

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

**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA
SERUM ZONULİN DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Selen KARAGÖZLÜ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Buket DALGIÇ**

ANKARA- 2017

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

OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA
SERUM ZONULİN DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Selen KARAGÖZLÜ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Buket DALGIÇ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Ofisi tarafından 01/2017-01
proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA- 2017

KABUL ve ONAY



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve bu tezin gerçekleştirilmesinde, başlangıcından sonuna kadar gerekli tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, güler yüzü ile yakınlığını ve yardımlarıyla desteğini hep hissettiren çok değerli tez hocam sayın Prof. Dr. Buket Dalgıç’a,

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Elvan İşeri hocama, Prof. Dr. Gürsel Biberoglu hocama ve Dr. Canan Yılmaz Demirtaş hocama,

Uzmanlık eğitimimin boyunca gösterdikleri büyük katkılardan dolayı tüm değerli hocalarıma; birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma; beraber çok şey paylaştığımız Anabilim dalımızın tüm çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında sevgi, hoşgörü ve destekleri ile yanımda olan canım ailem; annem Tülin Karagözlü, babam Sezaettin Karagözlü, abim Eren Karagözlü ve değerli eşi Gülden Şenaltun Karagözlü’ ye, 2016 yılında hayatımıza renk katan minik yeğenim Öykü’ye,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Selen KARAGÖZLÜ
ANKARA 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bağırsak Bariyeri Ve Yapısı	3
2.2. Bağırsak Epiteli ve Sıkı Bileşkeler	6
2.3. Zonulin	8
2.4. Bağırsak Geçirgenliği ve İlişkili Hastalıklar	11
2.4.1. Çölyak hastalığı	13
2.4.2. İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH)	13
2.4.3. Tip 1 diyabetes mellitus (DM)	14
2.4.4. Atopi ve alerjik hastalıklar	14
2.4.5. Otizm spektrum bozukluğu	14
2.5. Otizm Spektrum Bozukluğu	15
2.5.1. Tanım ve tarihsel gelişim	15
2.5.2. Epidemiyolojisi	19
2.5.3. Etiyoloji	19
2.5.4. Etiyopatogenez	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28

3.1. Hasta ve Kontrol Grubu.....	28
3.1.1. Biyokimyasal analiz yöntemi	31
3.1.2. Serum zonulin tayini.....	31
3.2. İstatistiksel Değerlendirme	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ	56
7. ÖZET	59
8. SUMMARY.....	61
9. KAYNAKLAR.....	63
10. EKLER	72
10.1. EK 1.....	72
10.2. EK 2.....	74
10.3. EK 3.....	76
10.4. EK 4.....	80
11. ÖZGEÇMİŞ	83

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AJ	: Tutucu bileşkeler (adherens junction)
APC	: Antijen sunucu hücreler
BBB	: Kan-beyin bariyeri
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BKİ	: Beden kitle indeksi
BTA-YGB	: Başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk
CDC	: Hastalık Kontrol Merkezi
CRHR-1	: Kortikotropin salgılayan hormon reseptörü-1
DA	: Dopamin
DAG	: Diaçilgliserol
DM	: Diabetes Mellitus
DSM	: Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal büyüme hormonu reseptörünü
ENS	: Enterik sinir sistemi
FAA	: Serbest aminoasitler
GABA	: γ -aminobütirik asit
GALT	: Bağırsak ilişkili lenfoid doku
GBDA	: Gastrointestinal belirti değerlendirme anketi
Gİ	: Gastrointestinal
GİS	: Gastrointestinal sistem
HP	: Haptoglobulin

HPA	: Hipotalamus-pitüiter-adrenal bez
HLA	: İnsan lökosit antijeni
ICD	: Hastalıkların Uluslararası Sınıflandırılması
IFN-γ	: İnterferon- γ
IL-6	: İnterlökin 6
IL-12	: İnterlökin 12
IL-18	: İnterlökin 18
İBH	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
JAM	: Kavşak bağlantı molekülü
KKK	: Kızamık-Kızamıkçık-Kabakulak
LA/MA	: Laktüloz/Mannitol testi
MHC	: Major histocompatibility complex (doku uygunluk kompleksi)
NGFI-A	: Kolon A ile indüklenen sinir büyüme faktörü
NK	: Doğal öldürücü hücreler
OB	: Otistik bozukluk
ORT	: Ortalama
OSB	: Otizm spektrum bozukluğu
PAR2	: Proteinase activated receptor 2
PKC	: Protein kinaz C
PPI	: Fosfatidil inositol
SCFA	: Kısa zincirli yağ asiti
SD	: Standart sapma
TJ	: Tight junction (sıkı bileşke)

TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
YGB	: Yaygın gelişimsel bozukluk
ZO	: Zonula okludens
ZOT	: Zonula okludens toksini
4-EPS	: 4-etilfenil sülfat
5-HT	: 5-hidroksitriptamin (serotonin)
5-HIAA	: 5- hidroksiindolasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Hücreler arası özel bağlantılar.....	5
Şekil 2. Sıkı bileşkelerin protein bileşenleri	7
Şekil 3. Zonulinin etki mekanizmasının şematik gösterimi.....	10
Şekil 4. Otizm spektrum bozukluğunda beyin-bağırsak aksı.	26
Şekil 5. Serum Zonulin standart grafiği.....	33
Şekil 6. Hasta ve kontrol grubunun zonulin düzeyleri	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. DSM V Otizm Spektrum Bozuklukları Tanı Ölçütleri	18
Tablo 2. Aşırı geçirgen bağırsak sendromunun ilişkili olduğu hastalıklar ve belirtileri	24
Tablo 3. Olguların yaş, cins, boy Z skoru, ağırlık Z skoru ve BKİ Z skorları açısından karşılaştırılması.....	36
Tablo 4. Hasta grubunda GİS belirtilerinin görülme sıklıkları	37
Tablo 5. OSB hastalarında huzursuzluk belirtisinin diğer GİS belirtileri ile ilişkisinin değerlendirilmesi	38
Tablo 6. Hastalara uygulanan GBDA göre puan dağılımı	39
Tablo 7. Belirtilerin ortanca puanlarına göre hastaların dağılımı	39
Tablo 8. Hastaların yaş ve BKİ Z skoru ile GBDA puanları arasındaki ilişki	40
Tablo 9. Kontrol grubunun cinsiyetine göre zonulin düzeyinin dağılımı	41
Tablo 10. Kontrol grubunun yaş, boy uzunluğu, vücut ağırlığı ve BKİ Z skoru ile zonulin düzeyi arasındaki ilişki	41
Tablo 11. Hastaların cinsiyetine göre zonulin düzeyinin dağılımı.....	42
Tablo 12. Hastaların yaş, boy uzunluğu, vücut ağırlığı, BKİ Z skorları ile zonulin düzeyi arasındaki ilişki	42
Tablo 13. Hastaların belirti puan ortancalarına göre zonulin düzeyleri	44
Tablo 14. Ortanca değerin üstünde puan alan hastalarla kontrol grubunun zonulin düzeyleri açısından karşılaştırılması.....	45

1. GİRİŞ

Gastrointestinal sistemin (GİS) temel fonksiyonları besinlerin sindirimi, su ve elektrolitlerin emilimidir. Bağırsaklar aynı zamanda çeşitli antijenik geçişler için bariyer görevi yapar ve immün sistemin çok önemli bir parçasıdır.

Son yıllarda bazı otoimmün, inflamatuvar ve neoplastik hastalıkların etiyopatogenezinde bağırsak bariyeri bozuklukları ve bağırsak geçirgenliğindeki değişikliklere dikkat çekilmektedir. Çölyak hastalığı, tip 1 diabetes mellitus, astım, ankilozan spondilit, bazı kanser türleri, otizm spektrum bozukluğu (OSB), şizofreni gibi hastalıkların etiyopatogenezinde bağırsak epitel geçirgenlik artışı ve bunu belirleyebilecek belirteçler üzerinde yoğunlaşan çalışmalar yapılmaktadır.

Bağırsak geçirgenliği temel olarak bağırsak epitelindeki sıkı bileşkeler ile düzenlenir. Sıkı bileşkelerin fonksiyonunun düzenlenmesinde ise sıkı bileşkelerin yapısında yer alan ve zonulin olarak adlandırılan bir proteinin rolü çok önemlidir.

Zonulin, son yıllarda tanımlanmış bir insan proteindir ve *Vibrio cholera* tarafından oluşturulan zonula okludens toksininin benzeridir. Zonulin bağırsak epitelinde özel reseptörlere bağlanır ve hücreler arası sıkı bileşkelerin yapısında yer alır. Bu proteinin sıkı bileşkeden ayrılması bağırsak geçirgenliğinde artışla sonuçlanır. Çölyak hastalığı, tip 1 diyabet gibi bazı otoimmün hastalıklarda bağırsak geçirgenliğinde ve serum zonulin düzeyinde artış bildirilmiştir. Çölyak hastalarında glütensiz diyet tedavisi uygulaması ile serum zonulin düzeyinin normale döndüğü gösterilmiştir.

Otizm spektrum bozukluğu(OSB) etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış; davranışsal, sosyal ve bilişsel gerilikle seyreden nörogelişimsel bir hastalık

grubudur. OSB hastalarında gastrointestinal yakınmalar sıktır. Bu yakınmaların OSB patofizyolojisi ile ilişkisi olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir ancak OSB etiyolojisinde beyin bağırsak ilişkisinin rolü olabileceği düşüncelerini doğurmuştur. Otistik çocuklarda bağırsak geçirgenliği artışı üzerinde yoğunlaşan pek çok çalışma vardır. OSB hastalarında artan bağırsak geçirgenliği nedeni ile bağırsak bakterileri tarafından oluşturulan metabolitlerin veya bazı diyetler antijenlerin bağırsaktan kana geçişinin artabileceği ve olası immün/otoimmün mekanizmaları uyararak hastalığın gelişiminde rolü olabileceği düşünülmektedir. Bağırsak geçirgenliği artışı şeker emilim testleri ile gösteren çalışmalar yapılmıştır.

Çalışmamızda bağırsak geçirgenliğinde önemli rolü olan sıkı bileşkelerin fonksiyonunu düzenleyen zonulin, bağırsak geçirgenliği artışı işaret edebilecek bir biyo-belirteç olarak kullanılmıştır. Amacımız serum zonulin düzeyi tayini ile OSB olan çocuklarda bağırsak geçirgenliği artışı konusunda veri elde etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bağırsak Bariyeri Ve Yapısı

Klasik bilgilere göre gastrointestinal (Gİ) yolun başlıca görevleri besinlerin ve elektrolitlerin sindirimi, emilimi ve vücuttaki su dengesinin düzenlenmesidir. Gİ yolun anatomisi ve fonksiyonları üzerine yapılan incelemeler, bu organın çok farklı ve önemli başka işlevleri olduğunu göstermiştir. Bunların başında dış çevre ile konakçı doku arasında bariyer görevi görmek ve patojenlerin ve makro moleküllerin geçiş trafiğini ayarlamak gelmektedir. Her gün binlerce mikroorganizma ve besin bileşeni bağırsaklarla etkileşim halindedir. Bu etkileşimin sağlıklı sürdürülmesi oldukça karmaşık ve zor olup; besin ve su emiliminin düzenlenmesi, patojenlerden korunma, konakçı bağırsak bakterileri ve mukozal immün sistem arasında ilişkinin düzenlenmesi gibi pek çok fonksiyonun dengeli bir biçimde sürdürülmesini gerektirir [1].

Bağırsak bariyeri fonksiyonel bir yapıdır ve çoklu katmanlardan oluşur. Dış katmandan iç katmana doğru; fiziksel bariyer, bağırsak mikrobiyatası, mukus tabakası, epitelyal hücreler ve bağırsak ilişkili lenfoid dokudan (Gut associated lymphoid tissue- GALT) oluşmaktadır [2]. Fiziksel bariyer yüzey, bakteriyel yapışmayı önler ve parasellüler difüzyon için önemlidir. Daha derindeki fonksiyonel bariyer ise patojen mikroorganizmalarla konakçı mikroorganizmalarını ayırt edebilir; patojenlere ve antijenlere karşı immün yanıtı ve immün toleransı düzenler.

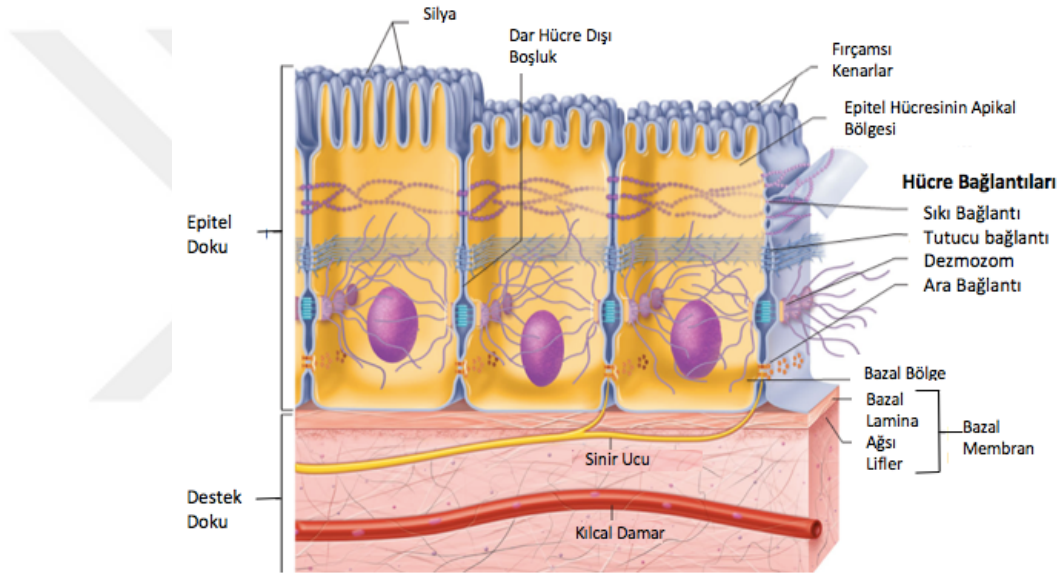
Bağırsak mikrobiyatası çoğunlukla anaerobik olmak üzere, yaklaşık 2000 farklı tür ve 10^{14} 'den fazla bakteriden oluşmaktadır [3]. Bu mikrobiyata insan

vücudu ile simbiyotik bir ilişki içindedir. Sağlıklı bireylerde besin maddelerinin ve ilaçların metabolizmasında, metabolik yolların düzenlenmesinde, epitel hücreleri arasındaki bütünlüğün sağlanmasında, gastrointestinal motilitenin düzenlenmesinde, sistemik ve mukozal bağışıklığın olgunlaşmasında önemli rol oynar [4]. Sağlıksız diyetler, ilaçlar ve çeşitli hastalıklar bağırsak mikrobiyatasında kalitatif ve kantitatif değişiklikler oluşturur. Disbiyozis olarak adlandırılan bu durum, inflamatuvar bağırsak hastalığı, besin alerjileri, metabolik sendrom, kanser, huzursuz bağırsak sendromu gibi pek çok bağırsak ve bağırsak dışı hastalıkla ilişkilendirilmiştir.

Mukus tabaka bakterilerin bağırsakta karşılaştığı ilk fiziki bariyerdir. Epiteli dışardan gelen yabancı mikroorganizmalara ve antijenlere karşı korumaktadır. Aynı zamanda bağırsak hareketleri için kaygan bir yüzey oluşturmaktadır. Mukus tabaka iki kısımdan oluşur. İç tabaka incedir ve epitel dokuya sıkıca yapışık halde bulunmaktadır. Dış tabaka ise daha kalın ve gevşek yapıdadır. Dış mukozal tabaka bağırsağın doğal mikroorganizmalarının tutunmasına izin vererek bağırsak mikrobiyatası için yaşam alanı haline gelmiştir. İç mukus tabakası yoğundur ve bakterilerin epitelden geçişine izin vermez. Bu farklılaşma bağırsak devamlılığı ve bağırsak fonksiyonları için önemlidir [2].

Bağırsak epitel hücreleri 200.000 cm^2 'den fazla yüzey alanı ile organizmanın iç ortamı ve dış çevre arasındaki en geniş ara yüzünü oluşturmaktadır. Bu epitel tabakası enterositler, endokrin hücreler, M hücreleri, goblet hücreleri ve paneth hücreleri olmak üzere 5 farklı hücre tipinden oluşan $20 \mu\text{m}$ 'lik tek bir tabakadır [5]. Bu tabaka lümendeki içeriğin dokuya geçişini

engelleyen fiziki bir bariyerdir. Hücre iskeletini oluşturan yapısal proteinler, hücreler arası kavşaklar ve hücreyi boylu boyunca kat eden proteinler birbirlerine bağlanarak karmaşık, homojen, güçlü bir ağ oluşturmaktadır. Bağırsak epitelinde iki farklı kavşak vardır. Bunlar ‘adherentes junctions’ (AJC) yani tutucu bağlantılar ve ‘tight junctions’ (TJ) yani sıkı bileşkelerdir (Şekil 1).



Şekil 1. Hücreler arası özel bağlantılar

(<http://antranik.org/detailed-features-of-epithelia/>)

İlerleyen bölümlerde daha geniş olarak bahsedeceğimiz sıkı bileşke fonksiyonları zonula okludens (ZO-1, ZO-2) proteinleri aracılığı ile aktin sitoskeleton ile ilişkili olan occludin, claudinler ve JAM-A gibi proteinlerin etkileşimi ile belirlenir. Miyozin fosforilasyonu ve aktin miyozin kompleksinin kasılmaları bu bağlantıların gücünü belirleyerek sonuçta bağırsak epitelinin geçirgenliği düzenlenir. Enfeksiyöz ajanlar ve inflamatuvar süreçte artan sitokinler,

tutucu bağlantılar ve sıkı bileşke proteinlerinin ekspresyonunu etkileyerek bağırsak geçirgenliğinin artmasına, lümendeki moleküllerin doku derinliklerine geçişine ve adaptif immün yanıtın uyarılmasına neden olurlar [2].

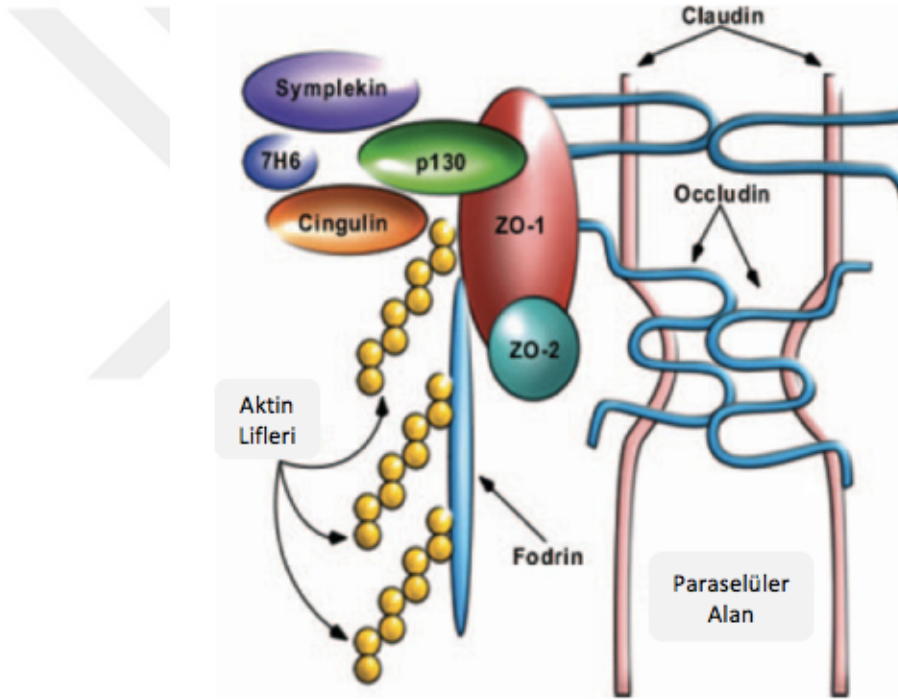
Bağırsak bariyerinin en derininde yer alan bağırsak ilişkili lenfoid doku (GALT), tüm vücudun bağışıklık hücrelerinin %70'ini içeren karmaşık bir ağ sistemidir [6]. Normal şartlarda bağırsakta yaşayan faydalı bakterilere karşı immün toleransın ve zararlı mikroorganizmalara karşı immün yanıtın oluşumunu düzenler. Bu düzenlemeyi dış tabaka ve dış çevrenin özelleşmiş hücreler aracılığı ile kurduğu ilişki sayesinde yapar. Bu özelleşmiş bağışıklık hücreleri Peyer plaklarındaki M-hücreleri ve dentritik hücrelerdir. Bu hücreler, mikroorganizmaları ve makromolekülleri T lenfositlere sunarak sitokin salgılanmasını ve bağışıklık cevabının aktivasyonunu sağlar [7].

Fizyolojik bağırsak homeostazisinin sürdürülmesi için yukarıda anlatılan bu yapıların sağlamlığı ve devamlılığı gereklidir. Yapılardan birinde bozukluk veya aralarındaki ilişkide bozukluk olması; bağırsak bariyerinin bozulması ve immün yanıtın aktivasyonu ile inflamasyonla karakterli pek çok hastalığın gelişimine zemin hazırlar. Otoimmün hastalıkların da genetik yatkınlığı olan bireylerde bu mekanizmalarla geliştiği öngörülmektedir [1].

2.2. Bağırsak Epiteli ve Sıkı Bileşkeler

Bağırsak bariyerini oluşturan yapılardan biri epitelyal tabakadır. Bağırsak geçirgenliğinde epitel hücreleri ve bu hücrelerin üst, yan ve alt yüzlerinde bulunarak birbirlerine sıkıca tutunmalarını sağlayan bağlantılar önemli rol

oynamaktadır. Dokulara güç ve kararlılık sağlayan bu yapılar sıkı bileşkeler ve tutucu bileşkeler olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla bu bağlantıların yapısının çoklu protein bileşimlerinden oluştuğu gösterildi. Sıkı bileşkeler bilinen yirmiden fazla dokuya özgül protein içermektedir. Bunlardan birkaçı occludin, claudin, kavşak bağlantı molekülü, sitoplazmik plak, zonula okludens proteini (ZO-1, ZO-2, ZO-3) vb. proteinlerdir (Şekil 2).



Şekil 2. Sıkı bileşkelerin protein bileşenleri

(Fasano, A. and J.P. Nataro, Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. Advanced drug delivery reviews, 2004. 56(6): p. 795-807.) [8]

Sıkı bileşkeler iki hücre arasında iç içe geçen dişli bir yapı meydana getirerek, birbirine çok güçlü bir şekilde bağlanıp hücreler arasındaki boşluğu tamamen kapatırlar [9]. Bağırsak epitelinin geçirgenliği hücreler arasındaki bileşkeler aracılığı ile düzenlenir. Oldukça dinamik çoklu protein ağı olan sıkı

bileşkelerin farklı koşullara (gelişimsel, patolojik ve fizyolojik) adaptasyonu hızlı ve kuvvetli olsa da halen bu adaptasyon mekanizmaları ve hücre dışı uyarılara karşı cevabının nasıl düzenlendiği tam olarak anlaşılamamıştır [10, 11]. Sıkı bileşke fonksiyonlarını geri dönüşümlü olarak düzenleyen ve bu fonksiyonların bilinen tek fizyolojik düzenleyicisi olan zonulin molekülünün keşfi ile hastalıkta ve sağlıkta bağırsak bariyerinin nasıl düzenlendiğine ilişkin ek bilgiler sağlamıştır [9, 12].

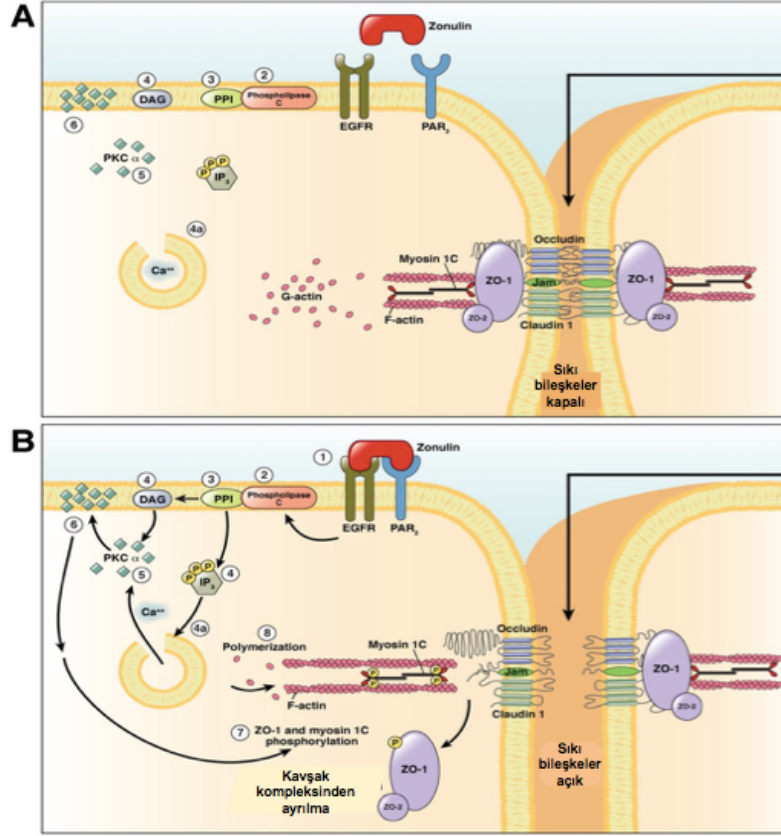
2.3. Zonulin

Zonulin son yıllarda tanımlanmış bir insan proteindir ve *Vibrio cholera* tarafından oluşturulan zonula okludens toksininin (ZOT) benzeridir. Zonulin, 47 kilodalton ağırlığında ve serin proteazlara benzer özelliklere sahip bir sinyal proteindir. Bağırsak epitelinden başka beyin ve kalp dokusunda da bulunduğu gösterilmiştir [13]. İnsan serumunun proteomik analizi ile zonulin bir pre-haptoglobulin (HP) 2 proteini olarak keşfedilmiştir. HP'lerin temel görevi hemoglobini stabil halde tutmaktır; HP1 ve HP2 olmak üzere iki genetik çeşidi vardır. Başlangıçta pre-haptoglobulin 2, sadece HP 2'nin pasif öncülü olarak düşünülüyordu ancak zaman içinde pre-haptoglobulin 2'nin (Zonulin) çoklu işlevi olduğu anlaşıldı. Rekombinan pre-HP 2 ile yapılan çalışmalar ile bu proteinin bağırsak geçirgenliği üzerinde önemli etkisi olduğu gözlemlendi. Bu molekül tek zincir formunda iken proteinazlar aracılığıyla epidermal büyüme faktör reseptörlerini uyararak bağırsak geçirgenliğini düzenlediği; bölünerek çift zincir formuna geldiğinde ise hemoglobini oksidasyondan koruduğu gösterildi [9, 14]. Sonuç olarak, sıkı bileşkelerin yapısında yer alan zonulinin bugün bilinen fizyolojik

rolleri, sıkı bileşke fonksiyonlarının düzenlenmesi ile proksimal bağırsağı bakteriyel kolonizasyona karşı korumak ve özellikle makromoleküllerin bağırsak lümeninden vücuda geçişini önlemektir.

Zonulin bağırsakta bu fizyolojik görevlerini hücreler arası sıkı bileşkelerin yapısında ve fonksiyonunda değişiklikler oluşturarak gerçekleştirir [15]. Zonulin, jejunum ve distal ileum epitel yüzeyindeki özgül reseptörlerine bağlanarak hücre içinde, protein kinaz C (PKC) α üzerinden aktin liflerini birbirine bağlar ve sıkı bileşkelerin fonksiyonunu düzenler. Değişik etkilerle zonulin sıkı bileşkelerden ayrıldığında hücrelerin arası hızlı ve geri dönüşümlü bir şekilde açılır (Şekil 3) [10, 15, 16].

Zonulin etki mekanizması



Şekil 3. Zonulinin etki mekanizmasının şematik gösterimi.

(A) Dinlenme hali: Dinlenme halinde sıkı bileşke proteinleri, protein-protein etkileşimleri içerisinde. Bu durumda sıkı bileşke kapanarak kararlı hale geçer. Sıkı bileşke ağ örgüsünün yapısı elektron mikroskobu ile elde edilen fotoğrafta gösterilmiştir.

(B) Zonulin yolağının aktivasyonundan sonra: Zonulin, proteinaz ile aktive olan reseptör 2 (PAR2) aracılığıyla epidermal büyüme hormonu reseptörünü (EGFR) transaktif eder (1). Daha sonra salınan EGFR, fosfatidil inositolü (PPI) (3) hidrolize eden fosfolipaz C'yi (2) aktive eder ve inositol 1, 4, 5 trifosfasfatı, diaçilgliserolün (DAG) (4) salınmasını sağlar. Protein kinaz C (PKC) (5), direkt olarak DAG aracılığıyla veya IP-3 aracılığıyla intraselüler Ca^{+2} salınımı ile aktive olur (4a). Membran ilişkili aktive PKC (6), zonula okludens (ZO-1) ve miyozin 1C'yi içeren hedef protein(ler)i ve de F-aktin'deki çözünabilir G-aktinin polimerizasyonunu katalize eder (7). Sıkı bileşke protein fosforilasyonu ve aktin polimerizasyonunun kombinasyonu aktin filamentlerinin yeniden düzenlenmesine ve sonrasında da proteinlerin (ZO-1'de dahil olmak üzere) kompleksden çıkmasına neden olur (8). Sonuç olarak sıkı bileşke gevşer, zonulin sinyali sona erdiğinde sıkı bileşke kararlı hal durumuna geri döner. Fasano, A., *Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2012. 10(10): p. 1096-1100. [9]

Bağırsak lümeninde zonulin salınımını uyaran pek çok potansiyel tetikleyici olabilir. Bunlardan en iyi bilinenler bakteriler ve glütendir [9]. Bakterilere maruz kalan ince bağırsak zonulin salgılamaktadır. Bu sekresyon mikroorganizmanın cinsi veya virülansından bağımsızdır ve sadece ince bağırsak mukozası ile bakterinin teması ile ilişkilidir. Bu temas ile zonulinin sıkı bileşke kompleksinden ayrılması ile bağırsak geçirgenliğinin artışı gerçekleşir. Hücreler arası yolun açılması ile bakteriyel geçiş gerçekleşir ve doğal immün sistem tarafından bir yanıt oluşturulur [9].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda rastlantısal olarak, buğdayın temel hammaddesi olan gliadinin de bakteriler gibi davranarak zonulin salınımını uyardığı fark edilmiştir. Fizyolojik koşullarda sıkı bileşkeler glüten gibi büyük yapıli maddelerin geçişine izin vermez. Genetik olarak duyarlı kişilerde, ince bağırsak mukozasının gliadinle karşılaşması sonrası zonulin bağlantılı olduğu sıkı bileşkeden ayrılır ve bağırsak geçirgenliği artar. Gliadinin bu etkisinin kemokin reseptörleri olan CXCR3 üzerinden olduğu düşünülmektedir [17]. Çölyak hastalarında bağırsak lümeninde CXCR3 ekspresyonu artmıştır. Hücreler arası alandan bağırsak mukozasına geçen gliadine karşı gelişen otoimmün yanıt ile Çölyak hastalığı oluşur [14, 18].

2.4. Bağırsak Geçirgenliği ve İlişkili Hastalıklar

Bağırsak geçirgenliğinde bozulma ile ilişkilendirilen pek çok GİS ve GİS dışı hastalık bildirilmiştir (Tablo1). Bu hastalıkların çoğu otoimmün hastalıklardır. Otoimmün hastalıkların patogenezi, genetik olarak duyarlı bireyde bazı çevresel

tetikleyicilerle gelişen anormal immün yanıt olarak açıklanmaktadır. Bugün kabul gören bir görüş; geçirgenliği artmış bir bağırsaktan geçen antijenlerin otoimmün hastalığı tetikleyen önemli bir çevresel faktör olduğu yönündedir.

Normal koşullarda bağırsak bariyerinde antijenlerin hücreler arası alandan geçişi sıkı bileşkeler tarafından engellenir. Sıkı bileşke sisteminin bütünlüğü, erken doğum, radyasyona maruz kalma, kemoterapi ve toksinler gibi etmenlerle bozulduğu zaman makromoleküllerin bağırsaktan geçişi artmaktadır. Lümeninden submukozaya geçen antijenler mukozal immün sisteme sunulmaktadır. Bu yabancı antijenlere karşı gelişen immün yanıtta; antijen sunucu hücreler (APC), T ve B lenfositler, doğal öldürücü hücreler (natural killer-NK), ve plazma hücreleri ve doku uygunluk kompleksi (major histocompatibility complex-MHC) gibi özgül hücreler rol oynamaktadır [15]. Eğer kişi otoimmün hastalığa yatkın HLA (insan lökosit antijeni- human leukocyte antigens) tiplerini taşıyorsa gelişen immün yanıt tolerans yönünde olmayıp, çoklu organları hedef alan immün yanıt yani otoimmünite lehine olmaktadır [10]. Sonuç olarak son yıllarda otoimmün hastalıkların patogenezinde bozulmuş bağırsak bariyerinin önemi üzerinde fazlaca durulmaya başlanmıştır. Bu yaklaşımın ardından bağırsak geçirgenlik bozukluğunu/artışını gösterecek belirteçler üzerine çalışmalar yapılmış ve zonulin bu belirteçler arasında araştırılan bir biyo belirteç olmuştur. Bağırsak bariyeri bozukluğu ile ilişkilendirilen hastalıklar ve zonulinin rolü aşağıda biraz daha ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

2.4.1. Çölyak hastalığı

Çölyak hastalığı otoimmün hastalık için güzel bir modeldir. HLA genleri ile yakından ilişkili olup; çevresel tetikleyici gliadindir ve doku transglutaminaza karşı oldukça özel otoantikolar gelişir. Çölyak hastalığının gelişiminin erken evrelerinde, gliadinin tetiklemesi ile zonulin artışı ve sonuçta sıkı bileşkelerin fonksiyon bozukluğu gelişir. Gliadin dâhil diğer antijenler submukozaya geçerek immün yanıtı başlatır. Glüten diyetten çıkarıldığında zonulin düzeyi düşer ve bağırsak bariyeri normal fonksiyonlarına döner [1, 14, 19].

2.4.2. İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH)

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), etiyolojisinde çevresel, immünolojik ve genetik faktörlerin yer aldığı gastrointestinal sistemin süreğen yangısı olarak tanımlanır. Crohn hastalığı, ülseratif kolit ve sınıflandırılmayan kolit olmak üzere üç biçimde karşımıza çıkmaktadır [20]. Bu hastalıkların patogeneğinde bağırsak geçirgenliği artışı olduğuna dair bilgiler birikmektedir. Bağırsak geçirgenliği bozukluğu bu hastaların birinci derece yakınlarında da gösterilmiştir. İBH'li hastalarda bağırsak mikroorganizma topluluğunda *Enterobacteriaceae* lehine bir artış vardır ve bağırsak mikroorganizmaları sağlıklı kişilere göre enterositlere daha fazla yapışırlar. Mikrobiyataya karşı verilecek cevapta ve antimikrobial peptidlerin salınımında genetik faktörlerin önemi vardır. İBH hastalarında antimikrobial peptidlerin salınımında bozukluk vardır. Antimikrobial peptid eksikliği ve bahsedilen mikroflora değişiklikleri sebebiyle tetiklenen immün yanıt ve salınan sitokinler bağırsak geçirgenliğinin artışına neden olur [2, 21].

2.4.3. Tip 1 diyabetes mellitus (DM)

Diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi özellikle gelişmiş ülkelerde tip 1 DM'nin sıklığı artmaktadır. Bu artışın nedenleri konusunda çevresel faktörler üzerinde durulmakta; çeşitli mikrobik ve gıda bileşenlerinin bağırsak bariyer işlevini bozması gibi teoriler tartışılmaktadır. Son zamanlarda yapılan hasta ve hayvan modeli çalışmalarda mikrobiyaya dengesizliği nedeniyle gelişen bağırsak bariyer bozukluğunun hastalığın klinik bulguları gelişmeden başladığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda diyabet başlamadan 2-3 hafta önce zonulin bağımlı bağırsak geçirgenliği artışı gösterilmiş ve bu hayvanlara verilen zonulin inhibitörleri ile diyabet gelişimi %70 oranında azaltılmıştır [22-24].

2.4.4. Atopi ve alerjik hastalıklar

Sağlıklı bir mukozal bariyer bakteri, antijen ve toksinlerin vücuda girişini engeller. IgA eksikliği, erken doğum, bağırsak enfeksiyonları ve yenidoğan dönemindeki beslenme türü bağırsak geçirgenliğinde artışa neden olur [25]. Bağırsak geçirgenliğinin bozulması ile lümendeki antijenler submukoza tabakasına taşınarak bağışıklık sistemini uyarırlar ve alerjik cevabın gelişimine neden olurlar [26].

2.4.5. Otizm spektrum bozukluğu

Otizm spektrum bozukluğu olan çocuklarda, toplumdaki diğer çocuklara göre mide bağırsak ilişkili yakınmaların görülme sıklığı ve şiddeti fazladır. Bu durumun nedenine yönelik çalışmalar yapılmış olsa da henüz bu konuda bir netlik

bulunmamaktadır. Bazı çalışmalarla bu olgularda bağırsak mikrobiyaya değişiklikleri olduğu ve bu yolla mukozal bağışıklık cevabının uyarıldığı gösterilmiştir. Bu olguların ve birinci derece akrabalarının da sağlıklı toplumdan farklı olarak bağırsak geçirgenliklerinin arttığı bulunmuştur. Normal diyet tüketen OSB olguları ile gluten veya kazein kısıtlı diyet yapan olgular arasında da bağırsak geçirgenlik farklılıkları bildirilmiştir. Bu bulgulara dayanılarak OSB etiopatogenezinde geçirgen bağırsak hipotezi ortaya atılmış ve bunun genetik olabileceği de öne sürülmüştür [27, 28].

Biz bu çalışmamızda bağırsak geçirgenliğini düzenleyen sıkı bileşke proteinlerinden biri olan zonulini çalışarak, OSB'li olan çocuklarda bağırsak geçirgenliğinin artışı konusunda veri elde etmeyi amaçladık. Bu nedenle aşağıda OSB'den ve özellikle etiopatogenezinde bağırsak geçirgenliği artışı teorisinden biraz daha ayrıntılı olarak bahsedeceğiz.

2.5. Otizm Spektrum Bozukluğu

2.5.1. Tanım ve tarihsel gelişim

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), belirtileri erken çocukluk çağında başlayan, sosyal-iletişimsel alanda belirgin yetersizlikler, sınırlı, tekrarlayıcı davranışlar ve ilgi alanları ile seyreden bir bozukluktur [29]. İlk olarak 'otizm' terimi Bleuler tarafından belirtilmiştir. Daha sonra 1943 yılında Leo Kanner, insanlarla ilişki kurma güçlüğü, zamirlerin tersten söylenmesi, tekrarlayıcı ve amaçsız davranışlar, ekolali ve değişime direnç belirtilerini bildirerek 'infantil otizm' den bahsetmiştir. Uzun yıllar otizmin, şizofreninin yaşamın erken

döneminde başlayan farklı bir formu olduğu düşünülmüştür. Ancak 1970’li yıllarda bebeklik döneminde başlayan bu ağır bozukluğun, ileri çocukluk yıllarında ya da ergenlikte başlayan psikozlardan farklı tablolar olduğu anlaşılmıştır. ‘Otizm Spektrum Bozuklukları’ ifadesi ilk kez 1979 yılında Wing ve Gould tarafından kullanmış ve üç temel alanda (sosyal karşılıklılık, iletişim, sınırlı ilgi alanı veya tekrarlayıcı davranışlar) yer alan belirtilerin birçok farklı şekillerde ve her birinin değişen şiddette ortaya çıkabileceğini belirtmişlerdir.

Amerikan Psikiyatri Birliği’nin DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı) sınıflandırması üzerinde çalışmaları uzun yıllara dayanmaktadır. Otizm 1943 yılında tanımlanmasına rağmen sisteme ilk girişi 1980 yılında olmuştur. 1994 yılında DSM-IV ve ICD 10 (International Classification of Diseases- Hastalıkların Uluslararası Sınıflandırılması) tanı ölçütleri düzenlenerek otizmde daha standart bir değerlendirme yapılmasına olanak sağlanmıştır. Amerikan Psikiyatri Birliği DSM-III içinde yaygın gelişimsel bozukluk (YGB) başlığı altında; erken bebeklik otizmi, çocukluk çağı başlangıçlı yaygın gelişimsel bozukluk ve atipik yaygın gelişimsel bozukluk şeklinde sınıflandırılmıştır. DSM-III-R’da revize edilerek YGB başlığı altında otistik bozukluk (OB) ve başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk (BTA-YGB) olarak iki ayrı grup yer almıştır [30]. DSM-IV tanı ölçütlerine göre yaygın gelişimsel bozukluk olarak da bilinen otizm spektrum bozuklukları kapsamında beş ayrı hastalık yer almıştır; Otistik bozukluk, Asperger sendromu, atipik otizm (başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk BTA-YGB), dezintegratif bozukluk ve Rett sendromu [31].

En son DSM-V’ te (Mayıs 2013) n roge işimsel bozukluğun adı ‘yaygın ge işimsel bozukluk’ yerine ‘otizm spektrum bozukluğu’ olarak değiştirilmiştir. Rett sendromu otizm spektrum bozukluğu başlığı altından çıkarılarak diğer dört grup; otistik bozukluk, Asperger sendromu, dezintegratif bozukluk ve atipik otizm olarak düzenlenmiştir. DSM-V e göre otizm spektrum bozukluklarının tanı  l  tleri Tablo 1’de gösterilmektedir.



Tablo 1. DSM V Otizm Spektrum Bozuklukları Tanı Ölçütleri

(Association, A.P., Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®).
2013: American Psychiatric Pub.) [29]

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

2.5.2. Epidemiyolojisi

Son yıllarda OSB görülme sıklığında dramatik bir artış görülmüştür. Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) tarafından OSB prevalansı 2009 yılında 1/110, 2012'de 1/88 olarak bildirilmişken, 2014 yılında her 64 çocuktan bir tanesinin otizm tanısı aldığı tespit edilmiştir [32]. Yakın zamanda Güney Kore'de 7-12 yaş arası 55 bin çocuğun değerlendirildiği bir çalışmada OSB sıklığı %2,64 iken erkeklerde %3,74, kızlarda ise %1,72 olarak tespit edilmiştir [33]. Amerikan pediatri cemiyeti tarafından 18 ve 24-30 aylık çocukların OSB açısından rutin nörolojik gelişiminin değerlendirilmesini önermektedir [34].

2.5.3. Etiyoloji

Son zamanlarda OSB olguları üzerinde yapılan çalışmalar, genetik olarak yatkın bireyde bağırsak mikrobiyatası, bağırsak geçirgenlik artışı, uygunsuz immün yanıt ve özel metabolik yolların aktivasyonu ile davranışsal değişikliklerin ortaya çıktığını destekler niteliktedir.

Genetik açıdan çok faktörlü genetik kalıtım modeli üzerinde durulmaktadır. Örneğin ikiz çocuklar üzerinde yapılan çalışmalarda tek yumurta ikizlerinde benzer durum oranı %60-90 iken çift yumurta ikizlerinde %3-10 olarak saptanmıştır. Otizmlili hastaların kardeşlerinde OSB görülme sıklığı %2-6 olarak bildirilmiştir [31].

Otistik çocukların anne babalarının, sağlam çocukların anne babalarına göre ruhsal ve davranışsal olarak farklılıklar gösterdikleri bilinmektedir. Bu anne babaların çoğunlukla obsesif kişilik özelliklerine sahip ve çocukları ile yeterince

duygusal ilişki kuramayan, donuk bir ruhsal yapıya sahip kişiler oldukları; özellikle babalarının şizofrenik kişilik özellikleri taşıdıklarını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır [31].

OSB olgularında yapılan bazı çalışmalarda C4B geni, B44-C30-DR4, DRP1 alelinin çok değişken bölgeleri ve HLA-A2 alelleri şüpheli genler olarak gösterilmiştir. İlginçtir ki; bu aleller ve haplotipler otoimmün hastalıklarla benzerlik göstermektedir. Bir diğer önemli fonksiyonel polimorfizm de, OSB'lerin ailelerinde bulunan ve immün regülasyon ve nörogelişimde önemli rol oynayan, MET reseptör tirozin kinazı kodlayan genlerinde kopyalanırken olan kırılmalardır [35, 36].

Çevresel faktörlerin de OSB etiyojisinde rolü olduğu düşünülmektedir. Zararlı etmenlere maruz kalma, perinatal olaylar, ileri baba yaşı, intrauterin enfeksiyonlar ve prenatal enfeksiyonlar, talidomid gibi bazı ilaçlar, cıva başta olmak üzere ağır metaller, zararlı madde (kadmiyum, vinil klorid, trikloroetilen vb.) solunması, tarımda kullanılan böcek ilaçları ve D vitamini eksikliği, immün yanıt bozuklukları etiyojide tartışılan nedenlerdendir [31, 37, 38]. Önceleri Kızamık-Kızamıkçık-Kabakulak (KKK) aşısı etiyojide suçlanmaktayken; 2015 yılında Japonya'da 189 OSB ve 224 kontrol grubu ile yapılan çalışmada aşı ile OSB gelişimi arasında anlamlı ilişki bulunmadığı gösterilmiştir [39].

OSB olgularında ve ailelerinde otoimmünite öyküsü dikkat çekmektedir. OSB'li çocuklar ve annelerinde santral sinir sistemi proteinlerine karşı otoantikor varlığı bildirilmiştir. Ayrıca gastrointestinal yakınmaları olan OSB olgularında bağırsak epiteli bazal membranına bağlanan otoantikorların sonucunda bağırsakta

yaygın inflamasyon oluřtuđu bildirilmiřtir. Bu bulgular hastalıđın otoimmün dođası olabileceđi dűřüncelerini dođurmuřtur [40].

2.5.4. Etiyopatogeneez

OSB olan çocuklar da gastrointestinal problemlerin görölme oranı %23-70 arasında değişmektedir. Bu belirtilerin nedeni net olarak bilinmemekle birlikte, OSB'nin şiddeti ile ilişkili olduğu gözlenmiştir [41]. Gastrointestinal bulgular, OSB olan bireylerde hayat kalitesini etkileyen en önemli sorunlardan biridir. OSB olan çocuklar ve onların etkilenmemiş kardeşleri karşılaştırıldığında kabızlık ve ishal şikâyetlerinin etkilenmiş çocuklarda daha sık olduğu gösterilmiştir [42]. Bu bulguların varlığında OSB olan hastaların huzursuzluk, kendi kendine zarar verme, sinirlilik gibi davranışsal sorunlar sergilediği tespit edilmiştir [43]. OSB olan çocuklarda GİS belirtilerinin varlığı bağırsak-beyin aksında olan değişikliklerin yani genom, gastrointestinal, mikrobiyom ilişkisinin hastalığın patogenezinde yeri olabileceği fikrini doğurmuştur.

GİS kendi sinir ağına sahiptir ve GİS'in motilite ve mukozal sekresyonlar gibi fonksiyonları bu sinir ağı ile düzenlenir. Beyin – bağırsak aksı iki yönlü bir yoldur. Örneğin; doygunluk hissi bağırsaktan beyne iletilirken, stres ve sıkıntı bağırsak motilitesini ve duyarlılığını etkiler [44]. Serotonin (5-HT) reseptörlerinin büyük kısmı bağırsakta bulunur ve GİS işlevleri için kritik öneme sahiptir. Son çalışmalarda 5-HT'nin bağırsak mukozasında inflamasyon öncüsü modölätör olarak da görev yaptığı ispatlanmış, insan ve hayvan çalışmaları 5-HT salınım bozuklukları çeşitli GİS hastalıklarının gelişiminde önemli bulunmuştur [45, 46].

Steril bağırsağı olan farelerde yapılan çalışmalarla bu farelere inoküle edilen özel bakteriler ve probiyotik bağırsak bakterileri ile beyin fonksiyonları ve davranışsal değişiklikler oluşturulabilmiştir. Bu bulgular beyin bağırsak aksında bağırsak mikrobiyotasının önemine dikkat çekmiştir [47].

Ortalama normal bir insan bağırsağında yaklaşık 1 kilogram bakteri bulunmaktadır ve bu da yaklaşık 9,9 milyon bakteri geni içermektedir. Konakçı DNA'sının mikrobiyata DNA'sına oranı 1:10 civarındadır [48]. Son birkaç yıldır özellikle mikrobiyata ile ilgili bildiklerimiz çok ciddi düzeyde artış göstermiştir. Önceden bildiğimiz intrauterin çevrede bakteri yaşamaz önergesi son zamanlarda yapılan çalışmalarla doğruluğunu yitirmiş olup; aslında plasenta ve amniyon sıvısının dahi kendi bakteriyel ortamına sahip olduğu gösterilmiştir. Yenidoğanın gastrointestinal sisteminin annenin vajen, anüs ve cilt mikrobiyatası ile kolonize olduğu ve doğum sonrası süreçte mevcut maruziyetin devam ettiği gösterilmiştir. İnsan ve hayvan modelli çalışmalarda yenidoğanın bağırsak mikrobiyal çeşitliliğinin oluşmasında, anneye ait faktörler, örneğin annenin gebelik sürecindeki beslenmesi, doğum şekli, doğum sonrasında anne sütüyle beslenmesi ve kullandığı antibiyotiklerin etkili olduğu gösterilmiştir [47]. Normal vajinal yolla doğan çocuklarla sezaryen ile doğan çocuklar arasında mikrobiyata farklılıkları olmasından dolayı sezaryen doğumun OSB gelişmesinde risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. Doğum sonrasında en az 6 ay anne sütü ile beslenmenin OSB gelişmesinde düşük risk oluşturduğu saptanmıştır [47].

Son 50 yılda özellikle kronik otoimmün hastalıklar ve beyin hastalıklarında artış görülmesi batı tipi diyet, ilaçlar ve hijyen koşullarındaki düzelme gibi faktörler

nedeniyle değişen bağırsak mikrobiatası ile ilişkilendirilmiştir. Bu konu ile ilişkilendirilen hastalıklar içinde OSB grubu da yer almaktadır. OSB grubunda yararı olduğu iddia edilen glütensiz ve kazeinsiz diyetlerin, beyindeki ve bağırsak geçirgenliği üzerindeki etkilerinin, bağırsak mikrobiota değişikliği oluşturarak gerçekleştiği düşünülmektedir [40].

Farelerle yapılan bir çalışmada annenin gebeliğinde yüksek yağlı beslenmesinin ve antibiyotik kullanmasının bağırsakta normalde var olan bakteriyel ortamın bozulmasını tetikleyerek otizm benzeri fenotip ortaya çıkardığı ve bu değişimin *Lactobasilus reuteri* ile düzeldiği görölmüştür. [49].

Daha önce belirtildiği gibi mikrobiyata da oluşan değişiklikler ve bağırsak bariyeri bozukluğu ile bağırsak geçirgenliğinin artması; bazı bakteri ve toksinlerinin, makromoleküllerin lümeninden submukozaya geçişi ve immün reaksiyonların tetiklenmesi ile sonuçlanır [40]. Bu durum aşırı geçirgen bağırsak sendromu olarak adlandırılmaktadır. Aşırı geçirgen bağırsak sendromunda, hastalarda gastrointestinal sistem ve gastrointestinal sistem dışı yakınma ve belirtiler görülür. Etiyopatogenezinde aşırı geçirgen bağırsak sendromu olduğu tartışılan pek çok hastalık vardır ve bunların çoğu otoimmün hastalıktır. Bu hastalıklar içinde OSB da sayılmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Aşırı geçirgen bağırsak sendromunun ilişkili olduğu hastalıklar ve belirtileri

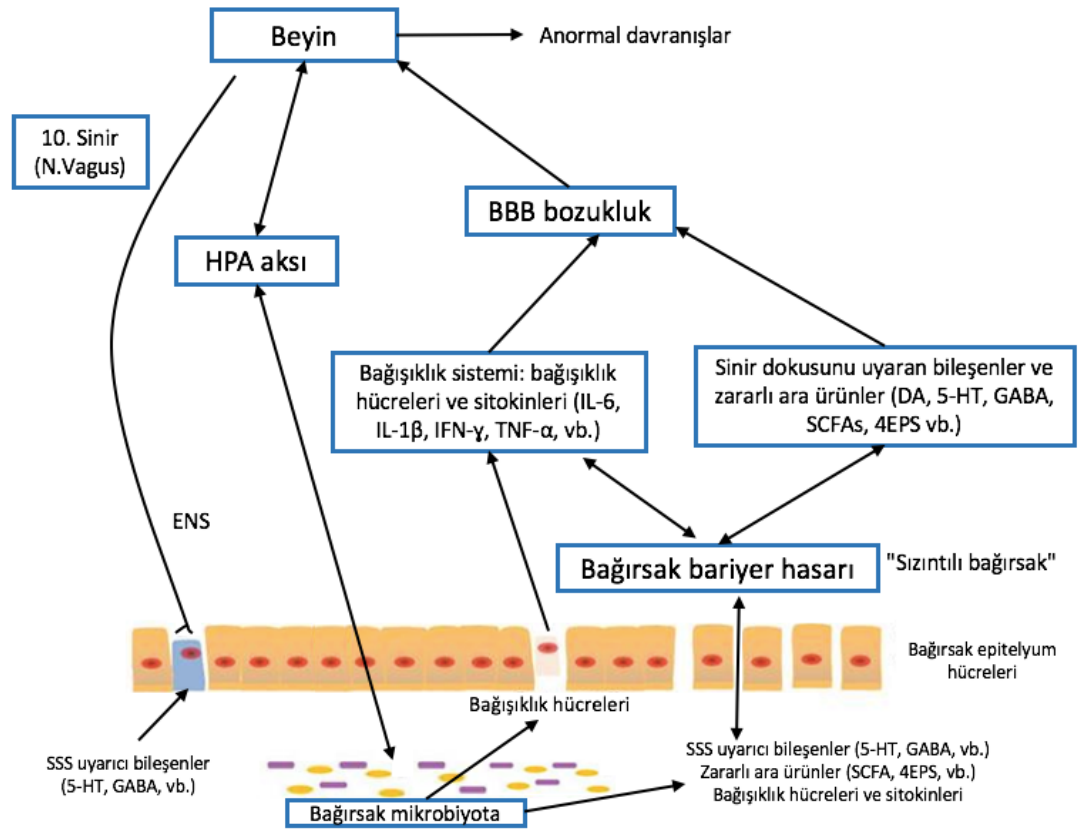
BELİRTİLER	HASTALIKLAR
Karın şişliği	Asit reflü
Karın ağrısı	Artrit
Geğirme	Astım
Kabızlık	Otizm spektrum bozukluğu
Gaz	Otoimmün hastalıklar
İshal	Bronşiolit
Egzama	Çölyak hastalığı
Ateş	Kronik sinüzit
Kas ağrısı	Kronik yorgunluk sendromu
Baş ağrısı	Crohn hastalığı
Eklem ağrısı	Ülseratif kolit
Kilo alımı	Depresyon
Kilo kaybı	Dermatit
Sıcak basması	Tip 1 ve Tip 2 Diabetes Mellitus
Duygu-durum değişkenlikleri	Besin duyarlılığı- besin alerjisi
Sinirlilik hali	Hashimato hastalığı
Saldırgan davranışlar	Kısırlık
Huzursuzluk	İnflamatuvar bağırsak hastalığı
Fikir uçuşması	Uykusuzluk
Yorgunluk ve tükenmişlik	Hassas bağırsak hastalığı
	Migren
	Obezite
	Osteoporoz
	Tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonları
	Multiple skleroz
	Bakteri/mantar aşırı çoğalması

Bağırsak geçirgenliğinin artışı ile OSB bulgularının ilişkisi açısından öngörülen mekanizmalar aşağıda özetlenmiştir.

Bakteriler tarafından oluşturulan sinir sistemi uyarıcıları (5-HT ve GABA), zararlı bileşenler (serbest aminoasitler (FAA), kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) ve fenol bileşenleri) geçirgenliği artan epitelden submukozaya alınır. Böylece uyarılan immün yanıt ile sitokin salınımı (İnterlökin (IL) 1 β , IL-6, interferon- γ (IFN- γ) ve TNF- α (tümör nekroz faktör- α), IL-12, IL-8) gerçekleşir. Bu zararlı bileşenler ve sitokinler kan beyin bariyerini geçmektedir [47]. Sitokinler vagal sinir sistemini uyarak santral sinir sistemini etkiler. Örneği 5-hidroksitriptamin (5-HT) düzeyi artıp, 5- hidroksiindolasetik asit (5-HIAA) düzeyi azalır, bunun sonucu olarak sosyal iletişim kurma becerisinde azalma olurken tekrarlayıcı hareketlerin ortaya çıkmasında artış olmaktadır (Şekil 4). Kandaki serotonin (5-HT) artışı, OSB da ilk keşfedilen biyo-belirteç olma özelliğini taşımaktadır. Serotoninin, nöronal geçirgenliği artırarak hayvanlarda sosyal davranış anormallikleri, iletişim kurmada sıkıntı ve tekrarlayıcı davranışlar yaptığı gösterilmiştir [47].

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarla vagus uyarılması ile prefrontal kortekste dopaminerjik aktivitenin azaldığı ve nöroendokrin sisteminin aktifleştiği görülmüştür [50]. Ek olarak vagus sinir uyarısı ile sinir dokusunda dopamin (DA), 5-HT, γ -aminobütirik asit (GABA) ve histamin üzerinde merkezi nöronların uyarılmasında değişiklikler gösterilmiştir [51]. Hayvan deneyli bir başka çalışmada bakteri içermeyen bağırsakta dopamin, noradrenalin, 5-HT düzeylerinde ve kortikosteron miktarında artış olurken; kolon A ile indüklenen sinir büyüme faktörü, beyin kaynaklı nörotrofik faktör miktarının azalma gösterdiği ve anksiyetik

davranışlarda artış olduğu gözlenmiştir [47, 52, 53]. Antibiyotik kullanımı sonucu bağırsak florasındaki bozulmanın farelerde öğrenme bozukluğu yaptığı ve depresyon benzeri davranışlarda artışa neden olduğu görülmüştür. Ayrıca 5-HT, 5-HIAA, noradrenalin, dopamin ve homovalinik asit gibi sinir sistemi uyaranlarının düzeyinde, glukokortikoid reseptörlerinin ve kortikotropin salgılayan hormon reseptörü-1 sayısında değişimler olduğu saptanmıştır [54].



Şekil 4. Otizm spektrum bozukluğunda beyin-bağırsak aksı.

(4-EPS, 4-etilfenil sülfat; 5-HT, serotonin; HPA, hipotalamus-pitüiter-adrenal; SCFAs, kısa zincirli yağ asitleri; BBB, kan-beyin bariyeri; GABA, γ -aminobütirik asit; DA, dopamin; ENS, enterik sinir sistemi) (Li, Q., et al., The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2017. 11.) [47]

Bütün bu karmaşık mekanizmalar ışığında, genetik yatkınlığı olan çocuklarda bağırsak geçirgenliğinin artması sonucu OSB spektrumu hastalıkların karşımıza çıkabileceği düşünülmektedir. Bu açıdan OSB'li çocuklarda bağırsak geçirgenliğinde artış olup olmadığını inceleyen çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalarda genellikle laktüloz/mannitol emilim testleri kullanılmıştır. Bağırsak geçirgenliği artışı olduğu düşünülen OSB dışı otoimmün hastalıklarda bağırsak geçirgenliğini şeker emilim testleri yanında serum zonulin düzeyini kullanarak araştıran çalışmalar vardır ancak OSB grubunda yapılmış sadece bir zonulin çalışması mevcuttur. Bu çalışma, biz çalışmamızı yürütürken 2017 yılında yayınlanmış olup; OSB'li çocukların serum zonulin düzeyi, sağlıklı çocuklardan belirgin olarak yüksek bulunmuştur [55].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Grubu

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Ağustos 2016- Eylül 2017 tarihleri arasında yürütülmüştür. Hasta grubunu Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları polikliniğine başvuran, iki ayrı çocuk psikiyatristi tarafından DSM 5 tanı ölçütleri esas alınarak OSB tanısı konulan ve çalışmaya alınma kriterlerini sağlayan 0-18 yaş aralığında 56 çocuk oluşturmuştur. Kontrol grubunu Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Anabilim Dalı'nın Genel Çocuk Polikliniğine gelen ve çalışmaya alınma kriterlerine uygun, hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyette 55 gönüllü oluşturmuştur. Anne babalara ve gönüllü hastalara ekte sunulan bilgilendirme formu okutulup onam alınmıştır.

Çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 13.06.2016 tarihli oturumunda alınan onay ile yürütülmüştür (Onay No: 25901600-292). Çalışmanın finansal kaynağını Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Ofisi tarafından 2017 yılında sağlamıştır.

- **Hasta grubunda çalışmaya dâhil edilme kriterleri**

DSM-5 tanı kriterlerine göre OSB tanısı konmuş 0-18 yaş arasındaki olgular

- **Hasta grubunda dışlanma kriterleri**

1. Bilinen akut ve kronik gastrointestinal hastalık tanısı olan olgular
2. Son 1 yıl içinde glütensiz ve/veya kazeinsiz diyet uygulamış olgular

3. Nörolojik veya metabolik ek hastalığı olan olgular
4. Alerjik, inflamatuvar ve otoimmün hastalık tanısı olan olgular
5. Obez olgular

- **Kontrol grubunda çalışmaya dâhil edilme kriterleri**

1. DSM-5 tanı kriterlerine göre herhangi bir psikiyatrik rahatsızlığı bulunmayan 0-18 yaş arasındaki çocuklar,
2. Gönüllü olmak

- **Kontrol Grubunda Dışlanma Kriterleri**

1. Bilinen akut ve kronik gastrointestinal hastalık tanısı olan olgular
2. Son 1 yıl içinde glütensiz ve/veya kazeinsiz diyet uygulamış olgular
3. Nörolojik veya metabolik ek hastalığı olan olgular
4. Alerjik, inflamatuvar ve otoimmün hastalık tanısı olan olgular
5. Obez olgular

Başvuru sırasında hastaların sistem sorgusu ve fizik muayeneleri aynı çocuk sağlığı ve hastalıkları araştırma görevlisi tarafından yapılmıştır. Çalışmaya katılan bireylerde total IgA, anti-doku transglutaminaz IgA, 3 yaş ve altındakilere anti doku transglutaminaz A'ya ek olarak anti-gliadin IgA antikorları bakılmıştır. IgA eksikliği olanlar için IgG yapısındaki antikorların bakılması planlanmıştır. Çölyak antikor pozitifliği saptanan olgular çalışmaya dâhil edilmemiştir. Beden kitle indeksi (BKİ), Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) büyüme referansları kullanılarak kendi yaş ve cinsiyetlerine göre değerlendirilmiş ve Z skoru +2 SD üzerinde (obez) ve -2 SD'nin altında (malnütre) olan hastalar çalışmaya dâhil edilmemiştir [56]. Çalışmaya kabul edilen OSB'li çocuklara, anne babaların yardımıyla Ek 4'teki

gastrointestinal belirti değerlendirme anketi (GBDA) uygulanmıştır [57]. Kontrol grubu GİS yakınması olmayan olgulardan seçildiği için bu gruba anket uygulanmamıştır. Anket, her sorunun ayrı birer alt leği bulunan toplamda 15 sorundan oluşmaktadır. Her soru 0 ile 3 arasında puanlama ile derecelendirilmektedir. Burada ocuğun yaşına göre normal olarak değerlendirilen belirtiler için 0, normalden en çok sapan belirtiler içinse 3 puan verilmektedir. Ankette en düşük 0, en yüksek 45 puan alınmaktadır. Ankette hastanın huzursuzluk, karın ağrısı, mide yanması, reflü, bulantı-kusma, karında guruldama, şişkinlik, gaz çıkarma, geğirme belirtileri, dışkılama sıklığı, dışkının kıvamı, acil dışkılama ihtiyaı ve yetersiz boşaltım hissi sorgulanmıştır. Anket soruları kendi içinde genel belirtiler, alt GİS ve st GİS belirtileri olmak zerek 3 gruba ayrılarak tekrar değerlendirilmiştir.

- Genel belirtiler: Huzursuzluk, karın ağrısı, karında şişkinlik ve karında guruldama
- st GİS belirtileri: Geğirme, mide yanması, reflü, bulantı/kusma
- Alt GİS belirtileri: Gaz, artmış/azalmış dışkılama sıklığı, dışkı kıvamı, acil dışkılama ihtiyaı ve yetersiz boşaltım hissi

Alt gruplarda olguların aldığı puanların ortancası hesaplanarak, ortancanın üstünde ve altında puan alan olgular ek değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

3.1.1. Biyokimyasal analiz yöntemi

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubunda her olgudan, serum zonulin düzeyi tayini için 5 ml kan örneği alınarak 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Her iki gruba ait serumlar hemen ayrılarak, iki eppendorf tüp içinde çalışma gününe kadar -80 C de derin dondurucuda saklandı.

Anti-doku transglutaminaz IgG ve IgA, insan ELISA (Euroimmune, GmbH, Lubeck, Germany) kiti kullanılarak çalışıldı. Kitler +2°C - +8°C saklandı. Anti-doku transglutaminaz IgA ve IgG için kabul edilen pozitif sonuç cut-off değeri 20 RU/ml olarak alındı. Total serum IgA düzeyi nefelometrik olarak (Dade Behring, Marburg/Germany) çalışıldı. Serum total IgA düzeyi 0,05 g/L altında saptanan olgular selektif IgA eksikliği olarak kabul edildi. Lipemik ve hemolizli serumlar çalışmaya alınmadı.

3.1.2. Serum zonulin tayini

Serum zonulin düzeyleri “Human zonulin ELISA” (EASTBIOPHARM, Hangzhou Eastbiopharm Co. Ltd.Çin Lot No:20170421) kiti kullanılarak “sandwich enzyme-linked immune sorbent assay” (ELISA) yöntemi ile tayin edildi. “Sandwich” ELISA yöntemi prensibinde; öncelikle monoklonal antikorlarla kaplı reaksiyon plağına numunelerdeki ölçülecek zonulin bağlanmakta ve daha sonra zonulin, ortama eklenen biotin işaretli anti-zonulin antikorları ile birleşmektedir. Son olarak ortama eklenen Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase) ile immün kompleks oluşturulur. Daha sonra eklenen kromojenik solüsyon ile enzim etkileşimi sonucunda oluşan rengin şiddeti ölçülerek çalışma

tamamlanır. Oluşan rengin şiddeti, ortamdaki zonulin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Numunelerdeki zonulin konsantrasyonu standart eğri yardımıyla hesaplanarak ng/ml olarak değerlendirilmiştir.

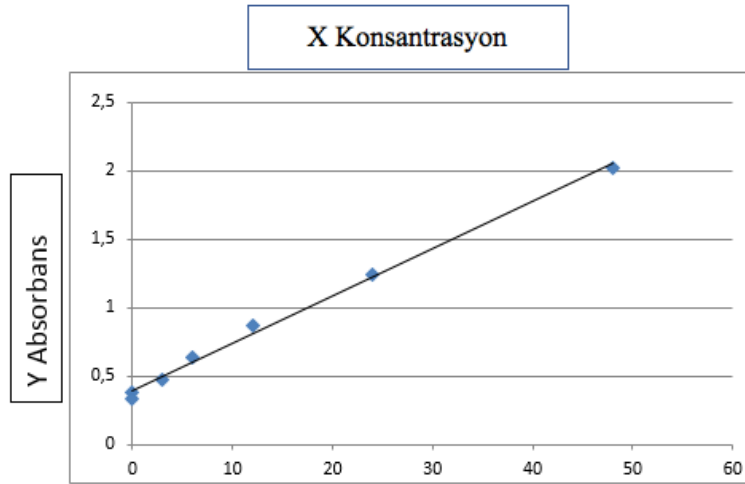
Çalışma prosedürü:

1. Zonulin standardı standart dilüenti ile dilüe edilerek 48 ng/ml, 24 ng/ml, 12 ng/ml, 6 ng/ml, 3 ng/ml, konsantrasyonlarında zonulin çalışma standartları hazırlanır.
2. Standartlar (50 µl) ve serum örnekleri (40 µl) plate üzerinde kendileri için belirlenen zonulin spesifik antikor ile kaplanmış kuyucuklara eklenir. İki kuyucuk kör (blank) olarak kullanılır.
3. Numune kuyucuklarına 10 µl biotin ile konjuge edilmiş zonulin spesifik antikor eklenir.
4. Standart ve numunelere 50 µl Streptavidin bağlı enzim (Horseradish Peroxidase-HRP) eklenir.
5. Plate 37 C° de 1 saat inkübe edilir.
6. 1/30 dilüe edilmiş yıkama tampon solüsyonu ile tüm plate 5 kez 350 µl ile yıkanır.
7. Tüm kuyucuklara (blank dâhil) 50 µl kromojen solüsyonu A ardından 50 µl kromojen solüsyonu B eklenir. Kromojen solüsyonunun eklenmesinin ardından oluşan kompleksite (biotin ile konjuge antikor-zonulin-streptavidin HRP enzim kompleksi) renk değişimi olur ve kuyucukların rengi maviye döner.
8. Plate 37 C° de 10 dakika karanlıkta inkübe edilir.

9. Her kuyucuğa (blank dâhil) 50 µl stop solüsyonu eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Solüsyonun eklenmesiyle kuyucukların rengi sarıya döner.
10. Plate 450 nm’de plate okuyucuda (Bio Tek El 800 ELİSA okuyucusu) okutulur.
11. Standart eğri (Şekil 5) kullanılarak sonuçlar hesaplanır.

Microsoft Office 2010 Excel programı kullanılarak standart grafiği elde edilmiş ve hasta sonuçları bu grafik ile hesaplanarak sonuçlar ng/ml olarak değerlendirilmiştir.

KİT’ in ölçüm aralığı 0,3-90 ng/ml arasında olup duyarlılığı 0,13 ng/ml ‘dir. KİT’ in çalışma içi ve çalışmalar arası kesinliği sırasıyla CV<%10 ve CV<%12 olarak belirlenmiştir.



Şekil 5. Serum Zonulin standart grafiği

3.2. İstatistiksel Değerlendirme

Araştırma verisi “SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL)” aracılığıyla bilgisayar ortamına yüklendi ve değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma, ortanca (min-maks), frekans dağılımı ve yüzde olarak sunuldu. Standart dağılım örneğine uymayan örnekler için ortanca değeri kullanıldı. Kategorik değişkenlerin değerlendirmesinde Pearson Ki-Kare Testi uygulandı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk Testi) kullanılarak incelendi. Normal dağılıma uymadığı saptanan değişkenler için iki bağımsız grup arasındaki istatistiksel anlamlılıklarda Mann-Whitney U Testi, dört bağımsız grup arasında ise Kruskal Wallis Testi istatistiksel yöntem olarak kullanıldı. Normal dağılıma uyduğu saptanan değişken için ise iki bağımsız grup arasındaki istatistiksel anlamlılıkla Student's T Testi uygulandı. Değişkenler arasındaki ilişki Spearman Korelasyon Analizi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Araştırma kapsamında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Çocuk Ruh Sağlığı Polikliniğinde otizm spektrum bozukluğu (OSB) ile takip edilen 56 hasta ve 55 sağlıklı kontrol incelenmiştir.

Hasta grubunun yaş ortalaması $8,3 \pm 4,7$ (3-18) yıl olup %26,8'i (n=15) kız, %73,2'si (n=41) erkek olgudan oluşmaktadır. Kontrol grubunun yaş ortalaması $9,3 \pm 4,4$ (3-18) yıl olup %32,7'si (n=18) kız, %67,3'ü (n=37) ise erkek cinsiyetindedir. Yaş ve cinsiyet açısından iki grup arasında fark yoktur (Tablo 3).

Hasta grubunda boy uzunluğu ortalaması $127,3 \pm 25,1$ (82- 183) cm, vücut ağırlığı ortalaması $31,4 \pm 17,9$ (12-90) kg ve beden kitle indeksi (BKİ) ortalaması $17,7 \pm 3,3$ (13,4-27,8) kg/m^2 bulunmuştur. Kontrol grubunda boy uzunluğu ortalaması $142,3 \pm 22,31$ (90-180) cm, vücut ağırlığı ortalaması $38,4 \pm 17,29$ (12-82) kg ve beden kitle indeksi (BKİ) ortalaması $17,9 \pm 3,6$ (12,6-27,85) kg/m^2 dir. Her iki grubun boy, vücut ağırlığı ve BKİ Z skorları hesaplanmış olup, iki grup arasında yaş, cinsiyet, boy ve vücut ağırlığı Z skorlarında farklılık saptanmamış ancak BKİ Z skorları arasında fark bulunmuştur (Tablo 3). Hasta grubunun BKİ Z skoru kontrol grubundan yüksek olup, hasta grubunda %64,3 olgunun BKİ Z skorları [-2 SD]-[+1 SD] aralığında, %35,7 olguda ise [+1 SD]-[+2 SD] aralığında, kontrol grubunda bu oranlar sırası ile %83,6 ve %16,4 aralığında bulunmuştur.

Tablo 3. Olguların yaş, cins, boy Z skoru, ağırlık Z skoru ve BKİ Z skorları açısından karşılaştırılması

	OSB (n=56)	Kontrol (n=55)	p
	n (%)	n (%)	
Yaş (yıl)			
Ort±SD	8,3±4,7	9,3±4,4	
Ortanca(min-maks)	6,5 (3-18)	9,0 (3-18)	0,172*
Cinsiyet			
Erkek	41 (73,2)	37 (67,3)	
Kız	15 (26,8)	18 (32,7)	0,494**
Boy Uzunluğu (Z-skoru),			
Ort±SD	0,18±1,52	-0,16±1,6	
Ortanca(min-maks)	0,21 (-2,80;3,68)	-0,34(-2,56;2,34)	0,180*
Vücut Ağırlığı (Z-skoru),			
Ort±SD	0,27±1,26	-0,17±1,02	
Ortanca(min-maks)	0,36 (-2,90;3,28)	-0,10 (-2,31;1,85)	0,051*
BKİ-Z Skoru			
Ort±SD	0,38±1,13	-0,12±1,08	
Ortanca(min-maks)	0,47 (-1,89;2,00)	0,06 (-2,00;1,99)	0,013*

n: Hasta sayısı; %: Sütun yüzdesi; OSB: Otizm spektrum bozukluğu; BKİ: Beden kitle indeksi;
*Mann-Whitney U Testi; **Ki-Kare Testi

Hasta grubuna anne babalarının kontrolünde Gastrointestinal Belirti Değerlendirme Anketi (GBDA) uygulandı. OSB hastalarının gastrointestinal belirtileri gösterme oranları Tablo 4'te gösterilmektedir. OSB hastalarında en sık görülen gastrointestinal belirti, gaz iken (%85,7), en az görülen bulgu mide yanması olmuştur (%1,8) (Tablo 4).

Tablo 4. Hasta grubunda GİS belirtilerinin görülme sıklıkları

GİS Belirtileri (n=56)	n (%)
Huzursuzluk	44 (78,6)
Karın ağrısı	15 (26,8)
Mide yanması	1 (1,8)
Reflü	3 (5,4)
Bulantı/Kusma	3 (5,4)
Karında guruldama	13 (23,2)
Karında şişkinlik	25 (44,6)
Geğirme	26 (46,4)
Gaz	48 (85,7)
Kabızlık	22 (39,3)
İshal	25 (44,6)
Acil dışkılama	0
Yetersiz dışkılama	0

n: Hasta sayısı; %: Yüzde

OSB hastalarında GBDA uygulanırken anne babalara GİS huzursuzluk belirtisi sorulmuştur. OSB grubu çocuklarda huzursuzluk davranışsal olarak da sık görülen bir problemdir. Ailelerin bu soruyu davranışsal huzursuzluktan ayırmakta güçlük çektiği gözlemlenmiştir. Bu açıdan huzursuzluk belirtisinin diğer belirtilerle ilişkisi de değerlendirilmiş ve bu olgularda huzursuzluk şikâyetinin, ishal ve kabızlık ile anlamlı ilişkisi bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo 5. OSB hastalarında huzursuzluk belirtisinin diğer GİS belirtileri ile ilişkisinin değerlendirilmesi

	Huzursuzluk		p
	Yok (n=12)	Var (n=44)	
	n (%)	n (%)	
Karın ağrısı	2 (16,7)	13 (29,5)	0,481
Mide yanması	0	1 (2,3)	1,000
Reflü	1 (8,3)	2 (4,5)	0,522
Bulantı/Kusma	0	3 (6,8)	1,000
Karında guruldama	2 (16,7)	11 (25,0)	0,711
Karında şişkinlik	3 (25,0)	22 (50,0)	0,123
Geğirme	4 (33,3)	22 (50,0)	0,305
Gaz	10 (83,3)	38 (86,4)	1,000
Kabızlık	0	22 (50,0)	0,002
İshal	9 (75,0)	16 (36,4)	0,017

n: Hasta sayısı; %: Sütun yüzdesi

GBDA anketinde sorgulanan belirtiler, genel belirtiler, üst GİS belirtileri ve alt GİS belirtileri olarak üç alt gruba ayrılarak tekrar değerlendirilmiştir. Hasta grubunda tüm hastalarda alt GİS belirtileri varken, %89,3'ünde (n=50) genel belirtiler, %46,4'ünde (n=26) üst GİS belirtileri bildirilmiştir (Tablo 6). Hastaların GBDA den aldıkları puanlar ve ortanca puan değerleri genel grup ve alt gruplara göre Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Hastalara uygulanan GBDA göre puan dağılımı

<i>(n=56)</i>	n (%)	Puan (Ort±SD)	Puan Ortanca (min-maks)
Genel belirti	50 (89,3)	2,4±1,7	2 (0-8)
Üst GİS belirti	26 (46,4)	0,6±1,0	0 (0-7)
Alt GİS belirti	56 (100)	3,3±1,7	3 (1-8)
Toplam	56 (100)	5,9±3,2	5 (1-16)

n: Hasta sayısı; %: Sütun yüzdesi; Ort: Ortalama; SD: Standart sapma; OSB: Otizm spektrum bozukluğu; GBDA: Gastrointestinal sistem değerlendirme anketi

Hastalar GBDA'dan alınan toplam puanların ve alt grup puanlarının ortanca değerinin üstünde ve altında kalanlar olarak tekrar gruplanmıştır (Tablo 7). Üst GİS puanın ortanca değeri 0 olduğu için ileri incelemelere katılmamıştır.

Tablo 7. Belirtilerin ortanca puanlarına göre hastaların dağılımı

<i>Ortanca puan</i>	n (%)
Toplam	56 (100)
≤5	32 (57,1)
>5	24 (42,9)
Genel belirti	50 (89,3)
≤2	28 (56)
>2	22 (44)
Alt GİS belirti	56 (100)
≤3	34 (60,7)
>3	22 (39,3)

n: Hasta sayısı; %: Sütun yüzdesi; GBDA: Gastrointestinal sistem değerlendirme anketi

Hastaların GBDA'den aldıkları puanların yaş, cins ve BKİ Z skoru ile ilişkisi incelendiğinde; yaş ve cins ile ilişki bulunamamış ancak BKİ Z skoru ile GBDA

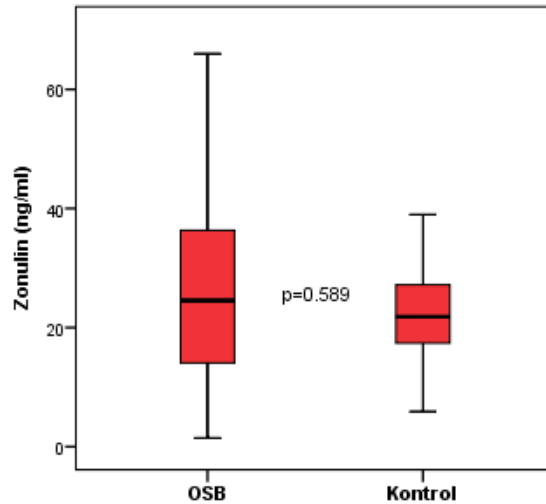
toplam puanı ve alt GİS puanı arasında, pozitif yönde, orta düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (sırasıyla; $p<0,001$; $p=0,009$) (Tablo 8).

Tablo 8. Hastaların yaş ve BKİ Z skoru ile GBDA puanları arasındaki ilişki

<i>(n=56)</i>	Yaş (yıl)		BKİ (Z skoru)	
	r	p	r	p
Genel belirti	0,13	0,344	0,24	0,075
Üst GİS belirti	0,08	0,568	-0,11	0,405
Alt GİS belirti	0,24	0,080	0,45	<0,001
Toplam	0,19	0,164	0,35	0,009

n: Hasta sayısı; BKİ: Beden kitle indeksi; GDA: Gastrointestinal değerlendirme anketi; r: Spearman korelasyon katsayısı

Zonulin ortanca değeri hasta grubunda; 24,5 (1,5-66,0) ng/ml, sağlıklı kontrol grubunda ise 21,8 (5,9-43,5) ng/ml saptanmış olup hasta ve kontrol grubu zonulin değerleri arasında fark bulunmamıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Hasta ve kontrol grubunun zonulin düzeyleri
($p=0,589$; Mann-Whitney U Testi)

Gruplar kendi içlerinde yaş, cins ve BKİ Z skoru ile zonulin arasındaki ilişki açısından değerlendirilmiştir.

Kontrol grubunda zonulin düzeyleri cinsler arasında farklılık göstermemiş olup (Tablo 9). Yaş, boy Z skoru, ağırlık Z skoru ve BKİ Z skorları ile zonulin arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 10).

Tablo 9. Kontrol grubunun cinsiyetine göre zonulin düzeyinin dağılımı

<i>KONTROL (n=55)</i>	n	Zonulin (ng/ml)		p
		Ort±SD	Ortanca (min-maks)	
Cinsiyet				
Erkek	37	23,4±8,6	21,8 (5,9-43,5)	0.373*
Kız	18	21,4±6,2	21,9 (9,9-33,0)	

n: Hasta sayısı; ort: Ortalama; SD: Standart sapma; OSB: Otizm spektrum bozukluğu; BKİ: Beden kütle indeksi; *Student's T Testi

Tablo 10. Kontrol grubunun yaş, boy uzunluğu, vücut ağırlığı ve BKİ Z skoru ile zonulin düzeyi arasındaki ilişki

<i>KONTROL (n=55)</i>	Zonulin (ng/ml)	
	r	p
Yaş (yıl)	-0,23	0,086
Boy Uzunluğu (Z skoru)	0,83	0,545
Vücut Ağırlığı (Z skoru)	0,83	0,548
BKİ (Z skoru)	0,42	0,761

n: Hasta sayısı; BKİ: Beden kütle indeksi; r: Spearman korelasyon katsayısı

Hasta grubunda cinsler arasında ve BKİ Z skoruna göre zonulin düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 11-12). Hasta grubunda yaş ile zonulin düzeyi arasında pozitif yönde, orta düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($r=0.29$; $p=0.030$) (Tablo 12, Şekil 7).

Tablo 11. Hastaların cinsiyetine göre zonulin düzeyinin dağılımı

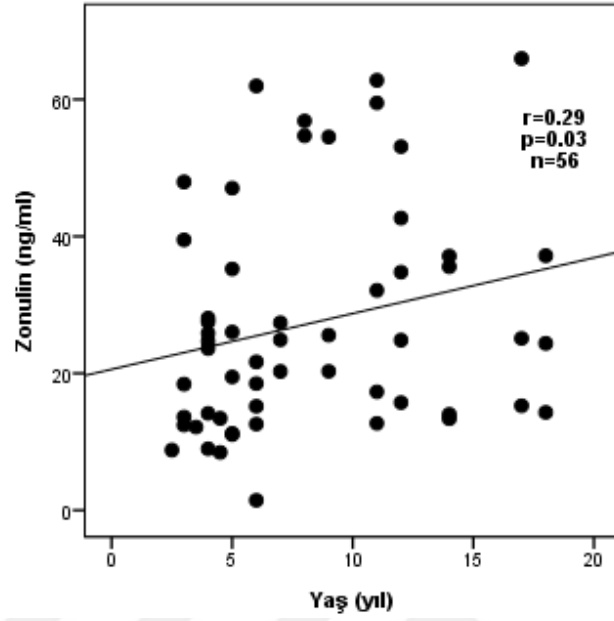
OSB	n	Zonulin (ng/ml)		P
		Ort±SD	Ortanca (min-maks)	
Cinsiyet				
Erkek	41	29,3±17.0	24,9 (8,4-66,0)	0,157*
Kız	15	22,0±13,5	19,5 (1,5-53,1)	

n: Hasta sayısı; ort: Ortalama; SD: Standart sapma; OSB: Otizm spektrum bozukluğu; BKİ: Beden kütle indeksi; *Mann-Whitney U Testi

Tablo 12. Hastaların yaş, boy uzunluğu, vücut ağırlığı, BKİ Z skorları ile zonulin düzeyi arasındaki ilişki

(n=56)	Zonulin (ng/ml)	
	r	p
Yaş (yıl)	0,29	0,030
Boy Uzunluğu (Z skoru)	-0,24	0,072
Vücut Ağırlığı (Z skoru)	-0,18	0,189
BKİ (Z skoru)	0,01	0,937

n: Hasta sayısı; BKİ: Beden kütle indeksi; r: Spearman korelasyon katsayısı



Şekil 7. OSB hastalarının yaşı ile zonulin düzeyi arasındaki ilişki

OSB hastaları GBDA'den aldıkları toplam puan, genel belirti puanı ve alt GİS belirti puanlarının ortanca değerlerinin altında ve üstünde kalan olgular olarak gruplandırıldı. Gruplar ortanca zonulin düzeylerine göre karşılaştırıldı. Anket puanı açısından ortanca değerin üstünde kalan olgularda zonulin düzeyi, ortanca değerin altında kalanlara göre anlamlı yükseklik gösterdi (Tablo 13).

Tablo 13. Hastaların belirti puan ortancalarına göre zonulin düzeyleri

Ortanca değeri	N	Zonulin (ng/ml)		p*
		Ort±SD	Ortanca (min-maks)	
Genel Belirtiler				
≤2	34	23,0±14,3	18,4 (1,5-59,5)	0,010
>2	22	34,0±17,4	25,6 (13,6-66,0)	
Alt GİS Belirtileri				
≤3	34	24,8±16,8	19,0 (1,5-66,0)	0,046
>3	22	31,2±15,2	26,8 (13,4-62,8)	
Toplam Puanı				
≤5	32	23,8±15,5	18,4 (1,5-59,5)	0,020
>5	24	32,1±16,6	25,6 (13,6-66,0)	

n: Hasta sayısı; Ort: Ortalama; SD: Standart sapma; *Mann-Whitney U Testi; **Kruskal Wallis Testi

Anket puanı açısından ortanca değerin üstünde ve altında belirti puanı olan hastalar ve kontrol grubunun ortanca zonulin düzeyleri karşılaştırıldığında, ortanca değerin üstünde puan alan hastaların zonulin düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı yükseklik gösterdiği görüldü (Tablo 14).

Tablo 14. Ortanca değerin üstünde puan alan hastalarla kontrol grubunun zonulin düzeyleri açısından karşılaştırılması

	N	Zonulin (ng/ml)		p*
		Ort±SD	Ortanca (min-maks)	
Genel belirti >2	22	34,0±17,4	25,6 (13,6-66,0)	0,012
Kontrol grubu	55	22,7±7,9	21,8 (5,9-43,5)	
Alt GİS >3	22	31,2±15,2	26,8 (13,4-62,8)	0,032
Kontrol grubu	55	22,7±7,9	21,8 (5,9-43,5)	
GBDA Toplam >5	24	32,1±16,6	25,6 (13,6-66,0)	0,034
Kontrol grubu	55	22,7±7,9	21,8 (5,9-43,5)	

n: Hasta sayısı; Ort: Ortalama; SD: Standart sapma; *Mann-Whitney U Testi; **Kruskal Wallis Testi

5. TARTIŞMA

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), belirtileri erken çocukluk çağında başlayan, sosyal ve iletişimsel alanda belirgin yetersizlikler, sınırlı, tekrarlayıcı davranışlar ile karakterli nörogelişimsel bir bozukluktur. Bu hastalığın etiyolojisi henüz aydınlatılamamıştır. OSB olan çocuklarda görülen huzursuzluk, agresif davranışlar, gece uyanma, karına bastırma hareketi ve özellikle dışkılama değişikliklerinin sık görülmesi gastrointestinal sistem ve OSB ilişkisine dikkat çekmiştir. OSB olan hastaların aileleri tarafından devamlı dile getirilen gastrointestinal sistem problemlerinin aslında bu gruptaki çocuklarda davranış bozuklukları (stres cevabı, anksiyetik- huzursuz davranışlar, saldırganlık, uyku bozukluğu vb.) ile yakından ilişkili olabileceği düşünülmektedir. GİS belirtileri olan OSB olgularının, GİS belirtisi olmayan OSB olgularına ve GİS belirtisi olan sağlıklı kardeşlerine göre daha fazla uyku problemi yaşadıkları gösterilmiştir [58, 59]. Bizim çalışmamızda ise OSB hastalarında sık bildirilen huzursuzluk belirtisinin kabızlık ve ishal ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür.

OSB olgularında GİS yakınmalarının sıklığı ve doğası konusunda sağlıklı veri elde etmek oldukça zordur çünkü yakınmalar çocuklar tarafından tam tanımlanamaz ve genellikle ailelerin yorumlarına dayanılarak değerlendirilir. Bizim çalışmamızda da anket yanıtları aileler aracılığı ile alınmıştır. Anket sonucunda hastaların tamamının en az bir tane GİS belirtisi bildirdiği görülmüştür. Belirtiler tek tek ele alındığında en sık gaz ve huzursuzluk bildirilmiş (%85,7 ve %78,6) ve bunları karında şişlik, geğirme, ishal, kabızlık, karın ağrısı gibi yakınmalar izlemiştir. Hastaların hiçbirinde yetersiz dışkılama veya acil dışkılama şikâyeti

belirtilmemiştir. Anket kendi içinde genel belirtiler, alt GİS belirtileri ve üst GIS belirtileri olarak alt gruplara ayrılarak incelendiğinde; hastaların %89,3'ünde genel belirtiler, %46,4'unda üst GİS belirtileri ve tamamında alt GİS belirtileri bildirildiği görülmüştür.

Literatürde OSB grubu çocuklarda yapılan çalışmalarda gastrointestinal belirtilerin görülme sıklığı %9'dan %91'e kadar geniş bir aralıkta bildirilmektedir. Karın ağrısı sıklığının %2 ile %41 arasında, kabızlığın %6 ile %45, ishal şikâyetlerinin %3 ile %77 arasında değiştiği görülmektedir [40].

Horvaht ve arkadaşlarının 412 OSB hastasını kapsayan çalışmalarında, hastaların %84,1'inin en az bir gastrointestinal belirtiyeye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu belirtiler olguların %19'unda kronik ishal, %21'inde kronik kabızlık ve %7'sinde değişken dışkı kıvamı şeklindedir [58]. OSB'li hastaların ROMA III kriterlerine göre incelendiği bir başka çalışmada ise, 33 OSB hastasında gözlenen gastrointestinal belirtilerin, %50'sini kabızlık, %40'ını ise değişken bağırsak alışkanlığı şikâyetlerinin oluşturduğu bildirilmiştir[60]. İbrahim ve arkadaşları 124 OSB tanılı çocuk olguyu, gastrointestinal belirtiler açısından 2-3 yaşlarından başlanarak 21 yıl takip etmiştir. Çalışma bu kadar uzun zaman dilimini incelen tek çalışma özelliği göstermektedir. Çalışmanın başlangıç değerlendirmesinde OSB olgularında kabızlık sıklığı ve beslenme sorunları daha yüksek olmasına rağmen, tüm gastrointestinal belirtilerin toplam sıklığında kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Hastaların 20 yıllık izlem sürecinde ise, kabızlık (%33,9) ve ishal (%50,3) şikâyetlerinin sıklığında artış olsa da, sadece kabızlık ve beslenme problemlerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda artış gösterdiği

gözlenmiştir[61]. OSB olan çocuklarda GIS yakınmalarının varlığı ve sıklığına ilişkin çalışmaların farklı ve geniş aralıkta sonuçları olması çalışmaların metodolojik kısıtlamaları olması ile ilişkili olabilir. Optimal olmayan hasta-kontrol grubu veya kontrol grubunun eksikliği ve en önemlisi yakınmalar değerlendirilirken yalnızca anne baba raporuna güvenilmek zorunda kalınması sonuçları etkileyebilecek faktörler olabilir [40].

Çalışmamızda hastaların belirtileri puanlandığında, alınan puanlar 1 ile 16 arasında değişkenlik göstermiş, genel belirtiler olarak tanımlanan grupta puan ortancası daha yüksek bulunmuştur. Puan derecesine etki eden faktörler açısından yapılan değerlendirmede BKİ Z skoru ile anket puanları arasında, pozitif yönde, orta düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Hastaların BKİ arttıkça genel belirti puanları ve alt GIS belirti puanlarında artış olduğu görülmüştür.

OSB grubu çocuklarda sık görülen bu gastrointestinal sistem yakınmaları, hastalıkta görülen bulguların kökeninde GIS işlev bozukluğu/patolojisi olabileceği fikrini doğurmuştur [28]. OSB'li çocuklarda bağırsak geçirgenliğinin artışı ve bunun sonuçları üzerinde durulmuş ve bu konuda çok sayıda araştırma yapılmıştır. İlk defa 1971 yılında Mary Goodwin ve arkadaşları malabsorbsiyon ve serebral disfonksiyonu olan otizmlilerde, beyin-bağırsak ilişkisinden bahsetmişlerdir [62]. Aslında bu tarihten 4-5 yıl önce Curt Dohan da şizofrenide de beyin-bağırsak ilişkisi olduğunu belirtmiştir [63]. 1960'lı yıllardan itibaren bu hastalarda gastrointestinal geçirgenlik artışı olduğunu savunan çeşitli çalışmalar yapılmıştır. D'Eufemia ve arkadaşları laktüloz/mannitol testi ile bağırsak geçirgenliğini test ettikleri çalışmalarında, çalışmaya katılan otistik çocukların yarısında bağırsak

geçirgenliği artışı saptarken kontrol olguların tamamında normal bulgular rapor etmiştir. Bu çalışmadan 12 yıl sonra ise benzeri bir çalışmayı yapan Robertson ve arkadaşları, hasta ve kontrol grupları arasında bağırsak geçirgenliği açısından bir farklılık bulamamışlardır. Magistris ve arkadaşları 2010 yılında çalışma grubundaki otizmlili çocukların üçte birinde ve bunların birinci derece akrabalarının %20 sinde bağırsak geçirgenliği artışı saptamışlardır. Bu geçirgenlik artışının glütensiz ve kazeinsiz diyetle düzelmesi ile otistik çocuklar ve ailelerinde bağırsak epiteli sıkı bileşkelerin fonksiyonunu etkileyen kalıtsal bir neden olabileceği fikrini savunmuşlardır [27, 64]. Lovene M.R. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 47 OSB ve 33 kontrol sağlıklı grubun bağırsak geçirgenliği laktüloz/mannitol testi ile değerlendirilmiş ve OSB olgularında bağırsak geçirgenliğinin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir [60] Bağırsak geçirgenliği artışı olan ve bu artışın laktüloz/mannitol yöntemiyle gösterildiği hayvan modeli çalışmasında, bu farelerin strese karşı yanıtsızlığın arttığı ve anksiyetik davranışlar sergiledikleri saptanmıştır [59]. OSB grubu hastalıklar ve aşırı geçirgen bağırsak arasında bir ilişki arayan pek çok çalışma yapılırken merak edilen bir diğer konu bağırsağın aşırı geçirgen hale gelişinin hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğidir [42].

Bağırsakların fizyolojik görevleri içinde, çeşitli antijenik geçişler için bariyer oluşturmak ve immün sistemin önemli bir parçası olarak immün yanıtlarda işlev üstlenmek de vardır. Son yıllarda bazı otoimmün, inflamatuvar ve neoplastik hastalıkların etiyopatogenezinde bağırsak bariyeri bozuklukları ve bağırsak geçirgenliğindeki artış ve bu nedenle oluşan anormal immün yanıtların rolüne dikkat çekilmektedir. Bağırsak geçirgenliğinde artışı tetikleyen faktörler arasında

ise glüten gibi diyeter antijenler ve bağırsak mikrobiyata değişiklikleri iki önemli faktör olarak sayılmaktadır. Bağırsak geçirgenliğinin önemli oranda, bağırsak epitelindeki sıkı bileşkeler ile düzenlendiği ve sıkı bileşkelerin fonksiyonunun düzenlenmesinde ise zonulin olarak adlandırılan bir proteinin rolünün önemli olduğu bilinmektedir. Zonulin bağırsak geçirgenliğini artışı gösteren bir biyo belirteç olarak kullanılmaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi bağırsak geçirgenliğinde artış olduğu gösterilen çeşitli otoimmün hastalıklarda zonulin düzeylerini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Duerksen ve arkadaşları başlangıçta çölyak antikorları pozitif olup, histopatolojik olarak tanı koydukları 21 çölyak hastasını 10 yıla yakın süre izlemiş; bu olgularda başlangıçta ve izlem sonunda bağırsak geçirgenliğini laktüloz/mannitol testi ile değerlendirmiş ve zonulin düzeylerini tayin etmişlerdir. On olguda antikorlar negatifleşmiş, biyopsi ve bağırsak geçirgenliği normale dönmüştür. Altı hastada antikorlar pozitif, histopatoloji Marsh tip 2 ve 3 bulunmuş ve bağırsak geçirgenliği bozuk kalmıştır. Diyet uyumu iyi olmadığı düşünülen bu olgulardan Marsh tip 3 histopatoloji gösteren olgularda bağırsak geçirgenliği ile zonulin düzeyi arasında pozitif yönde korelasyon saptanmıştır [65].

Maryland üniversitesinde, tip 1 DM'li 339 hasta, bunların birinci derece akrabası olan 89 olgu ve 97 sağlıklı bireyin serum zonulin düzeyleri değerlendirilmiştir. Tip 1 DM'li hastaların zonulin düzeyleri, kendi akrabaları ve kontrol grubuna göre belirgin yüksek bulunmuştur. Tüm gruplara laktüloz/mannitol testi uygulandığında, hasta ve hastaların 1. derece akrabalarında, sağlıklı gruba göre bağırsak geçirgenliğinde anlamlı fark olduğu ve geçirgenlik testi yüksek olan

bireylerin serum zonulin düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon olduğu görülmüştür [66].

OSB grubu çocuklarda serum zonulin düzeyini araştıran sadece bir çalışma mevcut olup, biz çalışmamızı sürdürürken 2017 yılında yayınlanmıştır. Esnafoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada OSB olan 32 hasta ile 33 sağlıklı kontrol grubunun serum zonulin düzeyleri çalışılmış; hasta grubunun zonulin düzeyleri ($122,30 \pm 98,46$ ng/ml), kontrol grubunun zonulin düzeylerinden ($41,89 \pm 45,83$ ng/ml) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < .001$) Ayrıca serum zonulin düzeyleri ile otistik bulguların şiddeti arasında pozitif ilişki saptanmıştır [55].

Çalışmamızda serum zonulin düzeyleri hasta ve sağlıklı kontrol grubunda benzer bulunmuş, aralarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Esnafoğlu ve arkadaşlarının çalışma sonuçları ile çalışmamızın sonuçlarının farklılığının kaynağı konusunda yorum yapmak bu konuda daha fazla sayıda hasta içeren yeni çalışmaların yapılması ile mümkün olacaktır. İleride planlanacak çalışmaların bağırsak geçirgenliğini gösteren diğer testler eşliğinde ve özellikle kontrol grubunun daha iyi seçilmesi ile değerli olacağını düşünmekteyiz. Kontrol grubunda sağlıklı kardeşlerin veya aile bireylerinin de yer alması, bağırsak geçirgenliği ve zonulin düzeyleri üzerinde çevresel etkilerin yanında kalıtsal etkilerin olup olmadığının anlaşılmasını sağlayacaktır.

Serum zonulin düzeyi çeşitli otoimmün hastalıklarda çalışılmış ve bu çalışmalarda, zonulin düzeyi ile cinsiyet ve yaş arasında ilişki olmadığı

gösterilmiştir [55, 67, 68]. Bizim çalışmamızda da hasta ve kontrol grubunda cinsiyet ve yaşın zonulin düzeyi ile ilişkisi saptanmamıştır ancak OSB hastalarında yaş ile zonulin düzeyi arasında pozitif yönde, orta düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($r=0.29$; $p=0.030$). OSB hastalarında yaş arttıkça serum zonulin düzeylerinde artış olduğu görüldüğü bu grupta yaşla birlikte bağırsak geçirgenliğinde artışın olduğunu düşündürdü. Bu düşüncemiz Watts ve arkadaşları tarafından fareler üzerinde yapılan bir araştırmanın sonuçları ile kısmen desteklenmektedir. Bu çalışmada, diyabete yatkınlığı olan ve diyabete dirençli 20 farede serum zonulin düzeyleri değerlendirilmiştir. Fareler 20 günlük iken, iki grup arasında serum zonulin düzeyi farkı yokken, 50 günlük olduklarında diyabet dirençli grupta serum zonulin düzeyi normal kalmış, diyabet yatkınlığı olan farelerde zonulin düzeyinde yükselme ve laktüloz/mannitol ile bağırsak geçirgenliği testinde bozukluk saptanmıştır. Bu değerlerdeki bozulma 100 günden sonra daha belirgin hale gelmiştir. Çalışmada zonulin düzeyleri ile bağırsak geçirgenliğinin birbirleriyle pozitif yönde korelasyon gösterdiği görülmüştür. 100. günde tip 1 DM geliştiren farelerin zonulin düzeyinin, tip 1 DM olmayan farelere göre belirgin yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile genetik yatkınlığı olanlarda yaş arttıkça zonulin düzeyinin ve bağırsak geçirgenliğinin arttığı ve bunun sonucunda da tip 1 DM gibi otoimmün hastalıkların ortaya çıkabileceğini sonucuna varılmıştır [24].

Obezitenin zonulin ile ilişkisinin değerlendirildiği çalışmalarda, obezlerde zonulin düzeylerinin kontrol gruplarına göre yüksek olduğu ve BKİ ile aralarında pozitif yönde korelasyon olduğu gösterilmiştir [69]. Tip 2 DM'li 143, bozulmuş

glukoz intoleransı olan 124 hasta ve 124 sağlıklı olgunun incelendiği bir çalışmada, serum zonulin düzeyleri ve BKİ ilişkisi araştırılmış ve bu iki parametrenin arasında pozitif korelasyon saptanmıştır [67]. Çalışmamıza obez hasta alınmamıştır, ayrıca hasta ve kontrol grubunda BKİ Z skoru ile serum zonulin düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Esnafoğlu ve arkadaşlarının çalışmasında OSB grubunda BKİ ve zonulin düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir [55].

Genel belirti puanları, alt GİS belirti puanları ortancalarının altında kalan olgular ile üstünde kalan olgular zonulin düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. Her iki belirti grubunda da ortanca puan değerinin üstünde kalan olguların zonulin düzeyleri, altında kalan olgulardan anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Bir başka bulgumuz ise ortanca değerin üstünde puan alan OSB olgularının serum zonulin düzeylerinin sağlıklı gruba göre anlamlı yüksek olmasıdır. Bu bulgular bize gastrointestinal belirtileri yoğun olan OSB olgularında, bağırsak geçirgenliğinde artış olduğunu düşündürmüştür. Esnafoğlu ve arkadaşları çalışmalarında OSB grubu hastalarının %65,62 sinde GİS yakınmaları olduğunu belirtmiş, hasta ve kontrol grubu birlikte alınıp değerlendirildiğinde GIS yakınmaları ile serum zonulin düzeyleri arasında önemli korelasyon bildirmişlerdir. Hasta ve kontrol grubu ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise bu korelasyon saptanmamıştır [55]. Ancak literatürde, OSB olan çocuklarda GİS belirtileri ile zonulin düzeylerinin ilişkisinin değerlendirildiği başka bir çalışma bulunmamaktadır. OSB grubunda bağırsak geçirgenliği artışı olup olmadığı ve bu artışta zonulinin rolünün tanımlanması önemlidir. Çölyak hastalarında yapılan çalışmalarda glutensiz diyetin zonulin düzeylerinin düşmesini sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca Çölyak hastalarında yapılan

klirik çalışmalar, glüten maruziyetinin tetiklediği G S ve G S dışı belirtilerin iyileştirilmesinde zonulin inhibitörü Larazotid asetatin etkin olabileceğini düşündürmektedir [70, 71]. OSB olguları için glütensiz ve kazeinsiz diyet uygulamaları önerilmekte ve belirtiler üzerinde olumlu etkileri olabileceği belirtilmektedir. OSB’li hastalara glütensiz diyet uygulamasının bağırsak geçirgenliğinin düzenlenmesiyle, davranış problemlerinde düzelme sağlayabileceği öngörülmektedir [72, 73]. Piwowarczyk ve arkadaşlarının üç farklı bölgede toplamda 214 OSB olgusunda yaptıkları çalışmada ise, glütensiz ve kazeinsiz diyet uygulanan ve uygulanmayan olgular arasında davranış bozuklukları karşılaştırılmış, klinik gözlemde olumlu yönde iyileşme bildirilen olgularda, standardize edilmiş ölçekler kullanıldığında diyet uygulamayan grup ile farklılık gösterilememiştir. Glütensiz-kazeinsiz diyetlerin OSB tedavisinde kullanılması rutin olarak önerilmemektedir. Bu konuda sağlıklı bir veri elde etmek, diyet uygulayan ve uygulamayan OSB olgularını, bu olguların sağlıklı akrabalarını ve sağlıklı kontrol grubunu içeren, bağırsak geçirgenliğinin ve zonulin gibi bir biyo-belirteç ile ilişkisinin değerlendirildiği iyi planlanmış çalışmalarla olasıdır. Diğer yandan Heberling ve arkadaşlarının dikkat çektiği gibi, OSB de zonulin düzeylerini inceleyen araştırmaların artması ile bu olgularda zonulin inhibitörlerinin tedavideki yerinin araştırılması da gündeme gelebilecektir [74].

Çalışmamızda, OSB ve kontrol grubu arasında zonulin düzeyleri açısından farklılık bulunmamıştır ancak OSB grubunda zonulin düzeylerinin yaşla pozitif yönde ilişkisi vardır. Öte yandan GBDA ortanca puanı üzerinde kalan OSB olgularında, diğer OSB olgularına ve kontrol grubuna göre ortanca zonulin

düzeyleri anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu bulgular bize OSB olgularında yaş arttıkça ve GİS semptom sıklığı arttıkça bağırsak geçirgenliğinde değişkenlikler olabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, OSB grubu olgularda bağırsak geçirgenliği artışını bir biyo belirteç ile değerlendiren daha fazla sayıda araştırmaya gerek vardır. İleride planlanacak çalışmaların bağırsak geçirgenliğini gösteren diğer testler eşliğinde yapılması, hasta ve kontrol grubunun daha fazla sayıda olgu içermesi ve özellikle kontrol grubunun daha iyi seçilmesi ile değerli olacağını düşünmekteyiz. Kontrol grubunda sağlıklı birinci derecede akrabaların yer alması, bağırsak geçirgenliği ve zonulin gibi biyo belirteçler üzerinde çevresel etkilerin yanında kalıtsal etkilerin de olup olmadığının anlaşılmasını sağlayacaktır.

6. SONUÇ

1. Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniğinde, Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) ile takip edilen, gastrointestinal hastalığı olmayan 56 hasta ve 55 sağlıklı kontrol çocuk olgu incelenmiştir. Gruplar arasında yaş ve cins açısından farklılık yoktur.
2. Hastaların boy uzunluğu ortalaması $127,3 \pm 25,1$ (min:82-maks:183) cm, vücut ağırlığı ortalaması $31,4 \pm 17,9$ (min:12-maks:90) kg ve beden kitle indeksi (BKİ) ortalaması $17,7 \pm 3,3$ (min:13,4-maks:27,8) kg/m^2 'dir.
3. Kontrol grubunun boy uzunluğu ortalaması $142,3 \pm 22,31$ (min:90-maks:180) cm, vücut ağırlığı ortalaması $38,4 \pm 17,29$ (min:12-maks:82) kg ve beden kitle indeksi (BKİ) ortalaması $17,9 \pm 3,6$ (min:12,6-maks:27,85) kg/m^2 'dir.
4. Hasta ve kontrol grubu arasında boy ve vücut ağırlığı Z skorları arasında farklılık saptanmamıştır. Ancak gruplar arasında BKİ Z skorları arasında fark bulunmuştur. OSB grubunda hafif kilolu çocuk oranı daha fazladır. BKİ Z skoruna göre hastaların %64,3'ü normal kilolu, %35,7'si hafif kilolu, kontrol grubunun %83,6'sı normal kilolu, %16,4'ü hafif kilolu bulunmuştur.
5. OSB hastalarına gastrointestinal belirti değerlendirme anketi (GBDA) uygulanmıştır ve 56 çocuğun tamamında en az bir GİS bulgusuna rastlanmıştır.

6. Hastalarda en sık görülen gastrointestinal bulgu, gaz problemi (85,7), en az görülen bulgu mide yanmasıdır (1,8). Acil dışkılama ve yetersiz dışkılama şikâyetine hiçbir hastada rastlanılmamıştır.
7. Hastaların %78,6'sında huzursuzluk bildirilmiştir. Tüm GİS belirtileri içinde huzursuzluk ile ilişkisi gösterilen belirtiler ishal ve kabızlık olmuştur.
8. Gastrointestinal belirti değerlendirme anketi alt gruplarına ayrıldığında, 56 hastanın 50'sinde (89,3) genel GİS belirtileri, 26'sında (46,4) üst GİS ve 56'sında (100) alt GİS bulgusu olduğu görülmüştür.
9. GBDA'dan alınan en düşük puan 1, en yüksek puan 16 olup, toplam puanların ortanca değeri 5 olarak hesaplanmıştır. Ortanca değere göre değerlendirme yapıldığında, hastaların %57,1'i (n=32) 5 ve altı puan almıştır. Genel belirtilerin ortanca değeri 2 (min:0-maks:8), üst GİS belirtileri ortanca değeri 0 (min:0-maks:7) ve alt GİS belirtileri ortancası 3 (min:1-maks:8) olarak hesaplanmıştır.
10. GBDA'dan toplamda 5'in üstünde puan alan 24, genel belirtilerden 2'nin üstünde puan alan 22 ve alt GİS puanından 3'ün üstünde puan alan 22 hasta vardır.
11. Hastaların GBDA'dan aldıkları puanların yaş ve BKİ Z skoru ile ilişkisi incelendiğinde; yaş ile ilişki bulunamamış ancak BKİ Z skoru ile GBDA toplam puanı ve alt GİS puanı arasında, pozitif yönde, orta düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır.

12. OSB olan 56 hastanın serum zonulin düzeyi 55 sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında zonulin düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.
13. Kontrol grubu kendi içinde değerlendirildiğinde, yaş, cinsiyet ve BKİ Z skoru ile zonulin düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.
14. OSB hastaları kendi içinde değerlendirildiğinde, serum zonulin düzeylerinde, cinsiyet ve BKİ Z skoruna göre anlamlı farklılık bulunmamıştır ancak hastaların yaşı arttıkça serum zonulin düzeylerinin arttığı görülmüştür. Hastaların yaşı ile zonulin düzeyi arasında pozitif yönde, orta düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır.
15. GBDA toplam puanı 5'in üzerinde olanların zonulin düzeyi, 5 ve altında olanlardan, genel belirti puanı 2 ve üstünde olanların zonulin düzeyi 2'nin altında olanlardan, alt GIS puanı 3 ve üstünde olanların zonulin düzeyi, 3'ün altında olanlardan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
16. OSB ile kontrol grubunun zonulin düzeyleri arasında fark olmamasına rağmen, OSB grubunda GBDA'dan toplamda 5'in, alt GIS puanından 3'ün, genel belirti puanından 2'nin üzerinden alan olguların zonulin düzeyleri ile kontrol grubundan anlamlı oranda yüksek bulunmuştur

7. ÖZET

OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA SERUM ZONULİN DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bağırsaklar dış ortam ve vücut arasında önemli bir bariyer görevi yapmakta, bazı antijenlerin vücuda geçişinde ve immün yanıt gelişiminde önemli bir rol üstlenmektedir. Son yıllarda, Çölyak hastalığı, tip 1 diabetes mellitus, astım, ankilozan spondilit, bazı kanser türleri, otizm spektrum bozukluğu (OSB), şizofreni gibi hastalıkların etiyopatogenezinde bağırsak geçirgenliği artışının rol oynadığı görüşü kabul görmektedir. Özellikle otoimmün hastalıklarda bağırsak geçirgenliği artışının gösterilmesi ve bunu belirleyebilecek belirteçler üzerinde yoğunlaşan çalışmalar yapılmaktadır.

Bağırsak geçirgenliği önemli oranda, bağırsak epitelindeki sıkı bileşkelerle düzenlenir. Sıkı bileşkelerin fonksiyonunun düzenlenmesinde ise zonulin olarak adlandırılan bir proteinin rolü çok önemlidir. Zonulin bağırsak epitelinde özel reseptörlere bağlanır ve hücreler arası sıkı bileşkelerin yapısında yer alır. Bu proteinin sıkı bileşkeden ayrılması bağırsak geçirgenliğinde artışa neden olur.

OSB, davranışsal, sosyal ve bilişsel gerilikle seyreden nörogelişimsel bir hastalıktır ve etiyolojisi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. OSB hastalarında gastrointestinal yakınmaların sık olması, OSB etiyolojisinde beyin bağırsak ilişkisinin rolü olabileceği düşüncelerini doğurmuştur. OSB olan çocuklarda bağırsak geçirgenliği artışı üzerinde yoğunlaşan pek çok çalışma vardır. OSB hastalarında artan bağırsak geçirgenliği nedeni ile bağırsak bakterileri tarafından

oluşturulan metabolitlerin veya bazı diyetler antijenlerin, bağırsaktan kana geçişinin artabileceği ve olası immün/otoimmün mekanizmaları uyarak, hastalığın gelişiminde rolü olabileceği düşünölmektedir. Çalışmamızda, OSB grubundaki çocuklarda bağırsak geçirgenliğinde önemli rolü olan sıkı bileşkelerin fonksiyonunu düzenleyen zonulin çalışılmış ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda hasta ve kontrol grubunun zonulin düzeylerinde farklılık saptanmamıştır. Hasta grubunda zonulin düzeyi yaşla beraber artış göstermiştir. Gastrointestinal belirti puanı ortanca değerin üzerinde olan hastaların serum zonulin düzeyleri, puanları ortanca değerin altında olan hastalardan ve sağlıklı kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Bu bulgular bize OSB grubunda yaş ve gastrointestinal belirtilerin yoğunluğu arttıkça zonulin düzeylerinde artış olduğunu ve bağırsak geçirgenliği artışının bu hastalarda söz konusu olabileceğini düşöndürmüştür. Özellikle huzursuzluk belirtisinin dışkılama değışiklikleri ile ilişkili bulunması ise, OSB grubunda davranışsal değışikliklerin bağırsak geçirgenlik artışı ile ilişkili olabileceği düşöncesini doğurmuştur.

Anahtar kelimeler: Otizm spektrum bozukluğu, bağırsak geçirgenliği, zonulin

8. SUMMARY

EVALUATION OF SERUM ZONULIN LEVELS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTURUM DISORDERS

The intestines, acting like a barrier between the body and outer environmental conditions, play an important role in the intake of some antigenes and immün response development. Most studies, conducted in the recent times, seem to agree that the increase in intestinal permeability plays an important role on the etiopathogenesis of some diseases' such as a Celiac disease, a type 1 diabetes mellitus, an asthma, an ankylosing spondylitis, some neoplastic diseases, an autism spectrum disorder (ASD) and a schizophrenia. Especially, many recent studies have focused on the demonstration of intestinal permeability increase in autoimmune diseases and the markers that specifies this increase.

Significantly, the intestinal permeability is regulated by the tight junctions on the intestinal epithelium. A protein, which is called as zonulin, has a key role on the regulation of tight junction functions. Zonulin is involved in the structure of intracellular tight junctions and binds to special receptors on the intestinal epithelium. The disjunction of this protein (zonulin) from the junctional complex leads to increase in the intestinal permeability.

ASD is a neurodevelopmental disease with behavioural, social and cognitive retardation and the ethology of which is not fully illuminated. The frequent occurrence of gastrointestinal complaints in patient with ASD leads to growing of ideas that brain-intestine relationship may have an important role on etiopathogenesis of ASD. There are many studies which have been focused on

increasing of the intestinal permeability in ASD. It is considered that the increased permeability of intestines results in rising of invasion of metabolites, formed by intestinal microorganism and some dietary antigens, through blood. By this way it stimulates some immune/autoimmune mechanisms which may be responsible for the development of the disease. In this study, zonulin which regulates the function of tight junctions and is responsible for the increased intestinal permeability in children with ASD was evaluated and compared with zonulin in healthy control groups. According to this study it was seen that there was no difference in zonulin levels between patient and control group. It was observed that there was positive correlation between serum zonulin levels and age in patient group. Serum zonulin level of patients with gastrointestinal symptom score above median value was higher than serum zonulin level of patients with symptom score under median value and healthy control group. As a result of this study, it was considered that, the increase of zonulin level with age and higher intensity of gastrointestinal symptoms and the increase of intestinal permeability may be a matter of in ASD patients. Especially, the relevance of the restlessness symptom with defecation changes leads to growing an idea that behavioural changes in ASD group may be related to the increase in intestinal permeability.

Keywords: Autism spectrum disorders, intestinal permeability, zonulin

9. KAYNAKLAR

1. Fasano, A. and T. Shea-Donohue, Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 2005; 2(9): 416.
2. Viggiano, D., et al., Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015; 19(6): 1077-85.
3. Ianiro, G., et al., Role of yeasts in healthy and impaired gut microbiota: the gut mycome. *Current pharmaceutical design*, 2014; 20(28): 4565-4569.
4. Sommer, F. and F. Bäckhed, The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature reviews. Microbiology*, 2013; 11(4): 227.
5. Moens, E. and M. Veldhoen, Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours. *Immunology*, 2012; 135(1): 1-8.
6. Pearson, C., H.H. Uhlig, and F. Powrie, Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. *Trends in immunology*, 2012; 33(6): 289-296.
7. Constantinovits, M., et al., Organizer and regulatory role of colonic isolated lymphoid follicles in inflammation. *Acta Physiologica Hungarica*, 2012; 99(3): 344-352.
8. Fasano, A. and J.P. Nataro, Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. *Advanced drug delivery reviews*, 2004; 56(6): 795-807.

9. Fasano, A., Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2012; 10(10): 1096-1100.
10. Fasano, A., Intestinal zonulin: open sesame! *Gut*, 2001. 49(2): p. 159-162.
11. Fasano, A., Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000; 915(1): 214-222.
12. Fasano, A., et al., Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 1995; 96(2): 710.
13. Wang, W., et al., Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *Journal of cell science*, 2000; 113(24): 4435-4440.
14. Fasano, A., Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012; 1258(1): 25-33.
15. Fasano, A., Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological reviews*, 2011; 91(1): 151-175.
16. Fasano, A., et al., The enterotoxic effect of zonula occludens toxin on rabbit small intestine involves the paracellular pathway. *Gastroenterology*, 1997; 112(3): 839-846.
17. El Asmar, R., et al., Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*, 2002. 123(5): p. 1607-1615.

18. Lammers, K.M., et al., Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*, 2008; 135(1): 194-204. e3.
19. Visser, J., et al., Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009; 1165(1): 195-205.
20. Shim, J.O., Gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*, 2013; 16(1): 17-21.
21. Maynard, C.L., et al., Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 2012; 489(7415): 231.
22. Soyucen, E., et al., Differences in the gut microbiota of healthy children and those with type 1 diabetes. *Pediatrics International*, 2014; 56(3): 336-343.
23. Murri, M., et al., Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC medicine*, 2013; 11(1): 46.
24. Watts, T., et al., Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005; 102(8): 2916-2921.
25. Reinhardt, M., Macromolecular absorption of food antigens in health and disease. *Annals of allergy*, 1984; 53(6 Pt 2): 597-601.
26. Heyman, M. and J. Desjeux, Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000; 915(1): 304-311.

27. de Magistris, L., et al., Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 2010; 51(4): 418-424.
28. White, J.F., Intestinal pathophysiology in autism. *Experimental Biology and Medicine*, 2003; 228(6): 639-649.
29. Association, A.P., Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). 2013; American Psychiatric Pub.
30. American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. . 1980; APA Press: Washington, DC.
31. Stubbs, E.G.v.C., K., Autism Spectrum Disorders, in *Child and Adolescent Psychiatry*, K.M.M. K. Cheng, Editor. 2005; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. 227-246.
32. Manning-Courtney, P., et al., Autism spectrum disorders. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 2013; 43(1): 2-11.
33. Kim, Y.S., et al., Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *American Journal of Psychiatry*, 2011; 168(9): 904-912.
34. Johnson, C.P. and S.M. Myers, Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 2007; 120(5): 1183-1215.
35. Edmiston, E., P. Ashwood, and J. Van de Water, Autoimmunity, autoantibodies, and autism spectrum disorder. *Biological Psychiatry*, 2017; 81(5): 383-390.

36. Campbell, D.B., et al., Genetic evidence implicating multiple genes in the MET receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism Research*, 2008; 1(3): 159-168.
37. Windham, G.C., et al., Autism spectrum disorders in relation to distribution of hazardous air pollutants in the San Francisco Bay area. *Environmental health perspectives*, 2006; 114(9): 1438.
38. Geier, D.A., et al., Biomarkers of environmental toxicity and susceptibility in autism. *Journal of the neurological sciences*, 2009; 280(1): p. 101-108.
39. Uno, Y., et al., Early exposure to the combined measles–mumps–rubella vaccine and thimerosal-containing vaccines and risk of autism spectrum disorder. *Vaccine*, 2015; 33(21): 2511-2516.
40. Coury, D.L., et al., Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda. *Pediatrics*, 2012; 130(Supplement 2): S160-S168.
41. Adams, J.B., et al., Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism–comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC gastroenterology*, 2011; 11(1): 22.
42. Wang, L.W., D.J. Tancredi, and D.W. Thomas, The prevalence of gastrointestinal problems in children across the United States with autism spectrum disorders from families with multiple affected members. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 2011; 32(5): 351-360.

43. Buie, T., et al., Recommendations for evaluation and treatment of common gastrointestinal problems in children with ASDs. *Pediatrics*, 2010; 125(Supplement 1): S19-S29.
44. Bercik, P., S. Collins, and E. Verdu, Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterology & Motility*, 2012; 24(5): 405-413.
45. Bischoff, S.C., et al., Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2009; 296(3): G685-G695.
46. Ghia, J.E., et al., Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology*, 2009; 137(5): 1649-1660.
47. Li, Q., et al., The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2017; 11.
48. Li, J., et al., An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature biotechnology*, 2014; 32(8): 834-841.
49. Buffington, S.A., et al., Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell*, 2016; 165(7): 1762-1775.
50. De Theije, C.G., et al., Autistic-like behavioural and neurochemical changes in a mouse model of food allergy. *Behavioural brain research*, 2014; 261: 265-274.
51. Eisenstein, M., Microbiome: bacterial broadband. *Nature*, 2016; 533(7603): S104-S106.

52. Heijtz, R.D., et al., Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011; 108(7): 3047-3052.
53. Neufeld, K., et al., Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology & Motility*, 2011; 23(3): 255.
54. Hoban, A.E., et al., Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience*, 2016; 339: 463-477.
55. Esnafoglu, E., et al., Increased Serum Zonulin Levels as an Intestinal Permeability Marker in Autistic Subjects. *The Journal of Pediatrics*, 2017;
56. Çocukluk Çağı Obezite Araştırması (COSI-TR), 2013; 6. Available from: URL: <http://www.diabetcemiyeti.org/var/cdn/a/f/cosi-tr-sonuclari.pdf>
57. Svedlund, J., I. Sjödin, and G. Dotevall, GSRS—a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Digestive diseases and sciences*, 1988; 33(2): 129-134.
58. Horvath, K. and J.A. Perman, Autism and gastrointestinal symptoms. *Current gastroenterology reports*, 2002; 4(3): 251-258.
59. Söderholm, J., The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology & Motility*, 2010; 22(7): 718-733.
60. Iovene, M.R., et al., Intestinal Dysbiosis and Yeast Isolation in Stool of Subjects with Autism Spectrum Disorders. *Mycopathologia*, 2017; 182(3-4): 349-363.

61. Ibrahim, S.H., et al., Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics*, 2009; 124(2): 680-686.
62. Goodwin, M.S., T.C. Goodwin, and M.A. Cowen, Malabsorption and cerebral dysfunction: a multivariate and comparative study of autistic children. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 1971; 1(1): 48-62.
63. Dohan, F.C., et al., Relapsed schizophrenics: more rapid improvement on a milk-and cereal-free diet. *The British Journal of Psychiatry*, 1969; 115(522): 595-596.
64. d'Eufemia, P., et al., Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatrica*, 1996; 85(9): 1076-1079.
65. Duerksen, D., et al., A comparison of antibody testing, permeability testing, and zonulin levels with small-bowel biopsy in celiac disease patients on a gluten-free diet. *Digestive diseases and sciences*, 2010; 55(4): 1026-1031.
66. Sapone, A., et al., Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*, 2006; 55(5): 1443-1449.
67. Zhang, D., et al., Circulating zonulin levels in newly diagnosed Chinese type 2 diabetes patients. *Diabetes research and clinical practice*, 2014; 106(2): 312-318.
68. Ohlsson, B., M. Orho-Melander, and P.M. Nilsson, Higher Levels of Serum Zonulin May Rather Be Associated with Increased Risk of Obesity and Hyperlipidemia, Than with Gastrointestinal Symptoms or Disease

Manifestations. International journal of molecular sciences, 2017; 18(3): 582.

69. Moreno-Navarrete, J.M., et al., Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. PloS one, 2012; 7(5): e37160.
70. Leffler, D.A., et al., A randomized, double-blind study of larazotide acetate to prevent the activation of celiac disease during gluten challenge. The American journal of gastroenterology, 2012; 107(10): 1554-1562.
71. Kelly, C., et al., Larazotide acetate in patients with coeliac disease undergoing a gluten challenge: a randomised placebo-controlled study. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2013; 37(2): 252-262.
72. Whiteley, P., et al., The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten-and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. Nutritional neuroscience, 2010; 13(2): 87-100.
73. Ghalichi, F., et al., Effect of gluten free diet on gastrointestinal and behavioral indices for children with autism spectrum disorders: a randomized clinical trial. World Journal of Pediatrics, 2016; 12(4): 436-442.
74. Heberling, C.A., P.S. Dhurjati, and M. Sasser, Hypothesis for a systems connectivity model of autism spectrum disorder pathogenesis: Links to gut bacteria, oxidative stress, and intestinal permeability. Medical hypotheses, 2013; 80(3): 264-270.

10.EKLER

10.1. EK 1

GAZİ ÜNİVERSİTESİNDE

OKUL ÇAĞINDAKİ ÇOCUK HASTALARDA YAPILACAK

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” DA YER ALACAK

“SAĞLIKLI ÇOCUKLAR” İÇİN

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ

Araştırma Projesinin Adı: Otizm spektrum bozukluğu (OSB) olan çocuklarda serum zonulin düzey tayini

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. Buket Dalgıç

Diğer Araştırmacıların Adı: Prof. Dr. Elvan İşeri, Arş. Gör. Dr. Selen Karagözlü

Sevgili.....

Benim adım Dr..... Senin yaşlarında olup da OSB hastalığı olan çocuklarda bir araştırma yapıyoruz. OSB’li hastaların sindirim sistemi problemleri için bir çalışma yaparak onların tedavilerine yardımcı olabilmeyi hedefliyoruz. Bu nedenle OSB olan çocuklarda bazı laboratuvar testleri çalışacağız. Bu araştırmayı sürdürebilmek için hasta çocukların yanı sıra onların yaşlarına yakın olan sağlıklı çocukları da araştırmaya katmamız gerekiyor. Araştırmaya ben, Dr..... ve bazı başka doktorlar katılacaklar. Eğer sen de bu araştırmaya katılmayı istersen yapılacak olan işlem, senden az miktarda kan alınması ve senin sonuçlarının OSB olan çocukların sonuçlarıyla karşılaştırılmasıdır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz ancak senin adını ve tahlil sonuçlarını kimseye açıklamayacağız. Eğer bu çalışmaya katılırsan hasta çocukların daha güvenilir ve başarılı bir şekilde tedavi edilmesine katkı sağlamış olacaksın. Bu araştırma hakkında anne ve babana bilgi vereceğiz ve senin de bu çalışmaya katılıp katılmaman için onlardan izin alacağız. Sen de bu konuyu anne ve/veya baban ile konuşabilirsin. Eğer katılmak istemezsen hiç kimse sana kızmaz veya küsmez. Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek soruları bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim aşağıda yazıyor.

Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan lütfen aşağıya adını ve soyadını yazarak imzanı at. Daha sonra bu formun bir kopyası sana ve ailene verilecektir.

Çocuğun adı- soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırmacının adı-soyadı, unvanı

Adres:

Tel:

İmza:



10.2. EK 2

GAZİ ÜNİVERSİTESİNDE

ÇOCUKLARDA YAPILACAK OLAN

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” DA YER ALACAK

“SAĞLIKLI ÇOCUĞUN EBEVEYNİNE” YÖNELİK

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ

Araştırma Projesinin Adı: OSB olan çocuklarda serum zonulin düzey tayini

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. Buket Dalgıç

Diğer Araştırmacıların Adı: Prof. Dr. Elvan İşeri, Arş. Gör. Dr. Selen Karagözlü

Değerli anne ve babalar;

Benim adım Dr..... OSB hastalığı olan çocuklarda onların izlem ve tedavilerine katkıda bulunacağını düşündüğümüz bir araştırma yapıyoruz. Bu nedenle OSB olan çocuklarda bazı laboratuvar testleri çalışacağız. Bu araştırmayı sürdürebilmek ve sonuçları doğru değerlendirilebilmek için, elde ettiğimiz verilerin aynı yaş gruplarında sağlıklı çocukların verileri ile karşılaştırılmalarına gereksinim vardır.

Araştırmaya ben, Dr..... ve bazı başka doktorlar katılacaklar. Eğer sizin çocuğunuzun da bu araştırmaya katılmasını isterseniz çocuğunuzdan istenen tek şey, otizmlili hastalarda çalışacağımız laboratuvar testlerinin aynıları için az miktarda kan vermenizdir. Çalışma sonucunda, OSB hastalarının sonuçları, sağlıklı çocukları ile karşılaştırılacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz ancak sizin çocuğunuzun adını ve tahlil sonuçlarını kimseye açıklamayacağız. Eğer çocuğunuzun bu çalışmaya dahil edilmesine izin verirseniz otizm isimli hastalığa sahip olan akranlarının daha güvenilir ve başarılı bir şekilde tedavi edilmesine katkı sağlamış olacaksınız. Bu araştırma hakkında çocuğunuza da bilgi vereceğiz ve ondan da bu çalışmaya katılması için izin alacağız. Aklınıza şimdi gelen veya daha sonra gelecek soruları bana sorabilirsiniz. Telefon numaram ve adresim aşağıda bulunmaktadır.

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

Çocuğun adı- soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırcının adı-soyadı, unvanı

Adres:

Tel:

İmza:



10.3. EK 3

GAZİ ÜNİVERSİTESİNDE ÇOCUK HASTALARDA YAPILACAK OLAN

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR”

İÇİN “EBEVEYN” BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: OSB olan çocuklarda serum zonulin düzey tayini
Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. Buket Dalgıç
Diğer Araştırmacıların Adı: Prof. Dr. Elvan İşeri, Arş. Gör. Dr. Selen Karagözlü

Değerli anne ve babalar;

Kliniğimizde “OSB olan çocuklarda serum zonulin düzey tayini yapılması planlanmaktadır. Çocuğunuzun bu araştırmaya davet edilmesinin nedeni onda OSB hastalığının görülmüş olmasıdır. Bu araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çocuğunuzun araştırmaya katılması konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Araştırma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer çocuğunuzun katılmasını isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma hakkında çocuğunuza da bilgi vereceğiz ve ondan da bu araştırmaya katılması için izin alacağız.

Araştırmanın amaçları ve dayanağı nelerdir, çocuğumdan başka kaç kişi bu araştırmaya katılacak?

OSB, üç yaşından önce başlayan, ömür boyu süren, sosyal etkileşime ve iletişime zarar veren, sınırlı ve tekrarlanan davranışlara yol açan beynin gelişimini engelleyen bir rahatsızlıktır. OSB sıklığı giderek artmaktadır. Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli genetik faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir. OSB olan çocuklarda sindirim sistemi ile problemler sık görülmektedir. Hastaların ishal, kabızlık, kötü kokulu gaz ve dışkı, karın şişliği, karın ağrısı, kusma gibi şikayetleri olabilir. OSB’li çocukların bağırsaklarında besin maddelerinin geçirgenliği artarak, besin hassasiyeti ortaya çıkabilir. Buradan yola çıkılarak, bu çocuklarda glütensiz diyet denenmiş, bazı araştırmalarda davranışlarında düzelme olduğu, bazı araştırmalarda ise diyetten fayda görmedikleri

bildirilmiştir. Çölyak hastalarında tanı için bakılan kan belirteçlerinden birinin (zonulin), sinir sistemini etkileyen hastalıklarda diğer belirteçlere göre daha anlamlı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, OSB hastalarında serum zonulin düzeyini ve diğer Çölyak belirteçlerinin kan seviyelerini göstermeyi amaçladık. Bu belirteçlerin gösterilmesi hastalar için uygun diyet planlanmasına yardımcı olabilir veya tedavi için gelecekte başka seçeneklerin geliştirilmesinde bir basamak rolü oynayabilir.

Araştırmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü'nde takip edilen Çölyak tanısı olmayan OSB grubu çocuklar alınacaktır, araştırma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda gerçekleştirilecektir. Elde edilen bilgilerin incelenebilmesi için 2-18 yaş arası en az 50 hastaya ulaşmayı hedeflemekteyiz.

Çocuğum bu araştırmaya katılmalı mı?

Çocuğunuzun bu araştırmada yer alıp almaması tamamen size bağlıdır. Eğer katılmasına izin verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda çocuğunuzu araştırmadan çekebilirsiniz. Eğer katılmasını istemezseniz veya araştırmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından çocuğunuz için en uygun tedavi planı uygulanmaya devam edilecektir. Aynı şekilde araştırmayı yürüten doktor çocuğunuzun araştırmaya devam etmesinin yararlı olmayacağına karar verebilir ve onu araştırma dışı bırakabilir.

Çocuğum bu araştırmaya katılırsa onu neler bekliyor?

Bu araştırma kapsamında çocuğunuzdan Çocuk Gastroenteroloji poliklinik hemşiresi tarafından 1 tüp kan alınacaktır. Kan örneği uygun koşullarda saklanarak serumdan zonulin çalışılacaktır. Çocuğunuzun bilgileri bilgisayar sistemine kaydedilerek, araştırmada incelenecektir. Bu araştırmanın sonuçlarının değerlendirilme süresi 1 yıl olarak düşünülmüştür.

Araştırmanın riskleri ve rahatsızlıkları nelerdir, çocuğumun görebileceği olası bir zarar durumunda ne yapılacaktır?

Araştırmamız sırasında size herhangi bir girişim yapılmayacağı için bir risk oluşmayacaktır.

Çocuğumun bu araştırmada yer almasının yararları nelerdir?

Bu belirteçlerin gösterilmesi hastalar için uygun diyet planlanmasına yardımcı olabilir veya tedavi için gelecekte başka seçeneklerin geliştirilmesinde bir basamak rolü oynayabilir.

Çocuğumun bu araştırmaya katılmasının maliyeti nedir?

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

Çocuğumun kişisel bilgileri nasıl kullanılacak?

Araştırma doktorunuz çocuğunuz ile ilgili kişisel bilgileri, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak çocuğunuzun kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, çocuğunuz ile ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Araştırmanın sonunda, sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız vardır. Araştırma sonuçları tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak çocuğunuzun kimliği açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?

Araştırma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI-SOYADI: Prof. Dr. Buket Dalgıç, Pediatrik Gastroenteroloji Bilim Dalı

TELEFON: 0312 202 4148

ADI-SOYADI: Prof. Dr. Elvan İşeri, Çocuk Ruh Sağlığı Anabilim Dalı

TELEFON: 0312 2025426

ADI-SOYADI: Dr. Selen Karagözlü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bilim Dalı

TELEFON: 0312 202 4148

(Katılımcı çocuğun ebeveyninin beyanı)

GÜTF Pediatrik Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda, Prof. Dr. Buket Dalgıç tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Çocuğumun araştırmaya katılması konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer çocuğumun araştırmaya katılmasını reddedersem, bu durumun çocuğumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden çocuğumu araştırmadan çekebilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Buket Dalgıç, Prof. Dr. Elvan İşeri ve Arş. Gör. Dr. Selen Karagözlü' ye telefon numaralarından ulaşabileceğimi biliyorum.

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

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Tarih:

Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırmacının adı-soyadı, unvanı

Adres:

Tel:

İmza:

10.4. EK 4

GASTROİNTESTİNAL BELİRTİ DEĞERLENDİRME ANKETİ [57]

1. Huzursuzluk
 - 0 Yok
 - 1 Nadiren
 - 2 Sık sık
 - 3 Her zaman
2. Karın Ağrısı
 - 0 Yok
 - 1 Nadiren
 - 2 Uzun ve günlük aktiviteyi etkileyecek kadar
 - 3 Ciddi ve günlük aktiviteyi engelleyecek kadar
3. Mide yanması
 - 0 Yanma yok
 - 1 Nadiren ve kısa süreli yanma var
 - 2 Sık ve uzun süreli yanma, tedaviye ihtiyaç duyuyor
 - 3 Devamlı yanma var ve antiasitlerle geçici rahatlama sağlanabiliyor
4. Reflü
 - 0 Yok
 - 1 Nadiren
 - 2 Günde 1 ya da 2 kez reflü var, tedaviye ihtiyaç duyuyor
 - 3 Günde birçok kez reflü var, antiasitlerle yeterli rahatlama sağlanamıyor
5. Bulantı / Kusma:
 - 0 Bulantı yok
 - 1 Nadiren ve kısa süreli bulantı var
 - 2 Sık ve uzun süreli bulantı var, kusma yok
 - 3 Devamlı bulantı var ve kusma var
6. Karında Guruldama
 - 0 Yok
 - 1 Nadiren
 - 2 Sık sık
 - 3 Her Zaman
7. Karında Şişkinlik
 - 0 Yok
 - 1 Nadiren
 - 2 Sık sık
 - 3 Sosyal performansı ciddi şekilde etkileyen sürekli rahatsızlık

8. Geçirme

- 0. Yok
- 1. Nadiren
- 2. Sık sık
- 3. Her zaman

9. Gaz

- 0. Yok
- 1. Nadiren
- 2. Sık sık
- 3. Her zaman

10. Azalmış Dışkılama Sıklığı

- 0. Günde 1 kez dışkılama
- 1. 3 günde 1 kez dışkılama
- 2. 5 günde 1 kez dışkılama
- 3. Haftada 1 kez ya da daha seyrek dışkılama

11. Sert Dışkı Kıvamı

- 0. Normal
- 1. Biraz sert
- 2. Sert
- 3. Ayrı ayrı sert parçalar halinde, bazen ishal ile karışık

12. Artmış Dışkılama Sıklığı

- 0. Günde 1 kez dışkılama
- 1. Günde 3 kez dışkılama
- 2. Günde 5 kez dışkılama
- 3. Günde 7 kez ya da sık dışkılama

13. Yumuşak Dışkı Kıvamı

- 0. Normal
- 1. Yumuşak, şekilli
- 2. Sıvı, şekilsiz
- 3. Su kıvamında

14. Acil dışkılama ihtiyacı

- 0. Yok
- 1. Nadiren
- 2. Sık sık
- 3. Dışkı kontrolü yok

15. Yetersiz Dışkı Boşaltma Hissi

0. Yok
1. Nadiren dışkılama zorluğu var
2. Sık sık dışkılama zorluğu var
3. Her zaman, dışkılama çok zor



11.ÖZGEÇMİŞ

Adı : Selen

Soyadı : Karagözlü

Doğum Yeri ve Tarihi : Siirt/1988

Eğitim :

- Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı (Tıpta Uzmanlık)- Halen devam ediyor
- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (Lisans)-2012
- Ankara Fen Lisesi-2006
- Ankara Gülen Muharrem Pakoğlu İlköğretim Okulu-2002

Yabancı Dil : İngilizce

Bilimsel Etkinlikleri:

- 1- Akkuzu, E., et al., *Belirtidan Taniya Organofosfat İntoksikasyonu*. Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi, 2017.
- 2- 59. Kahraman, K., et al., *Factors influencing the contraceptive method choice: a university hospital experience*. Journal of the Turkish German Gynecological Association, 2012. **13**(2): p. 102.