin eksiklikleri hakkında artan sayıda kanıt vardır (Wasilewska, J., ve Llukowski, M., 2015; Rodriguez, R.L. ve diğer., 2017). D vitamini, K, pantotenik asit, kalsiyum ve demir, iyot ve selenyum dahil olmak üzere çeşitli biyo elementlerin eksikliklerine özel dikkat gösterilmektedir (Raymond, L.J. ve diğer., 2014; Blazewicz, A. ve diğer., 2016; Mazeher, H. ve diğer., 2016; Gunes, S. ve diğer., 2017). Otizmde metabolik dengesizliklerin yüksek insidansı, örneğin, metilasyon kapasitesinde azalma (folat döngüsü, transmetilasyon ve transsülfürasyon biyokimyasal yolları) ve bunun sonucunda oluşan oksidatif stres ve ayrıca otizmde mikrobiyomun metabolik aktivitesinin önemi literatürde vurgulanmıştır (Wasilewska, J., ve Llukowski, M., 2015). OSB ile ilgili çok sayıda çalışma, bağırsakla ilişkili immün yanıtların önemini vurgulamakta ve diyetin inflamasyonun düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir (Ranjan, S., ve Nasser, J., 2015; Sanctuary, M.R. ve diğer., 2018). İnflamatuar belirteçler ve lipitlerin otizm dahil nöropsikiyatrik bozuklukların patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmektedir (Gabay, C., ve Kushner, I., 1999; Matson, J.L., ve Williams, L.W., 2013). Bununla birlikte, otizm teşhisi konan bireylerde lipit profili için zorunlu periyodik tarama testleri yoktur. Yağ asidi

metabolizmasının ve anormal membran yağ asidi bileşiminin otizm gibi nörogelişim bozukluklarına katkıda bulunabileceğine dair kanıtlar vardır (Wiest, M.M. ve diğ., 2009). Buna rağmen, otizmlili çocuklarda lipit profili ile ilgili yeterli araştırma yoktur. Otizm spektrumu ile ilişkili Asperger sendromu olarak isimlendirilen bir bozukluğa ve çeşitli psikiyatrik bozukluklara sahip erişkinlerde lipit profilindeki anormallikler, birkaç araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Peter, H. ve diğ., 2002; Dziobeck, I. ve diğ., 2007). Yapılan bir çalışmada özellikle yaşlı OSB'li bireylerde lipit profili bozukluklarının varlığı belirlenmiştir (Blazewicz, A. ve diğ., 2020). Bu nedenle otizm spektrum bozukluklarında, laboratuvar testlerinden önce duruma göre uygulanan iyi dengelenmiş bir diyet (vücudun beslenme ihtiyaçlarını karşılamak için gerekli olan doğru miktarda besin almasını garanti eder) tedavinin ayrılmaz bir parçası olmalıdır (Blazewicz, A. ve diğ., 2020).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Ekipman

Bu tez çalışmasında kullanılan araç ve gereçler Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1. Bu çalışmada kullanılan araç ve gereçler

| No. | Araç ve Gereçler | Şirket | Menşei |
|-----|---------------------------------|--------------|------------|
| 1 | Mikropipetler (farklı hacimler) | Eppendorf | Almanya |
| 2 | Çok kanallı pipet (50-300µL) | Biohit | İngiltere |
| 3 | Absorbans Mikroplaka Okuyucu | Karl Kolb | Almanya |
| 4 | Kapaklı plastik borular | Afco-Dispo | Ürdün |
| 5 | Santrifüj | Kokusan | Almanya |
| 6 | Eppendorf tüpleri | Sigma | İngiltere |
| 8 | Derin Dondurucu (-80 °C) | Angel Antoni | İtalya |
| 9 | Jel Tüpler | Afco | Ürdün |
| 10 | İnkübatör | Memmert | Almanya |
| 11 | Mikrosantrifüj | Bioneer | Güney Kore |
| 12 | Spektrofotometre | Shimadzu | Japonya |
| 13 | Benmari | Kottermann | Almanya |
| 14 | Buzdolabı | Arjelic | Türkiye |
| 15 | ELIZA yıkayıcı | Seri | İtalya |
| 16 | ELIZA kaydedici | Seri | İtalya |
| 17 | İmmünoanalizör | MiniVidas | Fransa |

3.1.2. Çalışma Tasarımı

Bu çalışmada, Irak'ın Salahaddin kentindeki Tikrit Eğitim Hastanesi'nden 60 otistik hasta ve 30 sağlıklı denekten klinik ve laboratuvar verileri toplanmıştır. 1-20 yaş arasında, cinsiyet açısından uyumlu kadın/erkekler ve sağlıklı kontrol grubu üzerinde çalışılmıştır. Hastalara Tikrit Eğitim Hastanesi Otizm Merkezi'nde uzmanlar tarafından teşhis konulmuştur. İsim, yaş, cinsiyet, semptomlar ve ilaç geçmişi kaydedilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya dahil olan herkesten, tek kullanımlık şırınga kullanılarak kol damarından kan almak suretiyle örnekler alınmış olup, alınan kan hacmi sağlıklı ve hasta insanlardan yaklaşık 3-5 mL arasında değişiklik göstermiştir. Kan örneği, serum ve kan arasında ayırıcı

bir tabaka görevi gördüğü için serumun izole edilmesini kolaylaştıran jel tüp içeren ve sıkı kapaklı ayırma tüplerine yerleştirilmiştir. Serum örneklerini ayırmak için tüpler 5-10 dakika 408xg'de santrifüj edilmiştir.

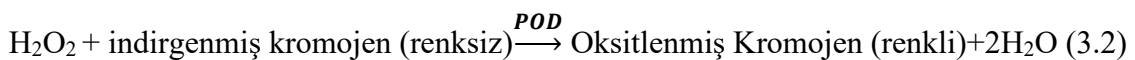
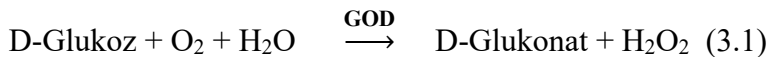
3.2.2. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

3.2.2.1. İnsülin Degrade Edici Enzim (IDE) Miktarının Ölçülmesi

IDE ölçümü için Sandwich-ELISA yöntemi ile ELISA kiti kullanıldı (SunLong Biotech Co. LTD, Katalog numarası: SL2710Hu). Bu kitin prensibi şu şekildedir: Bu kitte bulunan mikro ELISA plakası, insan IDE'sine özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Spesifik antikor, mikro ELISA plakasının kuyucuklarındaki standartlara veya numunelere bağlanır. Bundan sonra, her mikrolaka kuyusu, İnsan IDE'sine özgü biyotinlenmiş bir saptama antikorunun yanı sıra bir Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatı ile inkübe edilir ve kullanılmayan bileşenler kaldırılır. Substrat çözeltisi her kuyucuğa dökülür. Sadece mavi kuyucuklar, İnsan IDE'si, biyotinlenmiş saptama antikorları ve Avidin-HRP konjugatı içermektedir. Enzim-substrat reaksiyonunu durdurmak için bir sülfürik asit çözeltisi eklendiğinde, renk sarıya döner. Optik yoğunluk (OD), 450 nm +/- 2 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak ölçülür. İnsan IDE konsantrasyonu, OD değeriyle orantılıdır.

3.2.2.2. Serum Glukoz Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Enzimatik kolorimetrik teknik kullanılarak serumdaki glukoz konsantrasyonu ölçülmüştür. Bu yöntemde Glukoz, glukoz oksidaz (GOD) enzimi ile oksitlenerek glukonik aside dönüşürken hidrojen peroksit oluşur. Oluşan hidrojen peroksit, peroksidaz (POD) enziminin kataliziyle suya indirgenirken ortamdaki renksiz kromojen madde (o-dianisidin, 4-aminoantipirin+fenol veya aminofenazon+fenol) oksitlenerek renkli bir bileşiğe dönüşür. Sonuçta ortamdaki glukoz miktarına eşit olan oksitlenmiş kromojen miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür (3.1, 3.2).



Tablo 3.2. Glukoz miktarının ölçümünde kullanılan çözeltiler

| Reaktifler | Konsantrasyon |
|-------------------------|---------------|
| Fosfat tamponu (pH:7.5) | 100 mmol/L |
| Fenol | 5 mmol/L |
| Glukoz oksidaz (GOD) | 10 KU/L |
| Peroksidaz (POD) | 2 KU/L |
| 4- Aminoantipirin | 0.5 mg/L |
| Glikoz CAL | 100 mg/dL |

Prosedür:

1. Hem reaktifler hem de numuneler oda sıcaklığında hazırlanır
2. Reaktifler, aşağıdaki gibi numaralandırılmış test tüplerine yerleştirilir:

| Tüpler | Kör | Örnek | Standart |
|------------------|--------|--------|----------|
| R1. Mono reaktif | 1.0 mL | 1.0 mL | 1.0 mL |
| Örnek | - | 10 µL | - |
| Standart | - | - | 10 µL |

3. Tüplerin içeriği karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.
4. Daha sonra spektrofotometre yardımıyla, örneklerin ve standart çözeltinin absorbansı 500 nm'de ölçülür.
5. Glukoz miktarı aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$\text{Glukoz miktarı} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Standart}}} \times C_{\text{Standart}}$$

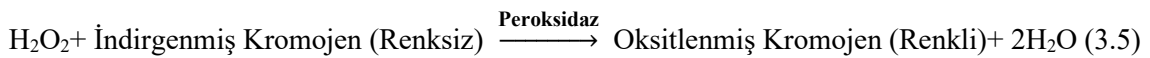
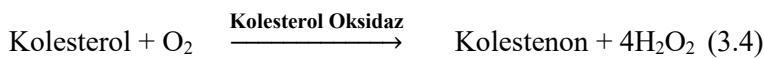
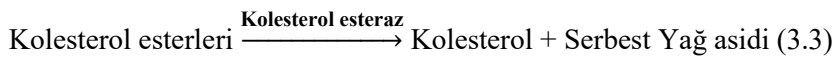
3.2.2.3. D Vitamini Miktarının Ölçülmesi

D vitamini analizi için ELISA kiti kullanılmıştır. Bu kitte, D vitamini antikoru içeren önceden kaplanmış bir mikrotitre plakası bulunur. Örnekteki veya standarttaki D Vitamini, reaksiyon sırasında belirli bir miktarda biyotin etiketli D Vitamini ile D Vitaminine özgü önceden kaplanmış bir Monoklonal antikor üzerindeki alanlar için rekabet eder. Plaka,

herhangi bir ekstra konjugat veya bağlanmamış örnek veya standardı çıkarmak için durulanır. Bunu takiben, her mikroluka kuyucuğu Yabanturpu Peroksidaz (HRP) ile birleştirilmiş Avidin ile inkübe edilir. Her kuyucuk daha sonra bir TMB substrat çözeltisi ile doldurulur. Renk değişimi, bir sülfürik asit çözeltisinin demlenmesiyle enzim-substrat teması bozulduktan sonra 450 nm (+/-2 nm) dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlenir. Örneklerin OD'sini standart eğriyle karşılaştırarak örneklerdeki D Vitamini konsantrasyonu belirlenir.

3.2.2.4. Kolesterol Miktarının Ölçülmesi

Enzimatik kolorimetrik bir yaklaşım kullanılarak serum kolesterol düzeyleri hesaplandı. Bu yöntemde kolesterol esteraz (CE), kolesterol oksidaz (CO) ve peroksidaz (POD) enzimleri kullanılır. Bu yöntem üç aşamalıdır, İlk olarak kolesterol esteraz enzimi ile ester kolesterolleri hidroliz edilerek kolesterol serbestleştirilir (3.3). Daha sonra serbest kolesterol, kolesterol oksidaz enzimi ile oksitlenirken hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturulur (3.4). Son aşamada oluşan H₂O₂, deney ortamında bulunan peroksidaz enzimi ile suya indirgenirken ortamdaki renksiz kromojen madde (*o*-dianisidin, 4-aminoantipirin+fenol veya aminofenazon+fenol) oksitlenerek renkli bir bileşiğe dönüşür (3.5). Sonuçta ortamdaki kolesterol miktarına eşit olan oksitlenmiş kromojen miktarı spektrofotometrik olarak 512 nm'de ölçülür.



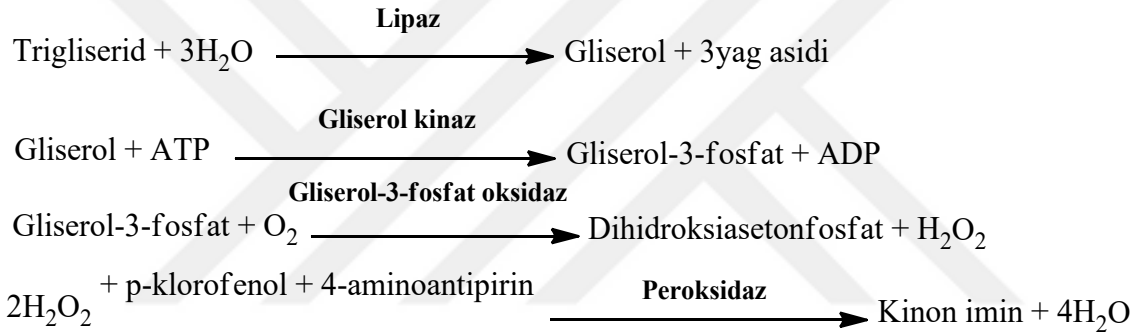
Kolesterol miktarı aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$\text{Kolesterol miktarı} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) = \frac{\text{Örnek Abs}}{\text{Standart Abs}} \times N$$

N = Standart kolesterol konsantrasyonu 200 mg/dL'dir.

3.2.2.5. *Trigliserit Miktarının Ölçülmesi*

Trigliserit konsantrasyonu, enzimatik kolorimetrik bir teknik kullanılarak belirlendi. Trigliserid, lipoprotein lipaz tarafından gliserol ve yağ asitlerine hidrolize edilir. Daha sonra gliserol, gliserol kinaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla adenzin trifosfat tarafından gliserol-3-fosfata ve adenzin difosfata fosforile edilir. Gliserol-3-fosfat daha sonra gliserolfosfat oksidaz tarafından dihidroksiaseton fosfat ve hidrojen peroksite dönüştürülür. Oluşan hidrojen peroksit, peroksidaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla kırmızı renkli kinonimin boyası üretmek üzere 4-aminoantipirin ve paraklorofenol ile reaksiyona girer (http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Kan%20Lipitleri%20Analizi.pdf.)



Yukarıdaki dört reaksiyon sonucunda oluşan renkli kompleksin renk şiddeti 500 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standart değeri kullanılarak aşağıdaki formül ile trigliserit miktarı hesaplanır

$$\text{Trigliserit Miktarı} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{örnek Abs.}}{\text{standart Abs.}} \times N$$

N = Standart trigliserit konsantrasyonu 200 mg/dL'dir.

3.2.2.6. *HDL Miktarının Ölçülmesi*

HDL miktar analizi, fosfotungstik asit/magnezyum klorür ile VLDL ve LDL seçici olarak çöktülmesi, çöktelinin santrifüjlenmesi, ve elde edilen berrak süpernatant kısmında kolesterol ölçümünde kullanılan aynı enzimatik süreç kullanılarak HDL miktarı ölçülmesine dayanır.

3.2.2.7. VLDL ve LDL Değerlerinin Ölçülmesi

VLDL, serumda trigliserid miktarının 0,2'sine eşit bir düzeyde bulunur. Bu hipoteze göre serum VLDL miktarı Trigliserid miktarının beşe bölünmesi ile hesaplanmıştır.

LDL miktarını hesaplamak için ise Friedwald'ın aşağıdaki formülü kullanılmıştır.

$$\text{LDL-kolesterol} = \text{Toplam kolesterol} - [\text{HDL-kolesterol} + \text{VLDL}]$$

3.2.2.8. Malondialdehit (MDA) Miktarının Ölçülmesi

Serumdaki malondialdehit konsantrasyonu, spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçüldü. Yöntem, başta malondialdehit olmak üzere lipid peroksidler ile asidik bir ortamda gerçekleşen tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki etkileşime dayanmakta olup absorpsiyon yoğunluğu 532 nm'de ölçülen renkli bir ürünle sonuçlanır.

Prosedür

1. Bir test tüpünde (cam) 150 mL serumu 1 mL %17,5'luk trikloroasetik asit çözeltisi ve 1 mL %0,6'luk tiyobarbitürik asit çözeltisi ilave edilir ve bir vorteks ile karıştırılır.
2. 15 dakikalık bir inkübasyon süresince karışım kaynar suya konur.
3. Daha sonra karışım soğumaya bırakılır ve üzerine 1 mL %70'lik trikloroasetik asit çözeltisi eklenir.
4. Oda sıcaklığında 20 dakika dinlenmeye bırakılır.
5. Karışım 15 dakika boyunca 300 rpm'de santrifüj içine yerleştirilir.
6. Santrifüj sonrası üsteki sıvı kısmın absorbansı 532 nm'de spektrofotometre ile ölçülür.

Hesaplama: Malondialdehit konsantrasyonu aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

$$\text{Malondialdehit} \left(\mu \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Örneğin absorbansı}}{E_o \times L} \times D$$

Burada:

E_o = Sönme katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

L = Işık yolu (cm)

D = Seyreltme faktörü (6.7×10^6)'dür.

3.2.2.9. *Glutasyon (GSH) Miktarının Ölçülmesi*

Glutasyonun (GSH) miktar tayini için bir spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) içeren Ellman reaktifi glutasyon ile hızlı bir şekilde etkileşime girdiği için bu prosedürde kullanılmakta olup absorpsiyonu 412 nm'de ölçülen sarı renkli bir molekül oluşturmak üzere glutasyonun SH grubu tarafından indirgenir. Serumdaki glutasyon miktarı ile üretilen ürünün konsantrasyonu belirlenir.

Prosedür:

1. İki eşit hacimde serum ve sülfosalisilik asit bir test tüpünde karıştırılır ve ardından 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
2. Santrifüj sonrası üsteki sıvı kısımdan 150 µL alınır ve buna 4.5 mL Ellman reaktifi ve 4.5 mL tamponlu sülfosalisilik asit eklenir.
3. Tüpler 5 dakika bekletildikten sonra cihaz tampon çözelti ile kalibre edildikten sonra çözeltinin absorbansı 412 nm dalga boyunda Spektrofotometrede okunur.
4. Glutasyon miktarı aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$\text{Glutasyon} \left(\mu \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Örneğin absorbansı}}{E_o \times L}$$

Burada:

E_o = Sönme katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

L = Işık yolu (cm)

3.2.2.10. *Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi*

Toplam SOD aktivitesi, adrenalinin ksantin ve ksantin oksidaz sistemiyle adrenokroma oksidasyonunun inhibisyonu yöntemi ile ölçüldü. Ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan süperoksit radikalleri, adrenalinin oksidasyonunda bir oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve süperoksit dismutaz tarafından H_2O_2 'e indirgenir. Oluşan adrenokromun absorbansı 480 nm'de okunur ve bir ünite SOD aktivitesi, adenokrom üretiminin %50'sini

inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanır (Misra, H.P., ve Fridovich, I., 1972; Pinho, R.A. ve diğ., 2006).

Prosedür:

1. 0.1 mL serum, 1.8 mL karbonhidrat tamponu içinde seyreltilir
2. 1 mL epinefrin 1 mL EDTA ile karıştırılır, daha sonra epinefrin eklendikten hemen sonra 480 nm'de absorbansı ölçülür ve 5 dakika sonra inhibisyon yüzdesi hesaplanır.

Hesaplama: İnhibisyon yüzdesi (%50) aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

$$\%İnhibisyon = \frac{\text{Kontrol- Örnek}}{\text{Kontrol}}$$

Daha sonra SOD aktivitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanır:

$$\text{SOD (U/mL)} = \frac{\text{İnhibasyon \%}}{5} \times 30$$

3.2.2.11. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçülmesi

Hidrojen peroksitin katalaz ile oksijen ve suya ayrışması sonucunda 240 nm'deki absorbans değerinin azalmasından faydalanılarak serumdaki katalaz aktivitesi ölçülmüştür (Aebi, H., 1974).

Prosedür: 0.050 cm³ kan serumu alınarak, 5 cm³ tampon çözeltisi ile seyreltildi. Daha sonra 2 cm³ seyreltilmiş serum alındı ve 1 cm³ hidrojen peroksit solüsyonu eklendi. Daha sonra 240 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak örneklerin absorbansı okundu. 15 saniye (A1) ve 30 saniye (A2) sonraki absorbanslar kaydedildi.

Hesaplama: Katalaz enziminin aktivitesi aşağıdaki denklem ile hesaplandı.

$$\text{Katalaz (kU/mL)} = 13.8 \times \log \frac{A1}{A2}$$

3.2.2.12. İstatistiksel Analiz

Ortalama + SD, minimum ve maksimum verileri ifade etmek için kullanılmakla beraber, grup karşılaştırmaları için ANOVA testi kullanıldı. Posthoc analiz Bonferroni ayarlamaları

kullanılarak yapıldı. Düzenli dağılmayan üç veri setinin karşılaştırılması için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi kullanıldı. Normal ortalamaya sahip gruplar arasındaki farklar, normal dağılım gösteren veriler için T-testi kullanılarak değerlendirildi.

$P < 0.05$ normal, $P < 0.01$ oldukça anlamlı, $P < 0.001$ aşırı derecede anlamlı ve $P > 0.05$ anlamsız olarak kabul edildi.

Veriler SPSS kullanılarak analiz edildi.



4. BULGULAR

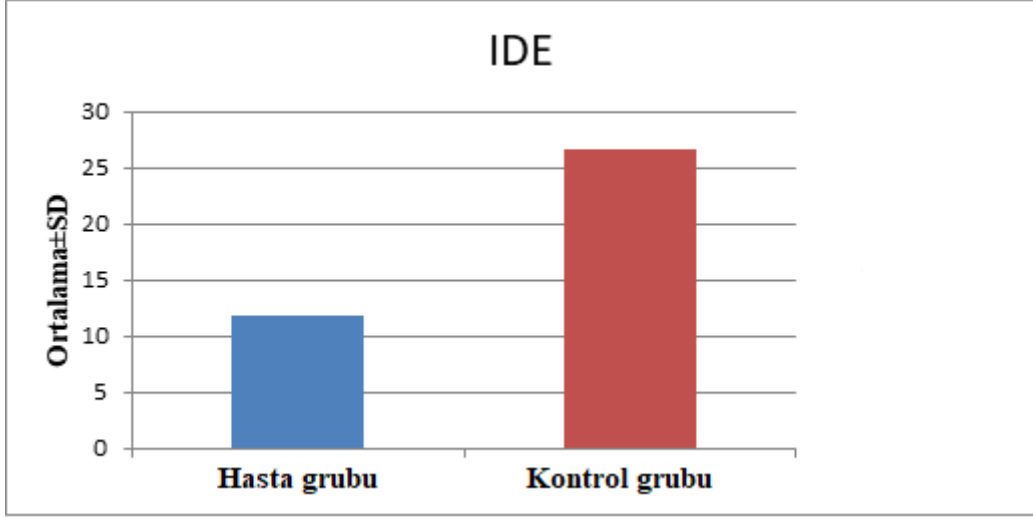
4.1. Biyokimyasal Parametre Testleri

4.1.1. İnsülin Degrade Edici Enzim (IDE) Miktarı

Hasta ve kontrol grubunda insülin degrade edici enzimin (IDE) miktarını ölçmek için için ELISA kiti kullanılmıştır. Tablo 4.1'de gösterildiği gibi, hasta grubundaki IDE enzimin ortalama miktarı 11.823 ± 4.637 ng/mL iken, kontrol grubunun ortalama IDE miktarı 26.716 ± 0.939 ng/mL olmuştur. Hasta grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli farklılıklar söz konusudur ($P < 0,001$) (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Hem Otizm hastaları hem de kontrol grupları için insülin degrade edici enzimin ortalama \pm SD'si

| Parametreler | Ortalama \pm SD |
|---|--------------------|
| | IDE (ng/mL) |
| Hasta grubu | 11.823 ± 4.637 |
| Kontrol grubu | 26.716 ± 0.939 |
| T-testi | 17.367 ** |
| P- değeri | 0.001 |
| *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.001$). | |
| P: İki kuyruklu olasılık, T: Test istatistiği | |



Şekil 4.1. Otizm hasta grubu ve kontrol grubundaki IDE düzeyi

4.1.2. D Vitamini Miktarı

D vitamini düzeylerini belirlemek için ELISA kiti kullanılmıştır. Tablo 4.2'de gösterildiği üzere D vitamini konsantrasyonunun ortalama ± SD'si otizm hasta grubunda 10.946 ± 2.64 ve kontrol grubunda 25.804 ± 1.37 ng/mL olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı farklılıklar bulunmuştur ($P < 0.001$).

4.1.3. Glukoz Miktarı

Çalışam gruplarında glukoz düzeylerini değerlendirmek için enzimatik kolorimetrik teknik kullanılmıştır. Tablo 4.2'de gösterildiği üzere, kontrol grubunun ortalama glukoz konsantrasyonu 96.133 ± 14.665 mg/dL, otizm hasta grubunun ortalama glukoz konsantrasyonu 55.133 ± 4.823 mg/dL olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli farklılıklar söz konusudur ($P < 0.001$).

Tablo 4.2. Otizm hastaları ve kontrol grubunda D vitamini ve glukoz miktarlarının ortalama ± SD'si.

| Parametreler | Ortalama ± SD | |
|---|--------------------|---------------------|
| | D Vitamini (ng/mL) | Glukoz (mg/dL) |
| Hasta Grubu | 10.946 ± 2.64 | 55.133 ± 4.823 |
| Kontrol grubu | 25.804 ± 1.37 | 96.133 ± 14.665 |
| T-testi | 28.809 ** | 19.717 ** |
| P- değeri | 0.001 | 0.001 |
| *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.001$). | | |
| P: İki kuyruklu olasılık, T: Test istatistiği | | |

4.1.4. Kolesterol Miktarı

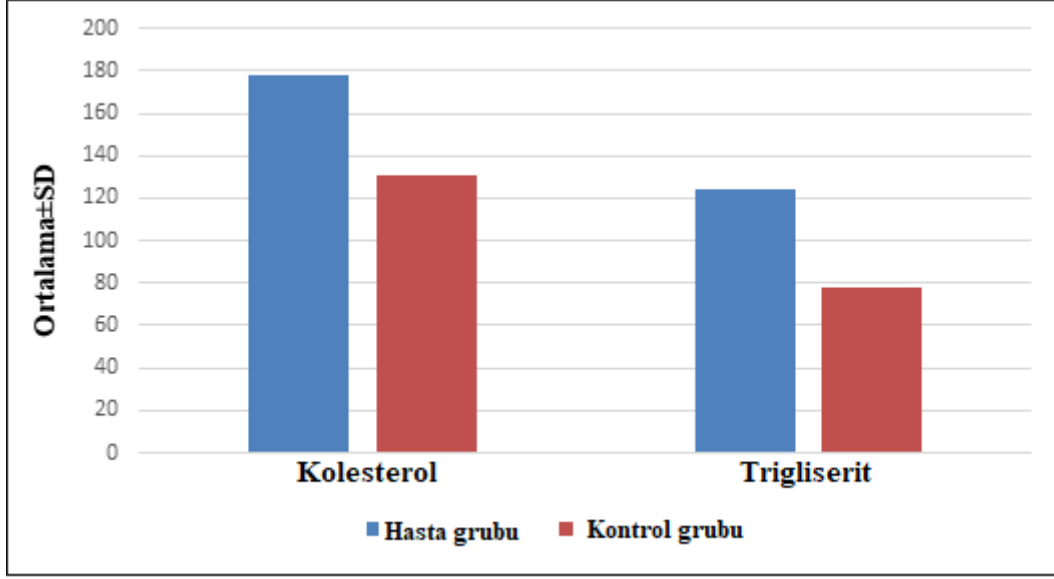
Kolesterol miktarını belirlemek için enzimatik kolorimetrik yaklaşım kullanılmıştır. Tablo 4.3'de ve Şekil 4.3'de gösterildiği üzere hasta grubunda kolesterolün ortalama \pm SD'si 177.566 ± 15.997 mg/dL iken kontrol grubunda 124.637 ± 1.498 mg/dL olmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli farklılıklar söz konusudur ($P < 0.001$).

4.1.5. Trigliserit Miktarı

Trigliserit düzeylerini belirlemek için enzimatik kolorimetrik teknik kullanılmıştır. Kontrol grubunun ortalama \pm SD trigliserid değeri 77.637 ± 1.498 mg/dL iken, hasta grubunun ortalama \pm SD trigliserid değeri 130.566 ± 15.997 mg/dL olmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, önemli farklılıklar bulunmuştur ($P < 0.001$) (Tablo 4.3, Şekil 4.2).

Tablo 4.3. Otizm hastaları ve kontrol gruplarında kolesterol ve trigliserit miktarlarının ortalama \pm SD'si.

| Parametreler | Ortalama \pm SD | |
|---|----------------------|----------------------|
| | Kolesterol (mg/dL) | Trigliserit (mg/dL) |
| Hasta Grubu | 177.566 ± 15.997 | 130.566 ± 15.997 |
| Kontrol grubu | 124.637 ± 1.498 | 77.637 ± 1.498 |
| T-testi | 18.031** | 18.032** |
| P- değeri | 0.001 | 0.001 |
| *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.001$). | | |
| P: İki kuyruklu olasılık, T: Test istatistiği | | |



Şekil 4.2. Araştırma gruplarının kolesterol (mg/dL) ve trigliserit (mg/dL) diyagramı

4.1.6. HDL Miktarı

HDL miktarını ölçmek için enzimatik kolorimetrik yaklaşım kullanılmıştır. Tablo 4.4'te ve Şekil 4.3'de gösterildiği üzere, hasta grubunda HDL'nin ortalama \pm SD'si 43.636 ± 11.486 mg/dL iken, kontrol grubunda 81.083 ± 2.948 mg/dL olmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, önemli farklılıklar bulunmuştur ($P < 0.001$).

4.1.7. LDL Miktarı

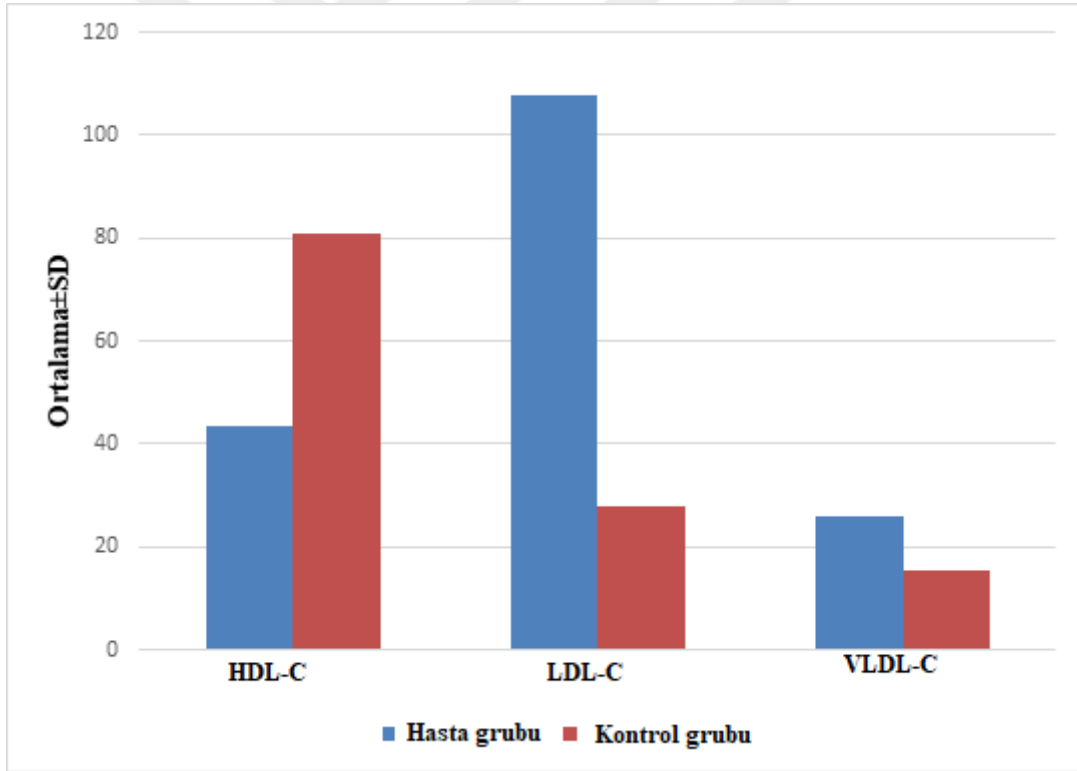
LDL miktarını saptamak için enzimatik kolorimetrik yaklaşım kullanılmıştır. Tablo 4.4'de ve Şekil 4.3'de gösterildiği üzere LDL'nin ortalama \pm SD'si hasta grubunda 107.816 ± 22.640 mg/dL ve kontrol grubunda 28.027 ± 1.957 mg/dL olmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, önemli farklılıklar söz konusudur ($P < 0.001$).

4.1.8. VLDL Miktarı

VLDL miktarını değerlendirmek için enzimatik kolorimetrik teknik kullanılmıştır. Tablo 4.4'de ve Şekil 4.3'de gösterildiği üzere, VLDL'nin ortalama \pm SD'si hasta grubunda 26.113 ± 3.199 mg/dL iken kontrol grubunun ortalama \pm SD'si 15.527 ± 0.299 mg/dL olmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli farklılıklar söz konusudur ($P < 0.001$).

Tablo 4.4. Otizm hastalarında ve kontrol gruplarında HDL-C, LDL-C ve VLDL-C'nin ortalama \pm SD'si.

| Parametreler | Ortalama \pm SD | | |
|---|---------------------|----------------------|--------------------|
| | HDL (mg/dL) | LDL (mg/dL) | VLDL (mg/dL) |
| Hasta Grubu | 43.636 \pm 11.486 | 107.816 \pm 22.640 | 26.113 \pm 3.199 |
| Kontrol grubu | 81.083 \pm 2.948 | 28.027 \pm 1.957 | 15.527 \pm 0.299 |
| T-testi | 17.524** | 19.213** | 18.030** |
| P- değeri | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| * (P \leq 0.05), ** (P \leq 0.001). | | | |
| P: İki kuyruklu olasılık, T: Test istatistiği | | | |



Şekil 4.3. Araştırma gruplarının HDL, LDL ve VLDL (mg/dL) diyagramı.

4.1.9. Malondialdehit (MDA) Miktarı

Malondialdehit (MDA) tayini için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Tablo 4.5'te gösterildiği üzere MDA'nın ortalama \pm SD'si hasta grubunda (8.624 \pm 1.066) μ mol/L ve

kontrol grubunda 5.095 ± 0.099 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, önemli farklılıklar söz konusudur ($P < 0.001$).

4.1.10. Glutasyon (GSH) Miktarı

Glutasyonu (GSH) tayini için bir spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Tablo 4.5'te gösterildiği üzere GSH'nin ortalama SD'si hasta grubunda 2.519 ± 0.140 $\mu\text{mol/L}$ ve kontrol grubunda 5.364 ± 0.510 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli farklılıklar söz konusudur ($P < 0.001$).

4.1.11. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Miktarı

Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Tablo 4.5'te gösterildiği üzere SOD'un ortalama SD'si hasta grubunda 6.535 ± 0.280 U/mL ve kontrol grubunda 10.228 ± 1.020 U/mL olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli farklılıklar söz konusudur ($P < 0.001$).

4.1.12. Katalaz (CAT) Enzim Miktarı

Katalaz (CAT) aktivitesini ölçmek için bir Spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Tablo 4.5'de gösterildiği üzere, CAT'nin ortalama SD'si hasta grubunda 65.038 ± 0.280 U/mL ve kontrol grubunda 8.728 ± 1.020 U/mL olarak ölçülmüştür. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, önemli farklılıklar söz konusudur ($P < 0.001$).

Tablo 4.5. Otizm hasta grubunda ve kontrol grubunda MDA, GSH, SOD ve CAT'nin ortalama \pm SD'si.

| Parametreler | Ortalama \pm SD | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| | MDA ($\mu\text{mol/L}$) | GSH ($\mu\text{mol/L}$) | SOD (U/mL) | CAT (U/mL) |
| Hasta Grubu | 8.624 ± 1.066 | 2.519 ± 0.140 | 6.535 ± 0.280 | 65.038 ± 0.280 |
| Kontrol grubu | 5.095 ± 0.099 | 5.364 ± 0.510 | 10.228 ± 1.02 | 8.728 ± 1.020 |
| T-testi | 18.031** | 29.989** | 26.233** | 26.233** |
| P- değeri | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| *(P0.05), **(P0.001). | | | | |
| P: İki kuyruklu olasılık, T: Test istatistiği | | | | |

4.2. Hasta Grubunda ve Kontrol Grubunda IDE Enzimi'nin Biyokimyasal Parametrelerle İlişkisi

Korelasyon testi Excel 2016 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnsülin degrade edici enzim (IDE) ile biyokimyasal parametreler arasındaki olası korelasyonlar, korelasyon katsayısı değeri ile araştırılmıştır.

Tablo 4.6'da gösterildiği üzere, IDE ile Vitamin D ($r=0.984$), IDE ile Glukoz ($r=0.970$), IDE ile CAT ($r=0.927$), IDE ile SOD ($r=0.927$), IDE ile GSH ($r=0.927$), IDE ile MDA ($r=-0.841$), IDE ile Kolesterol ($r=-0.842$), IDE ile trigliserit ($r=-0.842$), IDE ile HDL-C ($r=0.915$), IDE ile LDL-C ($r=-0.940$) ve IDE ile VLDL-C ($r=-0.842$) arasında güçlü bir korelasyon ve ($P<0.001$) P-değeri ile oldukça anlamlı farklılıklar söz konusudur.

Tablo 4.6. Hastalarda ve sağlıklı bireylerde IDE enzimi ile diğer biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon

| Parametreler | Hastalar | Kontrol | Parametreler | Hastalar | Kontrol |
|---|-----------|---------|--------------|-----------|-----------|
| D Vitamini | 0.984** | 0.987** | CHOL. | - 0.842** | 0.882** |
| Glukoz | 0.970** | 0.981** | TG. | - 0.842** | 0.880** |
| CAT | 0.927** | 0.967** | HDL-C | 0.915** | 0.970** |
| SOD | 0.927** | 0.957** | LDL-C | - 0.940** | - 0.922** |
| GSH | 0.927** | 0.967** | VLDL-C | - 0.922** | 0.881** |
| MDA | - 0.841** | 0.881** | | | |
| * ($P\leq 0.05$) , ** ($P\leq 0.01$). | | | | | |

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Otizm veya otizm spektrum bozukluğu (OSB), etiyojisi bilinmeyen bir grup nörogelişimsel bozukluğu ifade eden bir terim olup öncelikle davranışsal gözlemler temelinde teşhis edilir. Sosyal etkileşim ve iletişim zorluklarının yanı sıra tekrarlayan ve basmakalıp davranışlar, OSB'nin ayırt edici özellikleridir. OSB'nin gelişiminde hem genetik hem de çevresel faktörler rol oynamaktadır. Bu araştırmada, otizmlili hasta grubuyla istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olup olmadığını görmek için insülin degrade edici enzim (IDE) ile D vitamini konsantrasyonu, glukoz konsantrasyonu, lipid konsantrasyonu (Kolesterol, Trigliserit, HDL, LDL ve VLDL), bazı antioksidan parametrelerin konsantrasyonları (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA)) arasındaki ilişki araştırılmıştır.

IDE enzimi ile otizm arasındaki ilişkiyi açıklayan çok az çalışma vardır. Yapılan çalışmalarda IDE gibi koruyucu enzimlerin, beyindeki amiloid- β peptitlerinin veya amiloid genlerinin parçalanmasında çok önemli olduğu ve bunların terapötik potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle değişen IDE düzeyleri, hücreler için oldukça toksik olan A β birikimine yol açmakta ve toksik A β birikimi, nöronların normal işleyişine müdahale ederek nöronal morfolojide değişikliklere, hafıza kaybına ve bunun sonucunda hücre hasarına neden olmaktadır (Pivovarova, O. ve diğ., 2016). Bu çalışmada otizmlili hastalarda insülin degrade edici enzimin (IDE) kontrol grubuna göre azaldığı ve IDE ile diğer biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonun otizm hastalarında önemli ölçüde farklı olduğu belirlendi (Tablo 4.1., Şekil 4.1., Tablo 4.6.) .

Bu çalışmada Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, otizm hasta grubunda kontrol grubuna göre D vitamini düzeyleri daha düşük olarak belirlenmiştir. Bu sonuç literatürle uyumludur (Bener, A., ve Kamal, M., 2014; Arastoo, A.A. ve diğ., 2018; Şengenç, E. ve diğ., 2020). OSB'li çocuk ve ergenlerde D vitamini düzeyleri sağlıklı kontrollere göre daha düşüktür. Olası nedenler, OSB'li çocukların daha seçici olmaları, daha az yemek yemeleri ve bu hastalığı olmayan çocuklara göre daha az D vitamini almalarıdır (Esteban-Figuerola, P. ve diğ., 2019). Ayrıca, yaşamlarının ikinci yılında, otistik çocuklar sağlıklı kontrol grubuna göre dışarıda daha az zaman geçirmekte olup, bu durum da otizmlili çocukların güneş UVB'ye karşı daha az savunmasız olduklarını ve dolayısıyla kutanöz sentez yoluyla daha az D vitamini aldıklarını ifade etmektedir (Liu, D. ve diğ., 2015). Ayrıca D vitamini düzeyleri genetikten

etkilenebilir. OSB riski ile bağlantılı olan D vitamini metabolizması ve reseptör gen varyasyonlarının D vitamini üzerinde etkisi olabilir. OSB'li çocuklarda D vitamini eksikliği kısmen bu değişkenlerden kaynaklanabilir. Bunun dışında antiepileptik ilaçlar D vitamini eksikliğine neden olabilir (Bahrami, A. ve *diğ.*, 2018).

Bu tez çalışmasında glukoz seviyelerine bakıldığında, otizm hasta grubunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde farklılıklar göze çarpmaktadır (Tablo 4.2). Elde edilen sonuçlar, Zhang, ve *diğ.* (2019) tarafından ortaya konulan bulgularla örtüşmektedir. Yapılan çalışmalarda OSB'li hastaların daha düşük kan şekeri düzeyleri sergilediği belirtilmiştir. Düşük kan şekeri düzeyleri, daha kötü dikkat ve hafıza fonksiyonları ile bağlantılı olmuştur (Zhang, M. ve *diğ.*, 2019).

Bu çalışmada, otizimli hasta grubunda kontrol grubuna göre antioksidan (CAT, SOD, GSH) düzeylerinin azaldığı ve MDA'nın arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.5). Bu bulgular literatürdeki diğer araştırmalar tarafından desteklenmektedir (Manivasagam, T. ve *diğ.*, 2020; Yui, K. ve *diğ.*, 2020; Kim, D.H. ve *diğ.*, 2020). Bu sonuçlara göre artan oksidatif stres duyarlılığı, OSB gelişiminde rol oynayabilir. González-Fraguela ve *diğ.* (2013) otistik bireylerin serum GSH düzeylerinin kontrollere göre oldukça düşük olduğunu bulmuşlardır. Çocukların glutatyon düzeyleri gebe kalmadan bebeklik dönemine kadar doğal olarak düşük olduğundan ve genç beynin, ROS'taki herhangi bir artışa karşı koruma sağlayamayan olgunlaşmamış bir antioksidan sistemine sahip olmasından dolayı, çocuklar oksidatif strese yetişkinlerden daha duyarlıdır (Erden-İnal, M. ve *diğ.*, 2002). Otistik kişilerde görülen yüksek MDA düzeyleri hücrenin lipid bileşeninde artan hasara neden olur. Bu bulgu, otistik çocukların artan CAT aktivitesi ve redoks dengesini sürdürmek için yetersiz GSH düzeyleri ile uyumludur (Ming, X. ve *diğ.*, 2005). Bu çalışmada seçilmiş oksidatif stres göstergelerinin, yüksek duyarlılık ve özgüllükleri nedeniyle OSB için biyobelirteçler olarak uygun olması beklenmektedir.

Lipid profili araştırmamızda yer alan kolesterol, trigliseritler, LDL ve VLDL, otizm hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek düzeylerde, HDL ise hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde bulunmuştur (Tablo 4.4., Şekil 4.3.). Bu sonuçlar, literatürle uyumludur (Kim, E.K. ve *diğ.*, 2010; Błażewicz, A. ve *diğ.*, 2020) Otistik çocuklarda bazı lipid bileşenlerinin sağlıklı çocuklardan önemli ölçüde farklı olmasıyla, otizm plazma lipid profilindeki değişikliklerin bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Kim, E.K. ve *diğ.*, 2010). Bazı çalışmalar, OSB'li kişilerde lipid paneli anormalliklerinin yaygın

olduğunu ve bu varyasyonların ciddiyyetinin klinik semptomların Őiddetini etkileyebileceğini belirtmiŐlerdir. (Usui, N. ve diğ., 2020).



KAYNAKLAR

- Adams, J. B. ve diğ., 2018, Comprehensive nutritional and dietary intervention for autism spectrum disorder—a randomized, controlled 12-month trial, *Nutrients*, 10(3), 369.
- Aebi, H., 1974, *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edn., Verlag Chemie GmbH, Weinheim, ISBN: 9783527255979.
- Al-Gadani, Y. ve diğ., 2009, Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children, *Clinical biochemistry*, 42(10-11), 1032-1040.
- Arastoo, A. A. ve diğ., 2018, Evaluation of serum 25-Hydroxy vitamin D levels in children with autism Spectrum disorder, *Italian Journal of Pediatrics*, 44(1), 1-5.
- Aydemir, B. ve SARI, E. K., 2009, Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi, *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2), 56-60.
- Bahrami, A. ve diğ., 2018, Genetic and epigenetic factors influencing vitamin D status, *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 4033–4043.
- Bener, A. ve Kamal, M., 2014, Predict attention deficit hyperactivity disorder? Evidence-based medicine, *Global Journal of Health Science*, 6(2), 47.
- Bivona, G. ve diğ., 2019, Vitamin D and the nervous system, *Neurological Research*, 41(9), 827–835.
- Błażewicz, A. ve diğ., 2016, Iodine in autism spectrum disorders, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 34, 32-37.
- Błażewicz, A. ve diğ., 2020, Assessment of changes over time of lipid profile, c-reactive protein level and body mass index in teenagers and young adults on different diets belonging to autism spectrum disorder, *Nutrients*, 12(9), 2594.
- Chiarotti, F. ve Venerosi, A., 2020, Epidemiology of autism spectrum disorders: a review of worldwide prevalence estimates since 2014, *Brain sciences*, 10(5), 274.
- Chlebowski, C. ve diğ., 2010, Using the childhood autism rating scale to diagnose autism spectrum disorders, *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 40(7), 787–799.
- Deth, R. ve diğ., 2008, How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis, *Neurotoxicology*, 29(1), 190–201.
- Droge, W., 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev*, 82(1), 47-95.
- Dündar, Y., ve Aslan, R. 1999, Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller, antioksidanlar, *Tip Bil. Der.*, 2(2), 134-42.
- Dziobek, I. ve diğ., 2007, Hypercholesterolemia in Asperger syndrome: Independence from lifestyle, obsessive–compulsive behavior, and social anxiety, *Psychiatry research*, 149(1-3), 321-324.
- Erden-İnal, M. ve diğ., 2002, Age-related changes in the glutathione redox system, *Cell Biochemistry and Function*, 20(1), 61–66.

- Esteban-Figuerola, P. ve diğ., 2019, Differences in food consumption and nutritional intake between children with autism spectrum disorders and typically developing children: A meta-analysis, *Autism*, 23(5), 1079–1095.
- Eyles, D. W. ve diğ., 2013, Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 34(1), 47–64.
- Fahmy, S. F. ve diğ., 2016, Vitamin D intake and sun exposure in autistic children, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(3), 1043.
- Frazier, T. W. ve diğ., 2014, Confirmatory factor analytic structure and measurement invariance of quantitative autistic traits measured by the Social Responsiveness Scale-2, *Autism*, 18(1), 31–44.
- Frustaci, A. ve diğ., 2012, Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses, *Free Radical Biology and Medicine*, 52(10), 2128-2141.
- Gabay, C. ve Kushner, I., 1999, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *New England journal of medicine*, 340(6), 448-454.
- Genovese, A. ve Butler, M. G., 2020, Clinical assessment, genetics, and treatment approaches in autism spectrum disorder (ASD), *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4726.
- Geraghty, M. ve Gina, D., 2010, Nutritional Intake and Therapies in Autism-A Spectrum of What We Know: Part 1, *Infant, Child and Adolescent Nutrition*, 2, 62–69.
- González-Fraguela, M. E. ve diğ., 2013, Oxidative stress markers in children with autism spectrum disorders, *British Journal of Medicine and Medical Research*, 3(2), 307.
- Grant, W. B. ve Cannell, J. J., 2013, Autism prevalence in the United States with respect to solar UV-B doses: an ecological study, *Dermato-Endocrinology*, 5(1), 159–164.
- Gunes, S. ve diğ., 2017, Iron deficiency parameters in autism spectrum disorder: clinical correlates and associated factors, *Italian journal of pediatrics*, 43(1), 1-6.
- Guthrie, W. ve diğ., 2013, Early diagnosis of autism spectrum disorder: stability and change in clinical diagnosis and symptom presentation, *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 54(5), 582-590.
- Haussler, M. R. ve diğ., 2013, Molecular mechanisms of vitamin D action, *Calcified tissue international*, 92(2), 77-98.
- Hingorani, A. D., 2001, Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000, *Atherosclerosis*, 154(3), 521-527.
- Holick, M. F. ve diğ., 2011, Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(7), 1911–1930.
- Holick, M. F., 2004, Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease, *The American journal of clinical nutrition*, 80(6), 1678S-1688S.
- Holick, M. F., 2017, The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 18(2), 153-165.

- http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Kan%20Lipitleri%20Analizi.pdf. [Ziyaret Tarihi: 27.11.2022]
- <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/17176-lipid-panel> [Ziyaret Tarihi: 27.11.2022]
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK148499/> [Ziyaret Tarihi: 27.11.2022]
- Jha, N. K. ve diğ., 2015, Impact of insulin degrading enzyme and neprilysin in Alzheimer's disease biology: characterization of putative cognates for therapeutic applications, *Journal of Alzheimer's disease*, 48(4), 891-917.
- Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş., 2016, Antioksidanlar, *MAE Vet Fak Derg*, 1 (1), 11-14.
- Khan, S.A. ve diğ., 2016, Alzheimer's Disease and Autistic Spectrum Disorder: Is there any Association?, *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 15(4), 390-402.
- Kim, D. H. ve diğ., 2020, Vitamin D and endothelial function, *Nutrients*, 12(2), 575.
- Kim, E.K. ve diğ., 2010, Alterations in lipid profile of autistic boys: a case control study, *Nutrition Research*, 30(4), 255–260.
- Kim, S. H. ve diğ., 2013, Multisite study of new autism diagnostic interview-revised (ADI-R) algorithms for toddlers and young preschoolers, *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 43, 1527–1538.
- Lai, M.-C. ve diğ., 2019, Prevalence of co-occurring mental health diagnoses in the autism population: a systematic review and meta-analysis, *The Lancet Psychiatry*, 6(10), 819–829.
- Lakshmi, S.V.V. ve diğ., 2009, Oxidative stress in cardiovascular disease, *Indian J. Biochem. Biophys.*, 46, 421–440.
- Landa, R. J., 2018, Efficacy of early interventions for infants and young children with, and at risk for, autism spectrum disorders, *International Review of Psychiatry*, 30(1), 25–39.
- Landrigan, P. J. ve diğ., 2012, A research strategy to discover the environmental causes of autism and neurodevelopmental disabilities, *Environmental Health Perspectives*, 120(7), a258–a260.
- Li, J. ve diğ., 2020, Potential role of genomic imprinted genes and brain developmental related genes in autism. *BMC Medical Genomics*, 13(1), 1–13.
- Limón-Pacheco, J. ve Gonsebatt, M. E., 2009, The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 137-147.
- Liu, D. ve diğ., 2015, Environmental risk factors for autism spectrum disorders in children, *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi= Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 17(11), 1147–1153.
- Lord, C. ve diğ., 2018, Autism spectrum disorder, *The Lancet*, 392(10146), 508–520.
- Loucas, T. ve diğ., 2008, Autistic symptomatology and language ability in autism spectrum disorder and specific language impairment, *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 49(11), 1184–1192.

- Máčová, L. ve diğ., 2017. Vitamin D, neurosteroids and autism, *Physiological Research*, 66(4).
- Maenner, M. J. ve diğ., 2021, Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2018, *MMWR Surveillance Summaries*, 70(11), 1.
- Manivasagam, T. ve diğ., 2020, Role of oxidative stress and antioxidants in autism, *Personalized Food Intervention and Therapy for Autism Spectrum Disorder Management*, 193–206.
- Mazahery, H. ve diğ., 2016, Vitamin D and autism spectrum disorder: a literature review, *Nutrients*, 8(4), 236.
- Messier, C. ve Teutenberg, K., 2005, The role of insulin, insulin growth factor, and insulin-degrading enzyme in brain aging and Alzheimer's disease, *Neural plasticity*, 12(4), 311-328.
- Ming, X. ve diğ., 2005, Increased excretion of a lipid peroxidation biomarker in autism, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73(5), 379–384.
- Misra, H. P. ve Fridovich, I., 1972, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *Journal of Biological chemistry*, 247(10), 3170-3175.
- Özkan, A. and Fışkın, K., 2004, Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler, *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14, 52-60.
- Peter, H. ve diğ., 2002, Serum cholesterol level comparison: control subjects, anxiety disorder patients, and obsessive-compulsive disorder patients, *The Canadian Journal of Psychiatry*, 47(6), 557-561.
- Pham-Huy, L. A ve diğ., 2008, Free radicals, antioxidants in disease and health, *International journal of biomedical science*, 4(2), 89.
- Pinho, R. A. ve diğ., 2006, Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise, *Cell Biology International*, 30(10), 848-853.
- Pivovarova, O. ve diğ., 2016, Insulin-degrading enzyme: new therapeutic target for diabetes and Alzheimer's disease?, *Annals of Medicine*, 48(8), 614-624.
- Ranjan, S. ve Nasser, J. A., 2015, Nutritional status of individuals with autism spectrum disorders: do we know enough?, *Advances in Nutrition*, 6(4), 397-407.
- Raymond, L. J. ve diğ., 2014, Potential role of selenoenzymes and antioxidant metabolism in relation to autism etiology and pathology, *Autism research and treatment*, 6-9.
- Rodriguez, R. L. ve diğ., 2017, Impact of diet-derived signaling molecules on human cognition: exploring the food–brain axis, *npj Science of Food*, 1(1), 1-11.
- Sanctuary, M. R. ve diğ., 2018, Dietary considerations in autism spectrum disorders: the potential role of protein digestion and microbial putrefaction in the gut-brain axis, *Frontiers in nutrition*, 5, 40.
- Saraff, V. ve Shaw, N., 2016, Sunshine and vitamin D., *Archives of Disease in Childhood*, 101(2), 190–192.
- Sen, S. ve Chakraborty, R., 2011, The role of antioxidants in human health, In *Oxidative stress: diagnostics, prevention and therapy*, American Chemical Society, 16-37

- Sen, S. ve diğ., 2010, Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International journal of pharmaceutical sciences review and research*, 3(1), 91-100.
- Shen, Y. ve diğ., 2006, Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism, *Nature*, 443(7113), 870-874.
- Szachta, P. ve diğ., 2016, Immune related factors in pathogenesis of autism spectrum disorders, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(14), 3060–3072.
- Şener, G. ve Yeğen Berrak, Ç., 2009, İskemi Reperfüzyon Hasarı, *Klinik Gelişim Dergisi*, 22, 5-13.
- Şengünç, E. ve diğ., 2020, Vitamin D levels in children and adolescents with autism, *Journal of International Medical Research*, 48(7), 0300060520934638.
- Trifonova, E. A. ve diğ., 2019, The mTOR signaling pathway activity and vitamin D availability control the expression of most autism predisposition genes, *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6332.
- Tundo, G. R. ve diğ., 2017, Multiple functions of insulin-degrading enzyme: a metabolic crosslight?, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(5), 554–582.
- Usui, N. ve diğ., 2020, VLDL-specific increases of fatty acids in autism spectrum disorder correlate with social interaction, *EBioMedicine*, 58, 102917.
- Vahia, V. N., 2013, Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5: A quick glance, *Indian Journal of Psychiatry*, 55(3), 220.
- Valko, M. ve diğ., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The international journal of biochemistry and cell biology*, 39(1), 44-84.
- Vergani, L. ve diğ., 2011, Metals, metallothioneins and oxidative stress in blood of autistic children, *Research in Autism Spectrum Disorders*, 5(1), 286-293.
- Wasilewska, J. and Klukowski, M., 2015, Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks—a possible new overlap syndrome, *Pediatric health, medicine and therapeutics*, 6, 153.
- Wiest, M. M. ve diğ., 2009, Plasma fatty acid profiles in autism: a case-control study, *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 80(4), 221-227.
- Wiggins, L. D. ve diğ., 2012, Support for a dimensional view of autism spectrum disorders in toddlers, *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42(2), 191–200.
- Willcox, J. K. ve diğ., 2004, Antioxidants and prevention of chronic disease, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44(4), 275-295.
- Young, I. S. ve Woodside, J. V., 2001, Antioxidants in health and disease, *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.
- Yui, K. ve diğ., 2020, The role of lipid peroxidation in individuals with autism spectrum disorders, *Metabolic Brain Disease*, 35(7), 1101-1108.
- Zhang, M. ve diğ., 2019, Altered Peak C-peptide and Fasting Blood Glucose in Children with Autism Spectrum Disorder, *Journal of Diabetes and Clinical Research*, 1(2).

Ek 1. Etik Kurul Raporu



Republic of Iraq
Ministry of Health/Environment.

Consent form of a research project
The initial Consent form of a research project to collect the samples from Ministry of
Heath
website www.moh.gov.iq

Title in English language:

**Assessment of Insulin-degrading enzyme (IDE) and its correlation with
vitamin D and some biochemical parameters in Autism**

1- Details of the main author/researcher:

| Name | The scientific title/ Career Title | Work address | Phone number | Email |
|--|---------------------------------------|---|----------------------|--|
| Othman Ibrahim Abdulateef | Master student | Kirsehir Ahi Evrans University Faculty of Science and Literature The Department of chemistry | 0905526819230 | othman.ibrahem9 9@gmail.com |

2- Details of the contributed author/researcher:

| Name | The scientific title/ Career Title | Work address | Phone number | Email |
|--|---|---|----------------------------|--|
| Dr. Omar Ali kanosh | Assistant prof Doctor, lecturer of Biochemis try | Tikrit Univers -College of Medicine- Biochemistry Department | 00 964 770 376 4987 | omar_alkanosh@ tu.edu.iq |
| Assistant. Prof. Dr. zuhal Alim | Assistant prof Doctor, lecturer of Biochemis try | KIRSEHIR AHI EVRA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ KİMYA ANABİLİM DALI | 00905445518123 | zuhal.alim@ahievra n.edu.tr |

The Scientific Supervisor/ if found

| Name | The scientific title/ Career Title | Work address | Phone number | Email |
|------|------------------------------------|--------------|--------------|-------|
| None | | | | |

A. Work background:

valuation of insulin-degrading enzyme (IDE) , its relationship with vitamin D, the effect of antioxidants, lipid levels, and the correlation with the activity of the enzyme in autistic patients.

B. The importance of the research and its objectives:

Insulin-degrading enzyme (IDE) is one of the enzymes found in the human body and is associated with many diseases such as diabetes, brain disease and aging. Therefore, we chose our study to estimate the activity of this enzyme in the blood serum of autistic children and to compare healthy , Can it be described as one of the basic variables for detecting diseases (Autism) and with the help of other variables, the most important of which is vitamin D , antioxidants and levels of lipid concentrations.

C. Conclusion:

In this study, we wanted to collection the clinical and laboratory data regarding 60 hospitalized patients with confirmed Autism from Tikrit Teaching Hospital in salahaldeen / Iraq.
valuation of insulin-degrading enzyme (IDE) , its relationship with vitamin D, the effect of antioxidants, lipid levels, and the correlation with the activity of the enzyme in autistic patients.

3- People or martials that are required for this research from the Ministry of Health.?

| Martials | Type |
|---|--|
| Laboratories samples (blood, stool, urine and Smears from the site of injury) | Yes, blood samples, patients and controls length, twits, weight and Blood pressure measurement |
| Martials/ equipment's | No need (Privet) |
| information from the patients Records | No need |
| Patients or other staff members | The study included a total of 60 male patients with autism. With 30 healthy controls |
| Others | No |

4- Time and the date to perform the research: (suggested locations)

Time: 1st April 2021- 1st Jun 2022.

Locations:

| Name of institute | Approval |
|--|----------|
| Private and Governmental laboratories in Ramadi and Falluja cities | |
| | |

5- Fund: None.

6- Methodology:

Study design: Blood samples and information were collected from 60 autistic patients with 30 healthy controls

B. Case definition and exclusion criteria for negative tests and sampling methods were considered.

Physiological and biochemical parameters were measured.

D- Number of samples expected to be taken: 100, 50 and 50 patients

E- Statistical analysis: descriptive statistical tables and mathematical correlations.

F- Ethical considerations during research: Not mentioning the names of patients.

G - Signed Commitment:

This is **Othman Ibrahim Abdulateef** I signed below to commit that I perform the research according to this protocol. Also, I commit that I will never change or modify it after it is being approved unless agreed with research committee in the health institute. Moreover, I commit following the laws, rules and instructions of Iraqi health ministry and any other official parties that follow the scientific and ethical commitment for research.

Name and the signature of the main researcher: **Othman Ibrahim Abdulateef**

The name and the signature of the supervisor/ if the research is performed to obtain a BSc, MSc or PhD etc: None.

Approval of the research committee at the health institution (or the body authorized to approve this form)

ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler | |
|------------------|--|
| Adı ve Soyadı | Othman Ibrahim ABDULATEEF |
| Doğum yeri | |
| Doğum Tarihi | |
| Uyruğu | <input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer: |

| Eğitim Bilgileri | |
|------------------|---------------------|
| Lisans | |
| Üniversite | Tikrit Üniversitesi |
| Fakülte | Fen Fakültesi |
| Bölümü | Kimya |
| Mezuniyet Yılı | |

| Yüksek Lisans | |
|------------------|---------------------------------|
| Üniversite | Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi |
| Enstitü | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Ana Bilim Dalı | Kimya |
| Programı | |
| Mezuniyet Tarihi | |