

**HAYATIN İLK İKİ HAFTASINDA ÜRİNER SAFRA ASİT
DÜZEYLERİ VE BU DÜZEYLERİN FİZYOLOJİK
HİPERBİLİRUBİNEMİ DERECESESİ İLE İLİŞKİSİ**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr.ERCÜMENT GÜDÜCÜOĞLU

9.12.1994

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DÜZENLEYİCİLERİNE

İstanbul - 1994

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık öğrenciliğim süresince her konuda yardımlarını esirgemeyen bütün hocalarıma ve Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Özdemir İlter'e en derin saygılarımı sunarım.

Tezimin planlanması ve yürütülmesinde büyük desteğini gördüğüm tez yöneticim Prof.Dr.Ahmet Aydın'a çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Kim.Yük.-Müh.Gülsev Kavunoğlu'na ve Nadir Hatemi Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi bildiririm.

Dr.Ercüment Güdücüoğlu

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Safra Asitlerinin Temel Özellikleri.....	2
2.2. Karaciğerde Safra Oluşumu.....	3
2.3. Safra Asidi Biyosentezi.....	6
2.4. Safra Asitlerinin Atılımı.....	9
2.5. Safra Asidi Biyosentezinin Kontrolü.....	10
2.6. Safra Asitlerinin Fonksiyonları.....	10
2.7. Yenidoğanda Safra Asidi Metabolizması.....	10
2.8. Yenidoğanda Bilirubin Metabolizması.....	12
2.9. Yenidoğan Fizyolojik Sarılığı.....	13
3. ARAÇ VE YÖNTEMLER.....	15
3.1. Araçlar.....	15
3.2. Kimyasal Maddeler.....	15
3.3. Kimyasal Çözeltiler.....	16
3.4. Örneklerin Toplanması.....	17
3.5. Tayin Yöntemi.....	18
4. SONUÇLAR.....	21
5. TARTIŞMA.....	28
6. ÖZET.....	31
KAYNAKLAR.....	33

1. GİRİŞ

Hayatın ilk günlerinde insan organizmasında meydana gelen metabolizma faaliyetleri büyük çocuk ve erişkindekinden çok farklıdır. Fetal dönemde metabolik yükü üslenmiş olan plasenta, doğumda ayrılınca henüz matürasyonu tamamlanmamış olan karaciğer o anki kapasitesinin üzerinde görevleri yüklenmek zorunda kalır. Yaşamın ilk günlerinde karaciğer işlevlerini gecikmesiz ve tam olarak yerine getirecek olgunluğa sahip değildir. Özellikle safra asidi ve bilirubin metabolizmasındaki aksamalardan dolayı bu maddelerin kanda birikimi sözkonusudur. Nitekim Pfferri'nin 1990 yılında yayınladığı bir yazıda, yenidoğanda safra asidi retansiyonu ile indirekt hyperbilirubineminin karaciğerin maturasyon eksikliğine bağlı olarak benzer şekilde meydana gelebileceği vurgulanmaktadır(8).

Bu çalışmada; yenidoğan döneminde kandaki safra asit düzeylerinin göstergesi olarak idrardaki safra asit düzeylerini ölçerek, çocuklar ve erişkinlerin düzeyleri ile karşılaştırmayı ve fizyolojik hyperbilirubinemi ile safra asit düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SAFRA ASİTLERİNİN TEMEL ÖZELLİKLERİ

Safra asitleri 24 karbonlu siklopentanoperhidro fenantren halkasından oluşan endojen kimyasal maddelerdir. Yapıları dolayısıyla hem hidrofilik hemde hidrofobiktirler (Amfofilik) safra asitleri karaciğerde kolesterolde sentezlenir(32,34).

KOLİK ASİT: (3 alfa, 7 alfa, 12 alfa-tirihidroksi 5 β -kolanik asid)
(C₂₄H₄₀O₅) (Şekil 2.1)

Mol ağırlığı: 408.56 Dalton-Sodyum tuzu halinde bulunan sodyum kolat (C₂₄ H₃₉ O₅ Na) kristal şeklindedir. Koleretik etkisinden dolayı tıpta kullanılır.

KENODEOKSİKOLİK ASİT: (3 alfa, 7 alfa-dihidroksi 5 β kolanik asit) (C₂₄ H₄₀ O₄) (Şekil 2.1)

Mol ağırlığı: 392 daltondur. Etil asetat ve heptanla kristaller oluşturur. Safra taşı oluşumunu önlediği için ilaç olarak kullanılabilir.

DEOKSİKOLİK ASİT: (3 alfa, 12 alfa-Dihidroksi-5 β kolonik asit)
(C₂₄ H₄₀ O₄) (Şekil 2.1)

Mol ağırlığı: 392.56 daltondur. Alkolle kristaller oluşturur. Kole-retik etkisinden dolayı tıpta kullanılır.

LİTOKOLİK ASİT: 3 alfa-hidroksi kolonik asit (C₂₄ H₄₀ O₃)

Mol ağırlığı: 376.56 daltondur. Alkolde altıgen yapraklar ve asetik asitte de prizmatik kristaller oluşturur (Şekil 2.1).

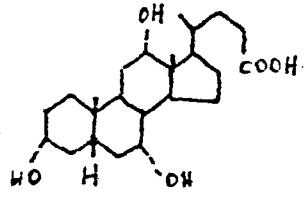
URSODEOKSİKOLİK ASİT: 3 alfa, 7 β -dihidroksi kolonik asit
(C₂₄ H₄₀ O₄) (Şekil 2.1)

Mol ağırlığı: 392.56 daltondur. Alkolde sert ve keskin plaklar oluşturur.

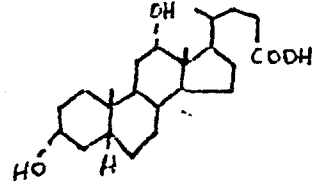
Safranın barsağa akışını kolaylaştırdığı için tıpta ilaç olarak kullanılabilir.

2.2. KARACİĞERDE SAFRA OLUŞUMU

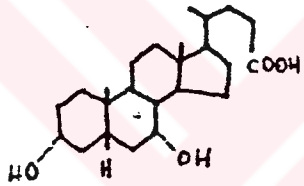
Safra sıvısı karaciğerin temel yapısını oluşturan poligonal hücrelerinde oluşturulur. Kabaca yapı olarak kolesterol, fosfolipid ve miçeller oluşturarak bu maddeleri çözünür halde tutan safra tuzlarından oluşur.



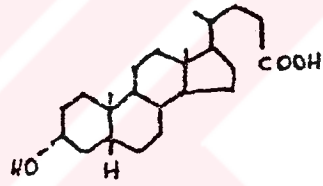
KOLİK ASİD



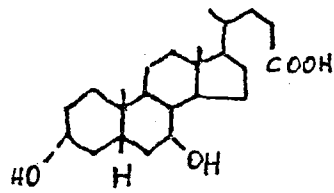
DEOKSİKOLİK ASİD



KENODEOKSİKOLİK ASİD



LİTOKOLİK ASİD



URSODEOKSİKOLİK ASİD

Şekil 2.1

Hepatositlerde sentezlenen safra, hücrelerin etrafında bulunan safra kanaliküllerine salgılanır. Sonra kanaliküller birleşerek hepatik safra kanallarını oluştururlar. Safra kanalları karaciğer parankiminden çıktıktan sonra koledok kanalının başlangıç yerinde bulunan safra kesesi kanalı ile birleşir. Safra burada depolanır. Ağız yolu ile alınan yiyecekler midede asit ortamda kısmen sindirildikten sonra mide salgıları ile düşük pH'lı akışkan bir karışım oluşturarak duodenuma gelir. Kimusun duodenuma ulaşması bazı fizikokimyasal etkilerle safra asidi sentezi, safra kesesinde depolanmış halde bekletilen safranın barsağa akıtılmasını uyaran birtakım hormonların salgılanmasına sebep olur(34). (Kolesistokinin - Pankreozmin). Safra kesesi hareketlerinde sorumlu hormonların dışında parasempatik etki gösteren N.vagus'ta rol alır.

Safranın içerik olarak tamamına yakın kısmı sudur. Geriye kalan % 3'lük katı bölümünde ise normal konsantrasyonda, sodyum, potasyum, klor, fosfolipid ve kolesterol; artmış konsantrasyonda konjuge bilirubin, safra tuzları, dışarıdan vücuda alınan ilaçlar, detoksifiye edilmiş toksik maddeler, bulunur.

Safra kesesi sadece pasif bir safra deposu olmayıp kese cidarından safranın sıvı kısmını emerek konsantre eder.

Safra asitleri organizmadaki akibetlerine göre yapı değiştirdiklerinden primer, sekonder ve tersiyer olarak 3'e ayrılırlar.

1- Primer safra asitleri: Karaciğerde kolesterolden sentezlenen kolik ve kenodezoksikolik asitlerdir.

2- Sekonder safra asitleri: İnce barsaklarda primer safra asitlerinin barsak florası etkisiyle dekonjugasyonu ile oluşan deoksikolik asit ve litokolik asittir.

3- Tersiyer safra asitleri: Karaciğere enteropehatik sirkulasyon yolu ile gelen litokolik asidin 7- β epimerizasyonu ile oluşan ursodeoksikolik asittir.

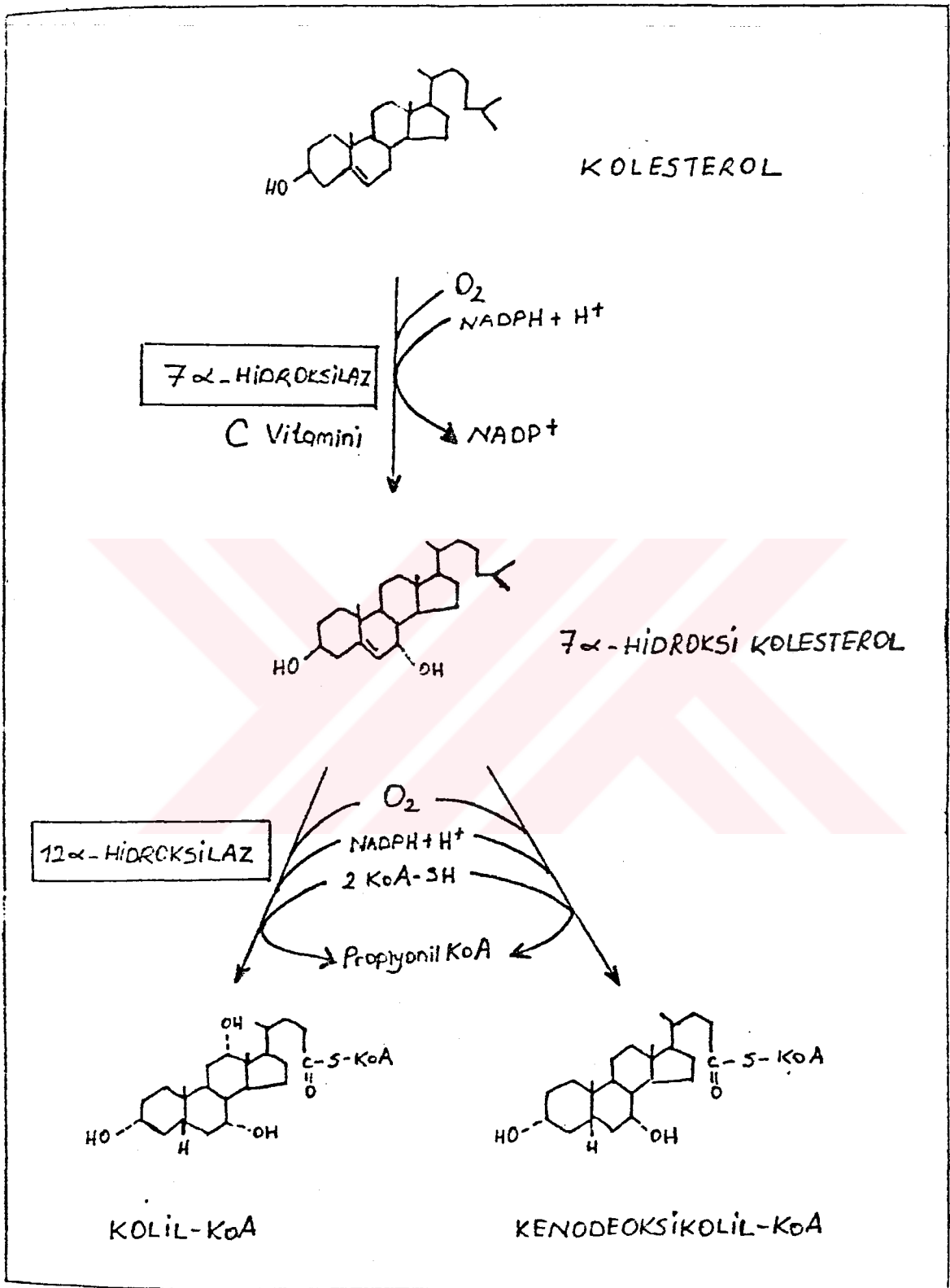
2.3. SAFRA ASİDİ BİOSENTEZİ

Karaciğerde kolesterolden oluşan primer safra asidi sentezinde ilk basamak 7-alfa hidroksilasyonudur. Bu işlem için spesifik enzim dışında C vitamini, sitokrom P₄₅₀ ve NADPH'ta gerekir. Sonuçta oluşan 7 alfa hidroksikolesterol iki ayrı enzimatik yol ile kolil-KoA veya kenodeoksikolil KoA şeklini alır. Daha sonra endoplazmik retikulumda son ürünlerden KOA'lar ayrılır. Serbest kalan safra asitleri taurin ve glisin ile amidleşerek "konjuge primer safra asitlerine" dönüşürler. Glisin ile konjugasyon değerinden daha fazla oluşur. Tıkanma sarılıklarında taurin ile konjugasyonda artma meydana gelir (Şekil 2).

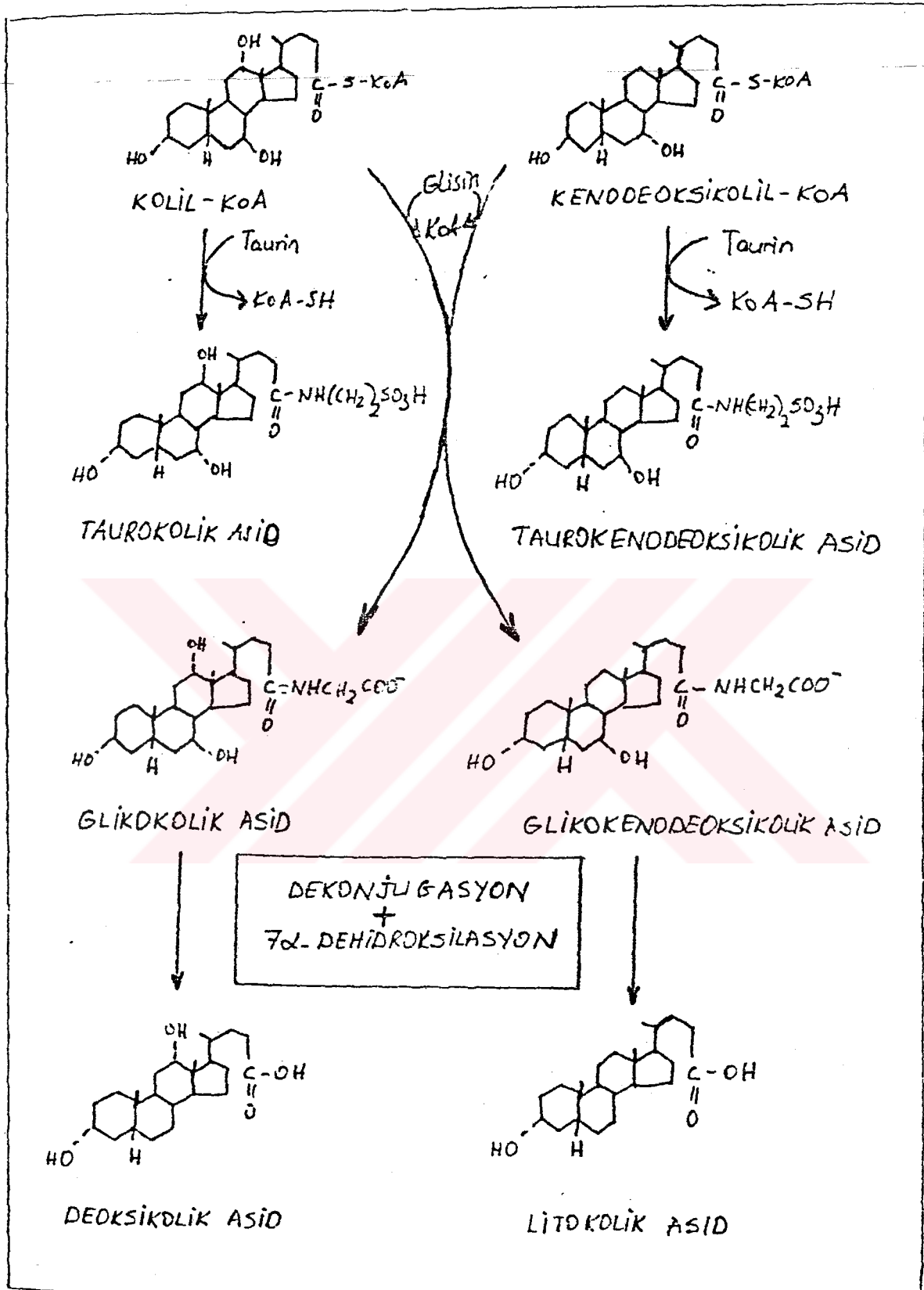
Karaciğerde sentezlenen safra, safra kesesinde konsantre edildikten sonra koledok kanalı ile duodenoma salınır. İnce barsaklara ulaşan primer safra tuzlarının % 95 gibi büyük bir bölümü ileumun distal bölümünden geri emilerek enterohepatik dolaşıma katılırlar. Geri kalan % 5'lik bölümü ise flora bakterileri tarafından etkilenerek önce dekonjugasyon sonrada dehidroksilasyona uğrayarak sekonder safra asitlerine dönüşürler (Şekil 3). Böylece oluşan deoksikolik ve litokolik asit % 70 oranında ileumdan geri emilir. Kalan % 30'luk kısım ise dışkı yoluyla atılır.

Safra asitlerinin geri emilimi büyük oranda distal ileumdan aktif transport yolu ile olur. Bunun yanında küçük bir bölümü (Non-konjuge safra asitleri ve dihidroksi safra asitlerinin glisin konjugatları) kolon ve jejunumdan pasif transport yolu ile geri emilir.

Sonuç olarak barsağa boşaltılan safranın yaklaşık % 98'i tekrar geri emilirken % 2'lik bölümü dışkı yolu ile dışarı atılmaktadır. Barsakta Litokolik asidin suda erirliği düşük olduğu için geri emilimi çok az miktardadır. Ayrıca bu madde hepatotoksik olduğu için kolestazla giden karaciğer hastalıklarının etyolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir(2,26,27).



Şekil 2.2. Primer safra asitleri sentezi



Şekil 2.3. Sekonder safra asitleri sentezi

Barsaklardan geri emilen safra asitleri portal sistemde çok yüksek seviyelerde bulunmasına karşın sistemik dolaşımdaki düzeyleri düşüktür. Bunun sebebi vena porta ile gelen kandaki safra asitlerinin karaciğer tarafından tutulmasıdır. Karaciğer hastalıklarından ve ekstrahepatik safra kanalı tıkanıklıklarında serum safra asidi seviyeleri yükselir. Bunun yanında beslenme sırasında safra dolaşımı hızlandığı için serum safra asitlerinde de yükselme saptanır. Postprandial safra asidi tayini karaciğer hastalıklarında duyarlı ve özgün bir testtir(10,21).

2.4. SAFRA ASİTLERİNİN ATILIMI

Safra asitlerinin çoğu dışkı, az bir kısmı ise idrar yolu ile atılırlar. İdrarla atılan safra asitlerinin yarısından biraz daha fazla bir kısmı konjuge, geri kalan kısmı ise nonkonjügedir. İdrarla atılan safra asit miktarı gün içinde oldukça sabittir. Yemeklerden ve böbrek fonksiyonlarının azalmasından etkilenmez. Bu yüzden karaciğer hastalıklarının tanısında safra asitlerinin idrarda ölçümü, serumda ölçmekten daha değerlidir(4).

Safra asitlerinin sindirim işlevindeki görevinden başka bir diğer işlevide kolesterol atılımıdır. Kolesterolün % 50'si safra asitlerinin dışkıya karışması yolu ile atılır.

Safra asitlerinin dışkı ile atılması özellikle Litokolik asit atılımı açısından önemlidir.

Çünkü litokolik asit öncelikle hepatosit ve eritrosit membranına olmak üzere tüm hücre membranlarına toksik etki gösterir. Bu etki sonucu oluşan hepatosit dejenerasyonu ve safra kanallarındaki enflamasyon safra akışının azalmasına yol açar(2,26,27). Bu toksik etkiyi engellemek için portal sistemden gelen Litokolik asit karaciğerde sulfatlanır. Sonuçta dışkı ve idrarla atılması kolaylaşır.

2.5. SAFRA ASİDİ BİYOSENTEZİNİN KONTROLÜ

Safra asidi biyosentezinde 7-alfa hidroksilaz ve HMG-KoA redüktaz hız kısıtlayıcı basamaklardır. Enterohepatik dolaşım ile karaciğere gelen safra asidi miktarı feed-back inhibisyon mekanizması ile sentezi kontrol etmektedir.

2.6. SAFRA ASİTLERİNİN FONKSİYONLARI

1- Safra akışının düzenlenmesi: Safra içinde bulunan bilirubin, kolesterol ve fosfolipidleri eriyik halinde tutarak barsağa boşaltılmasına yardımcı olurlar.

2- Lipidlerin eriyebilirliğini sağlamak ve emilmesini kolaylaştırmak.

Safra asitleri kimyasal olarak amfofilik ve deterjan etkili maddelerdir. Yiyecekler yolu ile barsaklara ulaşan serbest yağ asitleri ve monogliseritler safra asitleriyle miçeller oluştururlar. Böylece yağ emilimini kolaylaştırılır.

2.7. YENİDOĞANDA SAFRA ASİDİ METABOLİZMASI

Fetusta safra asidi sentezi ve konjugasyonu ilk olarak 12-16 haftalarda başlamaktadır(20,22).

Sağlıklı erişkinde safra asidi sentezi, barsağa boşaltılması, geri emilmesi ve karaciğerde tekrar işlenmesi bir denge içinde olmaktadır. Bu denge herhangi bir basamaktaki bozukluk sonucu değişime uğrarsa safra asitlerinin serum, idrar ve dışkıdaki miktarlarında değişiklikler olur.

Yenidoğanda karaciğer fonksiyonları erişkindekinden çok farklıdır(45). Birçok metabolik fonksiyon yetersiz ve gecikmiş olarak yapılabilir. Örnek olarak bilirubin ve safra asidi metabolizmaları, ilaç eksresyonları ve pıhtılaşma faktörü sentezindeki yetersizlikler gösterilebilir. Bilirubin metabolizmasındaki konjugasyon yeterince yapılamadığı için yenidoğanın fizyolojik sarılığı oluşur. Yenidoğan karaciğerinde sentezlenen safra asitleri barsaklardan emildikten sonra tekrar karaciğere geldiklerinde alınıp, detoksifiye edilip tekrar barsağa boşaltılma işlemi tam olarak yapılamaz. Böylece sistemik dolaşıma daha fazla safra asidi karışmaya başlar. Bunlara paralel olarak; beslenme ile beraber meydana gelen barsak florasının etkileşmesi sonucu oluşan Litokolik asidin enterahepatik sirkulasyonla karaciğerde sulfatlanarak detoksifiye edilmesi yeterince yapılamadığından karaciğerde zaten var olan fonksiyon eksikliği kolestatik etki sonucu dahada artmaktadır (Fizyolojik kolestaz)(2,12,26).

Yenidoğanda safra asitlerinin metabolizma ve transportundaki yetersizlikleri araştırmak için yapılan çalışmalarda şu sonuçlar elde edilmiştir (Balistreri ve ark. 1983)(35).

- 1- Karaciğerin safra asidi uptake'i azalmıştır.
- 2- İntrasellüler safra asidi tutulumu ve transportu azalmıştır.
- 3- Karaciğerde safra asitlerinin biotransformasyonu (Konjugasyon ve sulfatasyon) azalmıştır.
- 4- Karaciğerin spesifik enzim aktiviteleri (Ligase, N-açil transferaz) düşük bulunmuştur.
- 5- Safra asidi sentezi erişkindekine göre kalitatif ve kantitatif olarak farklıdır.
- 6- Safra akım hızı erişkindekinden daha yavaştır.
- 7- Safra asidi havuzu daralmıştır
- 8- Duedonumda safra asidi seviyesi azalmıştır.
- 9- Safra asitlerinin ileumdan aktif transportu gecikmeli olarak gerçekleşmiştir.

Yukarıda anlatılan erişkin karaciğeri ile yenidoğan karaciğeri arasındaki safra asidi metabolizması bakımından mevcut farklılıklar normal şartlarda yenidoğan için herhangi bir tehlike oluşturmaz. Buna karşılık karaciğeri ilgilendiren konjenital hastalıklarda veya intrauterin kazanılmış enfeksiyonlar sonucu oluşan karaciğer bozukluklarında sınırlı yetersizliğinden bahsedilen mekanizmaların işlevlerini belirgin olarak aksattıkları gözlenir (Konjenital kolestatik hastalıklar, konjenital karaciğer enfeksiyonları)(13,31).

2.8. YENİDOĞANDA BİLİRUBİN METABOLİZMASI

Kanda bulunan konjuge olmamış bilirubin kaynağı % 75 oranında normal ömürlerini tamamlamış eritrositlerin yıkılmasından, geriye kalan % 25'i ise kemik iliğinde ineffektif eritropoездir. Bu şekilde kana karışan yağda erirliği fazla, suda erirliği düşük olan nonkonjuge bilirubin dolaşım yolu ile karaciğere gelir. Burada bilirubin konjuge edilerek vücuttan dışarı atılmaya uygun şekle dönüştürülür(32).

Hemoglobin hem ve globulin olarak ikiye ayrılır. hem'in yapısında 4 pirol halkası ve demir vardır. Retikuloendotelial sistem hücreleri ve makrofajların mikrozomlarında bulunan "hem oksidaz" enzimi hem'in halka yapısını bozarak pirol içeren bir zincir haline dönüştürür. Açığa çıkan demir tekrar kullanılmak üzere demir depolarına taşınır. Tetrapirel zinciri önce biliverdin, daha sonrada bilirubine dönüşür. 1 gr hemoglobinin yıkımı sonucu yaklaşık olarak 35 mg bilirubin oluşur.

Konjuge olmamış bilirubin suda erimez, yağda erir. Plazmada albumine bağlı olarak taşınır. 1 gr albumin 16 mg bilirubin bağlar. Plazma albumini bilirubin dışında daha birçok endojen ve eksojen maddelerin taşınmasında görev aldığı için bilirubin ve diğer maddeler arasında albumin bağlanma açısından bir konpetisyon sözkonusudur. Albuminle taşınması gereken bilirubin dışı maddelerin fazla olması, soğuk stresi, asidoz, esterleşmiş yağ asitleri bilirubinin bir kısmının serbest kalmasına sebep olur. Serbest kalan indirekt bilirubin yağda erirliği fazla olduğu için yağ

dokusuna ve yapısında fazlaca yağ dokusu bulunduran diğer vücut yapılarına (özellikle beynin bazal ganglionlarına) enfiltre olur.

Bu şekilde kan indirekt bilirubin seviyesi yüksek düzeye ulaşırsa kernikterus denilen ağır nörolojik sekellere sebep olur.

Kernikterus oluşma riski her yenidoğanda aynı değildir. Kanda serbest bilirubin seviyesini arttıran bazı etkenler (Asfiksi, Asidoz, esterleşmemiş yağ asitleri, soğuk stresi, hypoalbuminemi, hypoglisemi, aspirin, diazepam, sulfonamidler) kernikterus riskini çoğaltır(31).

İndirekt bilirubin karaciğer hücrelerine alınması "Y" proteininin rol oynadığı aktif bir transport mekanizması sayesinde olur. Karaciğere ulaşan bilirubinün % 80'i Üridil difosfat glükronil transferaz aracılığı ile glükronik asitle konjuge olur. Oluşumun % 30'u monoglükronid, % 70'i diglükronittir. Açlık, östrojenler, K₂ vitamini novabiosin ve sulfonamidler konjugasyon yapan enzimi inhibe ederler. Diğer taraftan fenobarbital, klorokin, pridoksin, androjenler ve tiroksin bu enzimleri aktive ederler. Konjuge olmuş bilirubin yağlı dokularda birikmez, albumine bağlanmaz ve böbrekle atılır.

Bilirubin karaciğerde konjuge olduktan sonra safra yollarına geçer. Barsağa ulaşan diglükronid ve monoglükronid şeklindeki bilirubin barsak bakterileri etkisiyle urobilinojene dönüşür. Ürobilinojenin bir kısmı barsaktan geri emilerek kana karışır, daha sonrada idrar yolu ile dışarı atılır. Geri kalan kısmı (Daha fazla) oksitlenerek sterkobilinojene dönüşür. Sterkobilinojen dışkıya normal rengini verir. Organizmada bilirubin metabolizması normal olarak işlediğinde kanda bilirubin seviyesi çok düşük seviyelerde seyrederek. Fakat bazı hastalıklarda ve yenidoğanın fizyolojik sarılığında kan bilirubin seviyesi normal sınırların çok üzerine çıkar. Bu durumda ikter meydana getirir.

2.9. YENİDOĞANIN FİZYOLOJİK SARILIĞI

Yenidoğanda fizyolojik hiperbilirubinemiye meyil vardır. Miadında doğmuş sağlıklı yenidoğanların yaklaşık % 60'ında, erken doğanların

% 80'inden doğumdan sonraki 2-3 günlerde başlayan gözle görülebilir ikter meydana gelir.

yenidoğanda fizyolojik sarılık oluşumunda etkisi olan faktörler şunlardır:

1- İndirekt bilirubin konjuge olarak direkt bilirubine dönüşmesi için gerekli glükuronil transferaz enzimi ilk günlerde yetersizdir. Bu enzim yeterli düzeylere ancak doğumdan sonra 6-7. günlerde ulaşır.

2- İndirekt bilirubin karaciğer hücresi tarafından alınma işlevi için gerekli olan akseptör proteinler (Y ve Z proteinleri) henüz tam gelişmemiştir. Z proteini fetal hayatta tam olarak gelişir. Y proteinini yani Ligandin ise ancak yaşamın 2. haftasında istenen düzeye ulaşır.

3- Barsak florası yenidoğanda tam gelişmemiştir. Direkt bilirubin ürobilinojene indirgenmesi eksiktir.

4- Ductus Venozus'un açık kalması durumunda vena portadaki kanın bir kısmı karaciğere uğramadan dolaşıma geçerek bilirubinemi arttırır.

5- Anneden kaynağını alan estrogen ve pregnandiol bilirubin konjugasyonunu önleyerek sarılığı arttırır.

6- Bilirubinün temel kaynağını oluşturan fetal eritrositlerin yaşam süresi normale kıyasla daha kısadır.

2-3. günlerde başlayan fizyolojik sarılık, 7-10. günlerde son bulur. Preterm bebeklerde başlangıç ve bitiş biraz daha gecikebilir. Fizyolojik sarılıkta maksimal bilirubin seviyesi 14-16 mg olabilmektedir. Bu sınır aşılsa sarılık yapan diğer sebepler araştırılmalıdır. Yüksek bilirubin seviyelerinde kandaki albumin kapasitesi sınırlı olduğu için serbest bilirubin artmaya başlar. Yağda erirliği fazla olan indirekt bilirubin yağdan zengin dokulara oturmaya başlar. Beynin bazal ganglionlar, Hipokampus ve subtalamik alanları bu durumdan etkilenerek Kernikterus denilen bilirubin ensefalopatisi oluşabilir.

3. ARAÇ VE YÖNTEM

3.1.ARAÇLAR

Derin dondurucu: BOSCH

Spektroflorimetre: Aminco, 125, JPF

Sep-pak (L₁₈) kartuş: Waters Associates

Su banyosu: Kotterman

Wako bilirubin Tester (Spektrofotometre)

3.2.KİMYASAL MADDELER

- Deiyonize su
- 7 α -HSD (sigma)
- β - NAD+ (Sigma)
- Azot Gazı (Habaş)
- Kenodeoksikolik asit tuzu (Sigma)
- Metanol (Atabay)
- Absolu Metanol (Merck)
- Aseton (Merck)
- Tris Tampon (Merck)
- EDTA (Merck)
- Kreatinin (Merck)
- Na-Tungstat (Merck)
- Pikrik asit
- HCl

3.3. KİMYASAL ÇÖZELTİLER

β -NAD⁺ (10.00 mM):

0.0300 gr madde tartılıp 500 ml'ye deionize su ile tamamlanır.

Bu çözelti buzdolabında en az 2 hafta dayanıklıdır.

Kenodeoksikolik asit standart stok çözeltisi: (1.00 mM) 0,2157 gr madde tartılarak deionize su ile 500 ml'ye tamamlanır.

Kenodeoksikolik asit standart çalışma çözeltileri: 100 μ M'lik standart çalışma çözeltisi: 1 μ M'lik stok standart çözeltiden 1 ml alınır, safra asitsiz idrar ile 10 ml'ye tamamlanır.

1- 10 μ M'lik standart çalışma çözeltisi: 100 μ M'lik çözeltiden 0,5 ml alınır, safra asitsiz idrar ile 5 ml'ye tamamlanır.

2- 20 μ M'lik standart çalışma çözeltisi: 100 μ M'lik çözeltiden 1 ml alınır safra asitsiz idrar ile 5 ml'ye tamamlanır.

3- 40 μ M'lik standart çalışma çözeltisi: 100 μ M'lik çözeltiden 2 ml alınır safra asitsiz idrar ile 5 ml'ye tamamlanır.

4- 80 μ M'lik standart çalışma çözeltisi. 100 μ M'lik çözeltiden 4 ml alınır safra asitsiz idrar ile 5 ml'ye tamamlanır.

Safra asitsiz idrar:

Temiz bir Sep-Pak kartuş 3 ml metanol ve 6 ml deionize su ile yıkanır. Önceden hazırlanmış normal bir kişinin idrarı saniyede 1 damla akacak şekilde kartuştan geçirilir. Böylece elde edilen idrar safra asiti içermez. Standart çalışma çözeltilerinde bu idrar kullanılır.

Seyreltik Metanol Çözeltisi: (1:1) 1 ölçek metanole 1 ölçek su ilave edilir.

Seyreltik aseton çözeltisi: (1.4) 1 ölçek asetona 4 ölçek su ilave edilir.

7 HSD

2.42 gr Tris Tampon (0,020 M) ve 0,5845 gr EDTA (2 mM) tartılıp 800 ml deionize suda çözülür. Daha sonra 1 N NaOH ile pH'sı 7.2'ye ayarlanır ve deionize su ile 1 litreye tamamlanır. Bu çözelti enzimin çözüneceği tampon çözeltisidir. Daha sonra bu çözeltinin 1 ml'si 1 ünite enzim içerecek tarzda stok enzim solusyonu hazırlanır. Bu çözelti -20'de en az 1 hafta dayanıklı olup kullanacağı zaman buz banyosunda tutulur.

Kreatinin standart stok çözeltisi: 150 mg saf kreatinin ve 1 ml derişik HCl su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti 1,5 mg/ml kreatinin içerir.

3.4. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Yaptığımız araştırmanın amacı: Sağlıklı yenidoğanlarda karaciğer fonksiyonlarının fizyolojik yetmezliğine bağlı olarak ortaya çıkan yenidoğan fizyolojik hiperbilirubinemisi ile safra asitlerinin artmış idrar seviyeleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaktır. Çeşitli hastalıklarda bu bilirubin ve idrar safra asit düzeyleri değişebileceğinden dolayı biz idrar ve kan örneklerimizi sağlıklı yenidoğanlardan topladık. Kontrol grubu olarak sağlıklı erişkin ve büyük çocuk idrar örnekleri kullanıldı.

Yenidoğanlarda araştırmaya alınma kriterleri

- 1- Term yenidoğan olmalı (Preterm, postterm Yenidoğanlar alınmadı)(7)
- 2- Normal ağırlık sınırlarında olmalı(7)
- 3- Kan grubu uyumsuzluğu olmamalı
- 4- Fizik muayenede sepsis, hemolitik anemi, depo hastalıkları, karaciğer hastalıkları gibi rahatsızlıkları düşündürecek bulgular olmamalı.

5- Ağızdan beslenmeye mani teşkil edecek hastalıklar olmamalı (Gastrointestinal sistem atrezileri gibi) olarak belirlendi. Bunları sağlamak için örnek alınması planlanan her yenidoğana fizik muayene kan grubu, hematokrit tetkiki yapıldı.

Örnek alınan yenidoğanlar: 1993 yılında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisinde yenidoğan bebeklerden yukarıdaki kriterlere uyanlar arasından rastgele seçilmiştir.

Kan örnekleri periferik kapiller kandan Hematokrit tüplerine alınmıştır. Daha sonra santrifuj yardımı ile kanın şekilli elemanları çöktürülerek hematokrit elde edilmiştir. Bu işlemden sonra üstte kalan serumda total bilirubin tayini yapılmıştır (Wako-Bilirubin tester, Spektrofotometrik).

Araştırmaya alınmak üzere seçilen bebeklerden idrar örneği almak için genital bölgeye yapışan plastik idrar kollektörleri kullanılmıştır. Toplanan idrarlar küçük cam şişeler içinde çalışma yapılincaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

Böylece her bebekten 1,5 ve 15 günlerde alınmış idrar ve kan örnekleri elde edilmiştir.

3.5 TAYİN YÖNTEMİ

a) İdrarda sülfatlaşmamış primer safra asitlerinin tayini için enzimatik florimetrik yöntem:

a-1) Safra asitlerinin idrardan ekstraksiyonu

İdrardaki safra asitlerini diğer maddelerden ayırmak için Sep-Pak C₁₈ kartuşlar kullanıldı. Kartuşlar önce 3 ml metanol ve sonra 6 ml distile su ile yıkandı. Daha sonra 2 ml idrar yıkanmış kartuşlardan yaklaşık olarak 1 damla/saniye hızla geçirildi. Bundan sonrası kartuşlar 2 defa 2 ml 1:4 oranında seyreltilen aseton ile yıkandı. Son olarak kartuşlardan 2 defa 1 ml absoli metanol geçirilerek safra asitleri elüe edilmiş oldu.

a-2) Elde edilen materyalin azot gazı altında kurutulması:

Kartuşlardan yukarıdaki işlemler sonucu elde edilen safra asitli absolu menatol 40°C'de su banyosunda azot gazı altında kuruyuncaya kadar buharlaştırıldı.

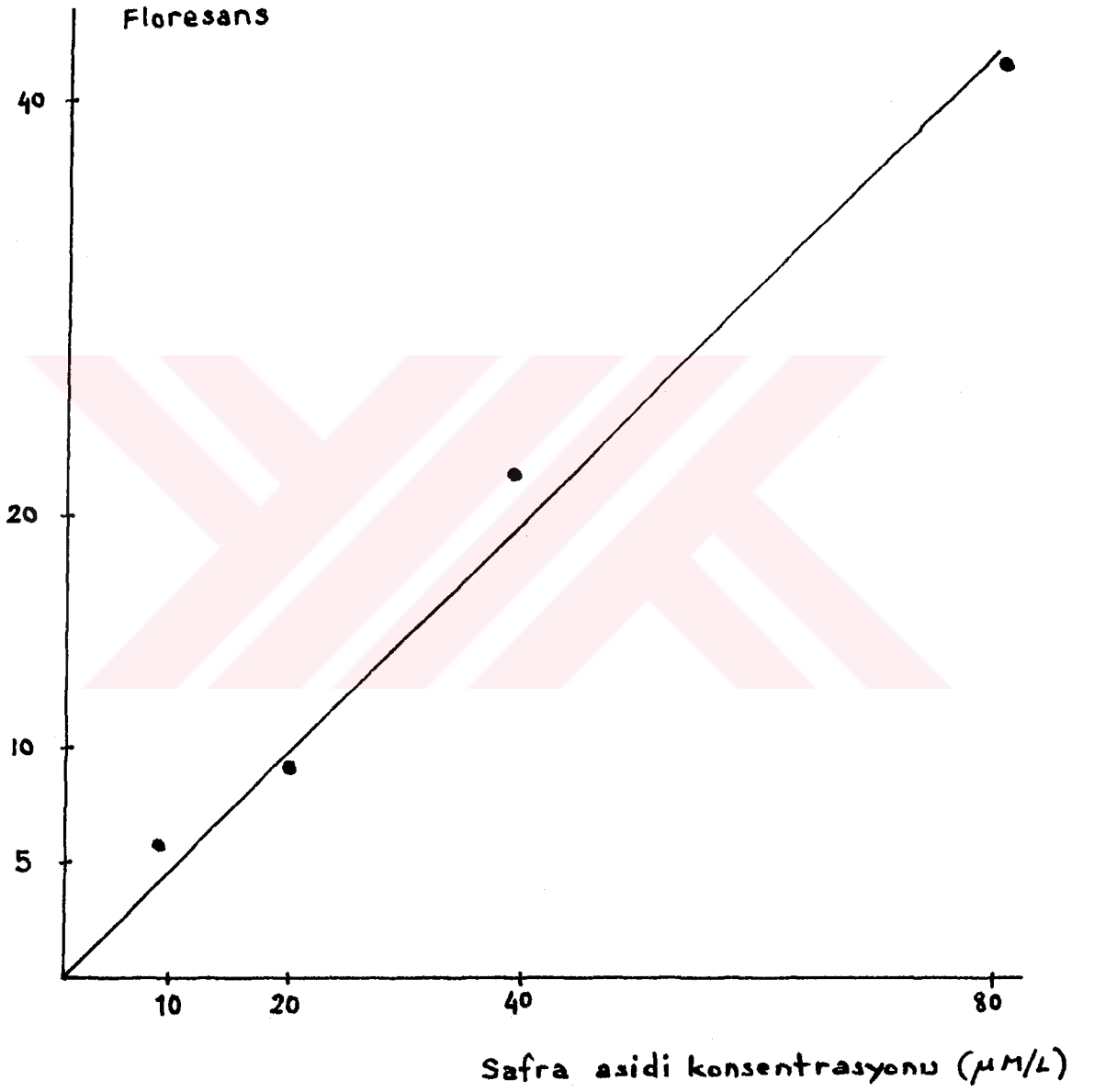
a-3) Enzimatik-Florimetrik Ölçüm Yöntemi

Florimetre örnekleri çalışmak üzere değişik yoğunluklardaki kinin sulfat çözeltileri ile kalibre edildi. Eksitasyon dalga boyu 340 nm. eksitasyon slit aralığı 20 nm'ye emisyon dalga boyu 455 nm'ye ve emisyon slit aralığı 20 nm'ye ayarlandı.

Florimetre ölçüme hazır hale getirildikten sonra kristal küvete 1.60 ml glisin-hidrazin tampon çözeltisi, 0,100 ml 7 α -HSD çözeltisi ve 0,200 ml. kör örneğinden alınan idrar konulur (Safra asidi içermeyen idrar). Alet bu çözelti ile sıfırlanır. Daha sonra 0.100 ml β -NAD+ eklenecek tekrar sıfırlama işlemi yapılır. Bu işlemden sonra aynı şekilde kristal küvetlere 1,60 ml glisin-hidrazin tamponu, 0,100 ml 7 α -HSD çözeltisi ve 0,200 ml örnek konur bir süre karıştırılarak floresansın stabilleşmesi sağlanır. Floresans sabitleşince küvete 0,100 ml β -NAD+ eklenerek reaksiyon başlatılır. Reaksiyon tamamlanınca sonuçlar kaydedilir.

Daha önceden hazırlanmış safra asitsiz idrara belirli miktarlarda safra asidi katılarak elde edilen standart çözeltilerde aynı diğer örneklerle uygulanan işlemlerden geçirilir. Standart çözeltilerin floresans ölçümlerinden yararlanılarak bir kalibrasyon grafiği çizilir (Şekil 3.1). Örneklerden elde edilen sonular bu grafik yardımı ile μ mol/L olarak hesaplanır.

b) Jaffe yöntemi ile spot idrarla kreatinin tayini: Önce idrar 1:100 oranında sulandırılır. Kalitatif olarak proteinüriye bakılır. Proteinüri (+) ise 2 ml idrar, 7 ml su 1 ml, % 10'luk Na-tungstat ve 2 ml 2/3 N H₂SO₄ ile çöktürülür. Elde edilen eriyik alt-üst edilip karıştırıldıktan sonra 10 dakika bekletilip süzülür ya da santrifüje edilir. Bir tüpe süzüntüden 3 ml konur. Diğer 3 tüpe sırasıyla 1,2 ve 3 ml standart çalışma çözeltisi konulur ve tüpün hacmi su ile 3 ml'ye tamamlanır. Bir başka tüpe ise 3 ml su konulur. Böylece mevcut 5 tüpte son hacimler 3 ml'dir. Bunların üzerine sırasıyla 1 ml 0,04 M pikrik asit ve 1 ml 0,75 N NaOH konulur ve karıştırılır. 20 dak.sonra spektrofotometrik olarak 520 nm'de köre karşı optik dansiteler okunur.



Şekil 3.1. Standart safra asidi çözeltilerinin floransı

4. SONUÇLAR

1) 15 sağlıklı yenidoğanın kan total bilirubin ve idrar nonsülfate safra asidi/kreatinin değerleri ölçüldü. Kan total bilirubin değerleri ortalama olarak 1. gün: 2.84 mg (± 1.47). 5. gün: 8.14 ng (± 4.19), 15. gün: 3,33 mg (± 3.67) bulundu. Spot idrarda nonsülfate safra asidi/kreatinin değerleri ortalama olarak: 1. gün: 21.033 $\mu\text{M}/\text{gr}$ (± 9.060), 5.gün: 26.152 $\mu\text{M}/\text{gr}$ (± 12.317) 15. gün 21.601 $\mu\text{M}/\text{gr}$ (± 10.167) bulundu (Tablo 4.1).

2) Kontrol grubundaki 12 sağlıklı çocuğun spot idrarda nonsülfate safra asidi/kreatinin değerleri ortalama 5.72 $\mu\text{M}/\text{gr}$ (± 3.88); 20 sağlıklı erişkinin ise 2,61 $\mu\text{M}/\text{gr}$ ($\pm 2,71$) olarak bulundu (Tablo 4-2).

3) Yenidoğan döneminde kan total bilirubin ve spot idrarda kreatininle düzeltilmiş nonsulfate safra asidi değerlerinin günlere göre değişimi aynı grafik üzerinde gösterilerek korelasyon derecesi hesaplandı ($r: 0,5728$) (Tablo 4.3).

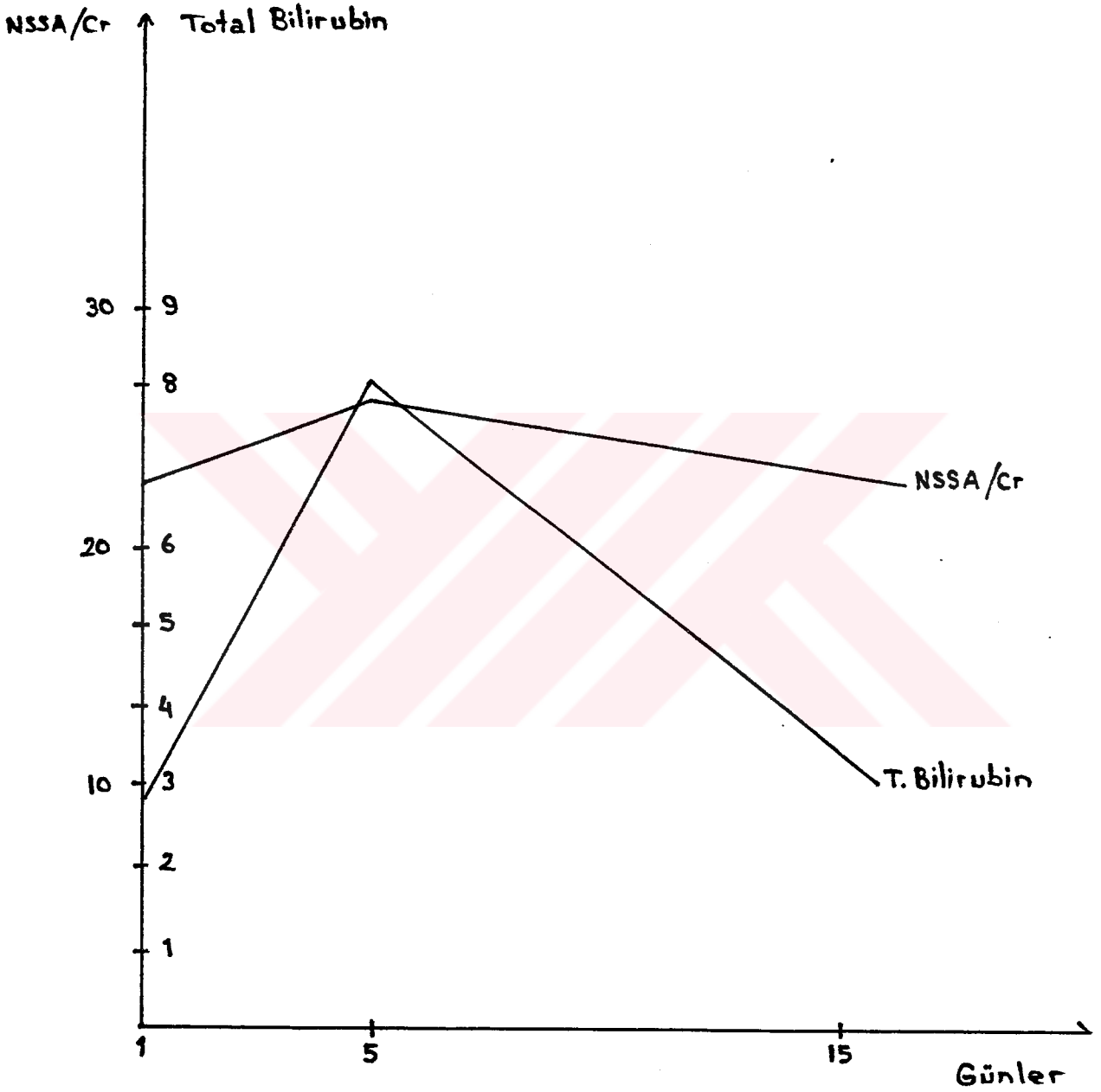
4) Yenidoğan, çocukluk dönemi ve erişkinde saptanan idrar safra asidi değerleri birbirleriyle karşılaştırılarak aradaki farkların anlamlılık dereceleri hesaplandı (Tablo 4.4). Buna göre yenidoğan döneminde diğer çocukluk dönemlerinden anlamlı olarak yüksek, çocukluk döneminde erişkinden anlamlı olarak yüksek idrar nonsülfate safra asidi değerleri saptandı (Yenidoğan > çocukluk dönemi > Erişkin)

Tablo 4-1: Yenidoğanda Bilirubin (Bb) ve Nonsulfate safra asidi/Kreatinin (NSSA/Cr) değerleri

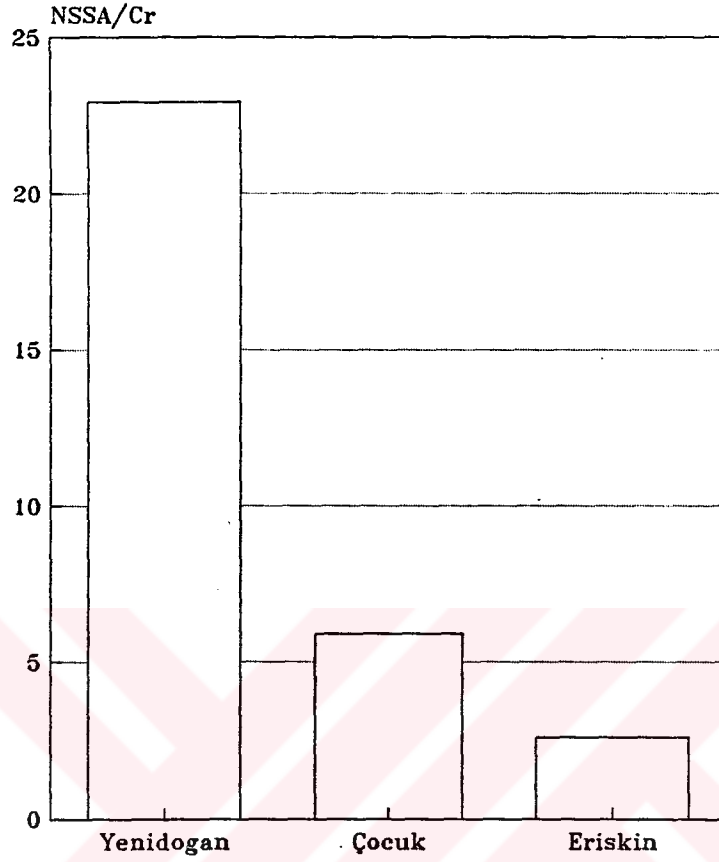
	Bb (mg)	1.GÜN NSSA/Cr (μ M/gr)	Bb (mg)	5.GÜN NSSA/Cr (μ M/gr)	Bb (mg)	15.GÜN NSSA/Cr (μ M/gr)
B.Y	2,1	12,25	6,7	26,05	1,0	18,15
B.K	1,2	14,68	4,1	14,96	1,2	15,04
B.Ö	1,8	16,54	3,2	18,17	1,0	11,12
B.A	3,2	9,08	9,2	9,18	2,1	12,44
B.KU	3,2	14,12	4,7	11,96	2,0	11,87
B.O	4,7	32,11	13,2	33,06	7,3	30,16
B.ÖZ	0,9	14,96	3,7	24,48	1,7	22,19
B.ÖZ	0,9	9,98	3,4	9,62	1,1	10,06
B.Y	4,2	28,34	14,2	34,32	4,3	33,98
B.AY	6,1	24,39	10,7	38,46	10,9	31,51
B.KA	1,8	21,15	3,6	28,36	1,1	10,99
B.H	3,7	19,29	10,2	19,08	2,1	18,16
B.T	2,4	28,18	8,8	32,18	2,7	30,11
B.AS	3,2	38,24	12,1	44,16	13,1	42,48
ORT	2,84	21,03	8,14	26,15	3,33	21,62

Tablo 4-2: Sağlıklı Çocuk ve Erişkinlerde Nonsulfate Safra Asidi/Kreatinin Oranları

	<i>NSSA/Cr</i> (μ M/igr)		<i>NSSA/Cr</i> (μ M/igr)		<i>NSSA/Cr</i> (μ M/igr)
A.S	2.24	M.A	3.64	SN	4.68
A.G	0.30	R.G.	8.60	E.K	4.53
M.K	0,80	N.ř	3.48	ř.D	8.49
S.M	1,00	U.K.	6,12	K.Z.	2.78
M.E	0,80	4,0	9.26	M.K.	4.78
G.K	1,50	Y.N	7.45	S.G	0.57
G.G	10.10	S.Y	1.01	E.K	0.10
K.ř	2.43	O.T	1,36	S.A	0.43
A.B	2.32	S.K	12.76	S.Ü	2.66
T.Y	1.72	O.K	10.25	B.Ö	2.04
İ.E	1.41	B.İ	1.34	Ort	3.77 \pm 3.4



Şekil 5.1: Kan total bilirubin ve spot idrarda kreatininle düzeltilmiş nonsulfate safra asitlerinin günlere göre değişimini gösteren grafik.



Şekil 5.2. Yenidoğan Çocuk ve Erişkin İdrar Nonsulfate Safra Asidi Seviyeleri

Tablo 5-3. Yenidoğan Çocukluk Çağı ve Erişkinde Safra Asidi Düzeylerinin Karşılaştırması

	<i>n</i>	NSSA/Cr (µM/gr)	<i>P</i>
Yenidoğan A	15	22.93 (±11.046)	(A-B) P=0,000012
Çocuk B	12	5.72 (±3.88)	(B-C) P=0,00038
Erişkin C	20	2.61 (±2.71)	(A-C) P=0,000003

SONUÇLARIN İSTATİSTİKSEL İNCELEMESİ

1- Sonuçların 3 ayrı gün için ortalamaları ve standart sapmaları bulunur.

A- Bilirubin Ortalamaları:

	<i>1.Gün</i>	<i>5.Gün</i>	<i>15.Gün</i>
Ort.	2.84	8.14	3.33
SD	1.47	4.19	3.67
n	15	15	15

B- Nonsulfate safra asidi/kreatinin ortalamaları:

	<i>1.Gün</i>	<i>5.Gün</i>	<i>15.Gün</i>
Ort.	21.033	26.152	21.601
SD	9.060	12.317	10.167
n	15	15	15

2- bilirubin değerlerinde günlere göre oluşan değişimlerin anlamlılık dereceleri (Student-t testi)

1-5. gün $p = 0,000017$

1-15. gün $p = 0,5439$

5-15. gün $p = 0,00032$

3- Nonsulfate safra asidi/kreatinin değerlerinde günlere göre oluşan değişimlerin anlamlılık dereceleri (Wilcoxon testi)

1-5. gün $p = 0,005$

1-15. gün $p = 0,57$

5-15. gün $p = 0,0011$

Burada gerek bilirubin gerekse safra asidi değerlerinde birbirlerine paralel olarak 1-5. günler arasındaki ve 5-15 günler arasındaki farklar anlamlı; 1-15 günler arasındaki farklar ise anlamsız olarak tespit edilmiştir.

4- Bilrubin ve nonsulfate safra asidi grafiklerinin karşılaştırılması (Korelasyon czmlemesi)

1-5. gün $p = 0,5979$

1-15. gün $p = 0,6192$

5-15. gün $p = 0,5420$

İki grafiğin genel olarak karşılaştırılmasında

$$r = 0,5728$$

Bilirubin ve safra asidi grafikleri arasındaki korelasyon hesaplamalarına göre iki grafik arasında aynı yönde, orta güçte ve geğerli bir ilişki tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

İntrauterin hayattan dış ortama adaptasyon sürecinin gerçekleştiği yenidoğan döneminde organizmanın tüm organ sistemleri hızlı bir gelişim içindedir. Bazı organlar vücudun metabolik yükünü karşılamakta zorlanabilirler.

Bu bağlamda karaciğeri ele alırsak; intrauterin hayatta bu organın birçok vazifesi plasenta tarafından yerine getirilmektedir. Göbek kordonu kesildikten sonra tüm metabolik yük yenidoğan karaciğeri üzerine toplanır. Fakat karaciğer tüm metabolizma faaliyetlerini tam olarak yerine getirecek maturasyona sahip değildir. Yenidoğan döneminde karaciğerin metabolik faaliyetleri gecikmeli olarak yapılmaktadır. Özellikle safra asidi ve bilirubin metabolizmasındaki aksamalardan dolayı bu maddelerin kanda birikimi sözkonusudur(3).

Üretimine erken embriyolojik dönemde başlanan safra asitleri yenidoğan hepatositlerinde sentezlendikten sonra safra kanalıyla barsaklara boşaltılır. Barsak bakterileri tarafından sekonder şekle dönüştürülerek ileumdan emilir(16,19). böylece safra asitleri portal sisteme geçerek enterohepatik sirkülasyona katılır. Vena porta ile karaciğere ulaşan safra asitlerinin karaciğer tarafından alımı ve metabolize edilmesi gecikmeli olarak yapılmaktadır(23,35).

Yenidoğanda safra asidi metabolizmasıyla ilgili yapılan çalışmalar göstermektedir ki; vena porta yolu ile tekrar karaciğere gelen safra asitleri henüz mature olmamış hepatositler tarafından yeterince detoksifiye edilemeyince safra kanalikülleri üzerinde kolestatik etki göstermektedirler. Bu şekilde meydana gelen "fizyolojik kolestaz" safra asitlerinin kanda yükselmesinin sebebi olarak gösterilmektedir(1,2,9,15,26,27,30). 1981'de yapılan bir çalışmada yenidoğanda vena portadaki litokolik asidin karaciğer fonksiyonlarını kötü yönde etkileyerek kolestaza yol açtığı bildirilmiştir(26).

Balistreri ve arkadaşlarının 1983 yılında yenidoğanda safra metabolizması ve transportunu araştırmak için yaptığı çalışmalarda, karaciğerin intrasellüler safra asidi tutulumu ve transportu, biotransformasyonu spesifik enzim aktiviteleri (Lipase, N-açil transferaz) düşük bulunmuştur(35). Bundan başka enterohepatik safra asidi dolaşımındaki aksamalar sebebiyle organizmadaki safra asidi havuzunda daralma olduğu vurgulanmaktadır(14,17,35).

Aynı yazarın Belknag ile deney hayvanları üzerinde yaptığı bir çalışmada yaşamın ilk günlerinde ,fetal ve sonraki dönemlere nazaran belirgin olarak yüksek Litokolik asit seviyeleri saptanmış olup fizyolojik kolestazın sebebi olarak gösterilmiştir(2,12,26).

Suchy ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada yenidoğan dönemindeki yüksek safra asidi seviyeleri fizyolojik kolestaz ve karaciğer maturasyon eksikliği gibi sebeplerle açıklanmıştır(27).

Yenidoğan döneminde temelde karaciğerin henüz mature olmasına bağlı olarak meydana gelen fizyolojik hiperbilirubinemi ve fizyolojik kolestaz mekanizma olarak birbirine benzetilebilir(5,8).

Araştırmamızda spot idrarda nonsulfate safra asidi tayini yaptık. İdrardaki total safra asitlerinin yaklaşık olarak yarısı nonsulfate şeklindedir. Araştırdığımız yayınlarda sulfatlanmış veya total safra asidi tayinleri-

nin, nonsulfate safra asidi tayinine göre bir üstünlük sağlamadığı vurgulanmakta idi, ayrıca diğer iki yöntem çok daha pahalıya malolacağı için pratik değildi. Bu yüzden sadece nonsulfate safra asitleri tayini yaptık. İdrarla atılan safra asitlerinin kreatini oranı kan seviyeleri ile önemli ölçüde paralellik göstermektedir(35). Ayrıca açlık ve tokluktaki kanda rastlanan düzey değişimleri idrar miktarlarına yansımamaktadır(18,28). İdrar safra asit atılımı gün içinde oldukça sabit bir düzey vermektedir(4).

Çalışmamızda spot idrarda kreatinin ile düzeltilmiş nonsulfate safra asidi değerleri yenidoğanda, büyük çocuk ve erişkinlere göre oldukça yüksek olarak bulunmuştur. Aynı günlerde alınan kan bilirubin ve idrar nonsulfate safra asidi değerlerini kullanarak çizilen iki ayrı grafik karşılaştırıldığında bilirubin ve safra asidi eğrileri arasında göze çarpan bir benzerlik vardır. Bulduğumuz değerler göstermektedir ki yenidoğanın ilk saatlerinde bilirubin ve safra asitleri henüz kanda yeteri kadar birikmediği için nispeten daha düşük düzeyde bulunmaktadır. 1. haftanın sonuna doğru karaciğer henüz mature olmadığı için bilirubin ve safra asidi değerleri en yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Daha sonraki günlerde karaciğer işlevlerindeki gelişme ile beraber bilirubin ve safra asidi seviyelerinde azalmalar olmaktadır. Bilirubin düzeyleri birkaç hafta içinde erişkin düzeylerine inmesine karşılık, safra asit düzeyleri yaşamın ilk haftalarından sonra belirgin olarak azalmakla beraber erişkin düzeylere inmesi yıllar almaktadır(1). Bizim yaptığımız çalışmada 4-17 yaş grubundaki çocukların idrar safra asit düzeyleri erişkinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Yenidoğan döneminde ise bilirubin ve safra asidi değerlerinin günlere göre değişimi birbirlerine çok benzemektedir. Buna göre yapılan analizlerde aynı yönde anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ($r:0,5728$).

6. ÖZET

1- 15 sağlıklı yenidoğandan 1., 5. ve 15. günlerde spot idrar ve kapiller kan örnekleri alındı. Kapiller kandan total bilirubin spot idrardan nonsulfate safra asidi ve kreatinin tayini yapıldı.

2- Yaşları 4 ile 17 arasında değişen 12 çocuktan ve yaşları 20 ile 75 arasında değişen 20 erişkinden spot idrar örnekleri alınarak nonsulfate safra asidi ve kreatinin tayini yapıldı.

3- 15 yenidoğanın bilirubin ortalamaları 1. gün 2.84 mg (± 1.47) 5. gün: 8.14 mg (± 4.19), 15. gün 3.33 mg (± 3.67) olarak bulundu. 5. gün ortalaması 1. ve 15. gün ortalamasından anlamlı olarak yüksek bulundu.

Buna karşılık 1. ve 15. gün ortalamaları arasındaki fark anlamsız idi.

4- 15 yenidoğanın kreatinin ile düzeltilmiş nonsulfate safra asidi ortalamaları 1. gün 20.33 $\mu\text{M}/\text{gr}$ (± 9.060), 5. gün: 26.152 $\mu\text{M}/\text{gr}$ (± 12.317), 15. gün: 21.601 $\mu\text{M}/\text{gr}$ (± 10.167) olarak bulundu.

5- Kontrol grubundaki 12 sağlıklı çocuğun kreatinin ile d¼zelti- miş nonsulfate safra asidi değerleri ortalama $5,72 \mu\text{M}/\text{gr}$ ($\pm 3,88$) 20 sağlıklı erişkinin ise $2,61 \mu\text{M}/\text{gr}$ olarak bulundu. Çocukların safra asidi ortalama- sı erişkininkinden anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

6- Yenidoğanlarda kan bilirubin değerleriyle idrar safra asidi değerlerinin günlere göre değişimlerdeki benzerlik (korelasyon) aynı yön- de orta derecede anlamlı olarak bulundu.

7- Yenidoğanda idrar nonsulfate safra asidi değerleri çocuk ve erişkin kontrollerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

KAYNAKLAR

- 1- Obinata K, Nittano H.: 1- β -Hydroxylated Bile acids in the Urine of Healthy Neonates, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1990; 15:1-5.
- 2- Balistneri WF, Farrell MK: Pathologic versus physiologic cholestasis: Elevated serum concentration of a secondary bile acid in the presence of hepatobiliary disease. *The Journal of Pediatrics* 1981; 98(3):399-402.
- 3- Maisels MJ, Gifford K: Jaundice in the Healthy Newborn Infant: A New Approach to an old Problem. *Pediatrics* 1988; 81(4):505-511.
- 4- Lianidou E.S., Siskos P.A. Enzymic Fluorimetric Determination of Sulphated and Non-Sulphated Primary Bile Acids in Urine Using a Rapid Solvolysis Technique *Analyst*, 1988; 113:1459-1463.
- 5 Kimura, A., Ushijima, K.: Neonatal Dubin Johnson syndrome with severe cholestasis: effective phenobarbital therapy: *Acta-Paediatr. Scand* 1991; 80(3): 381-5.

- 6- Buzby,M.: Assessment of hyperbilirubinemia in full-term infants: J.Pediatr. Health. Care, 1991; 5(4):210-2.
- 7- Boehm,G., Muller,D.M.: Influence of intrauterine growth retardation on parameters of liver function in low birth weight infants. Eur J. Pediatr, 1990; (149/6):396-8.
- 8- Pifferi,M., Michelotti,F.: Serum Bile acids in the newborn our experience Pediatr. Med. Chir, 1990; 12(3):251-4.
- 9- Wahlen,E., Egestad,B.: Ketonic bile acids in urine of infants during the neonatal period J.Lipid. Res 1989; 30(12):1847-57.
- 10- Shoda,J., Maharo,R.: Similarity of unusual bile acids in human umbilical cord blood and amniotic fluid from newborns and in sera and urine from adult patients with cholestatic liver diseases. J. Lipid. Res, 1988; 29(7): 847-58.
- 11- Okolo AA, Omene,JA: Physiologic Joundice in the Nigerian neonate. Biol-Neonate, 1988; 53(3):132-7.
- 12- Cox,K.L, Cheung,A.T.: Biliary motility: Postnatal changes in guinea pigs Pediatr. Res, 1987; 21(2):170-5.
- 13- Lawson,A.M., Madigan,M.J.: Rapid diagnosis of Zellwger syndrome and infantile Refsum's diseases by fast atom bombardment-mass spectrometry of urine bile salts. Clin. Chim. Acta, 1986; 161(2):221-31.
- 14- Rajagopalon,I., Kok,E.: 26 Hydroxycholesterol disulfate: metabolism and excretion in the normal neonate. J. Steroid. Biochem 1986; 25(6):991-94.

- 15- Ikegawa,S., Hirabayashi,N.: Determination of conjugated bile acids in human urine by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection J. Chromatogr, 1992; 577(2):229-38.
- 16- Heubi,J.E., Balistreri,W.F.: Refractory infantile diarrhea due to primary bile acid malabsorption. J.Pediatr, 1979; 94(4):546-51.
- 17- Angelin,B., Bjokhem,I.: Individual serum bile acid concentrations in normo-and hyperlipoproteinemia as determined by mass fragmentography: relation to bile acid pool size. J. Lipid Res, 1978; 19(5):527-37.
- 18- Pennington,C.R., Ross,P.E.: Fasting and postprandial serum bile acid concentrations in normal persons using an improved GLC method. Digestion, 1978; 17(1):56-62.
- 19- De Belle,R.C., Vaupshar,V.: Intestinal absorption of bile salts: Immature development in the neonate J. Pediatr; 1979; 94(3):472-6.
- 20- Haber,L.R., Vaugshar,V.: Bile acid conjugation in organ culture of human fetal liver. Gastroenterology, 1978; 74(6):1214-23.
- 21- Karlaganis,G., Paumgartner,G.: Determination of bile acids in serum by capillary gas. Liquid Chromatography. Clin. Chim. Acta, 1979; 92(1):19-26.
- 22- Deleze,G., Paumgartner,G.: Bile acid pattern in human amniotic fluid. Eur J. Clin. Invest, 1978; 8(1):41-5.
- 23- Niijima,S.: Studies on the conjugating activity of bile acids in children. Pediatr. Res, 1985; 19(3):302-7.
- 24- Colombo,C., Roda,A.: Correlation between fetal and maternal serum bile acid concentrations. Pediatr. Res, 1985; 19(2):227-31.
- 25- Back,P., Watter,K.: Developmental pattern of bile acid metabolism as revealed by bile acid analysis of meconium. Gastroenterology; 1980; 78(4):671-6.

- 26- Belknap,WM, Balistreri,WF; Physiologic cholestasis II: serum bile acid levels reflect the development of the enterohepatic circulation in rats. Hepatology, 1981; 1(6):613-6.
- 27- Suchy,FJ; Balistreri,WF: Physiologic cholestasis: elevation of the primary serum bile acid concentrations in normal infants. Gastroenterology, 1981; 80(5):1037-41.
- 28- Balistreri,W,F, Juchy,FJ: Serum bile acid response to a test meal stimulus: a sensitive test of ileal function J. Pediatr, 1980; 96(3):582-9.
- 29- Heubi,J.E., Balistreri,W.F.: Enteropahatic circulation of bile acid in infants and children with ileal resection. J. Lab. Clin. Med, 1980; 95(2):231-40.
- 30- Gustafsson J., Andersen,S.: Bile acid metabolism during development. Metabolism of lithocholic acid in human fetal liver. Pediatr. Res 1987; 21(1):99-103.
- 31- Hoekelman R.A.: Hyperbilirubinemia (In) The Merck Manual of Diagnosis and therapy (ed: Berkow,R.) Rahway,N.J., Merck and Co 1992; 2005-2009.
- 32- Yenson,M. İnsan Biokimyası, İstanbul Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 1988.
- 33- Simko V., Micheal,S., Kelley,R.E.: Predictive value of randon sample urine bile acids cernected by creatinin in liver disease. Hepatology 1983; 7:115-117.
- 34- Pasternak CA: An Introduction to Human Biochemistry, London, Oxford University Press, 1980.
- 35- Ballisteri W.F. Fetal and Neonatal Bile acid Synthesis and metabolism. Clinical İmplication, J.Inher.Metab. Dis. 1991; 14:459-477.