

Çocukluk çağının değişik dönemlerinde spot idrarda primer sülfatlanmamış safra asit düzeylerinin erişkin düzeyleri ile karşılaştırılması

Comparison of primary unsulfated bile acid levels during the different stages of childhood period with adult values in spot urine

Dr. Ömer NASIROĞLU¹, Dr. Tülay AYDIN², Dr. Can FIÇICIOĞLU¹, Dr. Halit ÇAM¹, Dr. Şerare MIKLA,¹ Gülsev KAVUNOĞLU¹, Dr. Sebati ÖZDEMİR³, Dr. Ahmet AYDIN¹

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları¹, Biyokimya², İç Hastalıkları³ Anabilim Dalı, İstanbul

ÖZET: Sağlıklı yenidoğan, süt çocuğu, büyük çocuk ve erişkinlerin spot idrarında kreatinin ile düzeltilmiş primer sülfatlanmamış safra asitlerinin (PSSA) değerlerini belirlemek amacı ile sağlıklı 168 çocuk ve 21 erişkinde spot idrarda kreatinin ile düzeltilmiş primer sülfatlanmamış safra asit düzeyleri enzimatik-fluorimetrik yöntemle ölçüldü.

Olguların yaşı ile idrar PSSA düzeyleri arasında korelasyon analizi ile orta güçte ve ters yönde bir bağıntı bulunmuş olup ($r=0.50$, $p<0.001$), bu da yaş arttıkça idrar PSSA düzeylerinin azaldığını göstermektedir. 1 günlük yenidoğanlarda 20.82 ± 8.83 mmol/gr, 5 günlüklerde ise 24.28 ± 10.75 mmol/gr olarak bulunan idrar PSSA düzeyleri erişkin değerlerinden (2.83 ± 2.87 mmol/gr) daha yüksektir ($p<0.001$).

Beşinci günden sonraki idrar PSSA değerleri azalmakla birlikte anlamlı düşüş 3. ayın sonunda gerçekleşmektedir. Daha büyük çocuklarda (2-8 yaş) saptadığımız ortalama değerler erişkin değerlerinden daha yüksek olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Bu çalışmanın sonuçları karaciğer ve gastrointestinal sistemin safra asit metabolizması ile ilgili fonksiyonlarının hayatın ilk yılı içinde büyük ölçüde olgunlaştığını ve bu sürecin bütün çocukluk çağ boyunca devam ettiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: **Çocuk, idrar safra asitleri**

SAFRA asitleri karaciğer tarafından ekskrete edilen majör organik anyonlar olduğu için idrar ve kandaki düzeylerinin tayini karaciğer hastalıklarının tanı ve izlenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Karaciğer hastalıklarının bir çoğunda erken dönemdeki klasik karaciğer fonksiyon testlerinin %70-80'i normal sınırlar içinde iken kan ve idrarda safra asitleri düzeylerinin karaciğerin hücre hasarı, sentez ve ekskresyon bozukluğunu

SUMMARY: The level of primary unsulfated bile acid (USBA) corrected by creatinine was measured in spot urine, using enzymatic fluorometric method in 168 healthy children and 21 adults with the purpose of establishing the USBA values in healthy newborns, infants, children and adults.

We found that the age of the cases were inversely and moderately correlated with USBA levels and this indicates that the USBA levels decrease by increasing age ($r=0.50$, $p<0.001$). In one-day and five-day newborns the USBA levels were 20.82 ± 8.83 micromol/gr, 24.28 ± 10.75 , respectively and they were higher than those of the adults (2.83 ± 2.87 micromol/gr) ($p<0.001$).

Urinary USBA levels begin to decrease after 5th day of life, however it decreases significantly at the end of 3 months of age. The mean values which were found in older children (2-8 years) were higher than the values of adult, but this difference was not significant statistically.

In conclusion, the bile acid metabolism in the liver and gastrointestinal system can function sufficiently towards the end of the first year of age and this process continues during the whole childhood period.

Key Words: **Child, urinary bile acids**

gösterecek şekilde artmış olduğu saptanmıştır (1). Son yıllarda enzimatik yöntemlerin geliştirilmesiyle safra asit tayinlerinin rutin biyokimya laboratuvar koşulları içinde yapılması mümkün olmuştur.

Yapılan az sayıdaki çalışmada çeşitli yaş gruplarındaki çocukların kan ve idrar safra asit düzeylerinin erişkinden daha yüksek olduğu, yani kolestatik düzeylerde olduğu gösterilmiştir (2, 3). Bu araştırmalarda yaş arttıkça safra asit düzeylerinin de azaldığı saptanmıştır. Bu nedenle safra asit düzeylerinin çocuklardaki karaciğer hastalığının teşhis ve takibinde kullanılabilmesi için her

yaş grubundaki normal değerlerinin bilinmesi gerekir. Biz çalışmamızda spot idrarda enzimatik flourometrik yöntemle değişik yaştaki sağlıklı çocuklarda primer sülfatlanmamış safra asit seviyelerini belirleyerek erişkin düzeyleri ile karşılaştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya 14'er kişilik gruplar halinde (kız erkek oranı 1:1) 1 günlük, 5 günlük, 15 günlük, 1 aylık, 3 aylık, 6 aylık, 9 aylık, 1 yaş, 2 yaş, 4 yaş, 6 yaş ve 8 yaşını tamamlamış toplam sağlıklı 168 çocuk ve yaşları 18 ile 68 yıl arasında değişen (Ortalama 39.2±17.5 yıl) 9'u kadın 12'si erkek sağlıklı 21 erişkin alındı (Tablo 1). Çalışma grubunu oluşturan olgulardan çalışmanın amacı belirtilerek kendileri veya ailelerinden izin alınmıştır.

Safra asitlerinin tayininde Aydın ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem kullanıldı (4). Safra asitlerinin ekstraksiyonu için Sep-pak C18 (Waters Chromatography Division-Millipore Corporation, USA) kartuşları kullanıldı. Kartuşlar önce 3 mL metanol ve daha sonra 6 mL deiyonize su ile yıkandı. Bundan sonra 2 mL örnek idrar ve 2mL standart çözelti sırası ile kendilerine ait olan ve yıkanmış Sep-pak kartuşlardan 1 damla/saniye hızı ile geçirildi. Daha sonra kartuşlar 2 kez 2 mL absölu metanolden geçirilerek ekstraksiyon işlemi tamamlandı.

Ekstraktlar 40°C su banyosundan azot gazı altında kuruyuncaya kadar buharlaştırıldı. Kuruyan ekstratlar, idrar örnekleri ve standart çözeltiler için 2 mL, normal idrar örnekleri ve kör için ise 0.5 mL seyreltik metanol (1:1) eriyiğinde çözündürülerek ölçüme hazır hale getirildi.

Standart ve deneklerden elde edilen ekstratlar aşağıda anlatılan şekilde enzimatik-fluorimetrik (4) olarak ölçüldü (eksitasyon slit aralığı 20nm, emisyon dalga boyu 455nm, emisyon slit aralığı 20 nm). Kristal küvete 1.6 mL glisin hidrazin tamponu, 0.1 mL 7 alfa-HSD (hidroksi steroid dehidrogenaz) çözeltisi ve 0.2 mL idrar konuldu. Stabilleşme sağlanınca küvete 0.1 mL b-NAD⁺ eklenerek reaksiyon başlatıldı. Standart çözeltinin flouresans ölçümlerinden yararlanılarak kalibrasyon grafiği çizildi. Çalışılan örnekler bu grafikten yararlanılarak mmol/L olarak hesaplandı.

Spot idrarda kreatinin tayini Jaffe yöntemi ile yapıldı (5). Daha sonra 1 litre idrardaki safra asiti miktarı (mmol) 1 litre idrardaki kreatinin miktarı (gr) ile oranlandı. Sonuçlar mmol/gr olarak yorumlandı. İstatistiksel analizler bilgisayarda SPSS paket programı ile yapılmış olup, tek yönlü varyans analizi (anova) ve korelasyon analizi kullanılmış-

Tablo 1. Değişik yaşlarda kreatinin ile düzeltilmiş sülfatlanmamış idrar safra asidi(PSSA) düzeyleri

Yaş grubu	n(K:E)	PSSA / Cr (mmol /gr)
1 gün	14(7:7)	20.24±8.83*
5 gün	14(7:7)	24.28±10.75*
15 gün	14(7:7)	21.29±10.49
1 ay	14(7:7)	18., 01± 8.94
3 ay	14(7:7)	16.26±8.92**, ***
6 ay	14(7:7)	12.75± 6.5
9 ay	14(7:7)	9.59 ±3.52 ***
12 ay	14(7:7)	8.55 ±2.93
2 yıl	14(7:7)	7.22± 2.46
4 yıl	14(7:7)	6.27± 2.75
6 yıl	14(7:7)	5.41± 2.46
8 yıl	14(7:7)	4.13± 1.99
Erişkin	21(9:12)	2.83±2.87

İstatistiksel anlamlılık: *p<0.001 (Erişkin düzeyleri ile karşılaştırma)

**p<0.001 (Yenidoğan ile karşılaştırma)

***p<0.001 (3. ay ile karşılaştırma)

tır. İstatistiksel önemlilik derecesi olarak p değeri <0.05 olarak alınmıştır.

SONUÇLAR

Olguların yaşı ile idrar PSSA düzeyleri arasında korelasyon analizi ile orta güçte ve ters yönde bir bağıntı bulundu (r= -0.50, p<0.001). Tek yönlü varyans analizi (anova) ile 13 grup PSSA düzeyleri açısından karşılaştırıldı ve gruplar arasında anlamlı fark bulundu (F= 18.45, p<0.001).

İdrar PSSA düzeyleri 1 günlük yenidoğanlarda 20.82±8.83 mmol/gr, 5 günlüklerde ise 24.28±10.75 mmol/gr bulunmuş olup, erişkin değerlerinden (2.83±2.87 mmol/gr) anlamlı olarak yüksektir (p<0.001).

5. günden sonraki idrar PSSA değerleri azalmakla birlikte anlamlı düşüş 3. ayın sonunda 16.26±8.92 mmol/gr değeri ile gerçekleşmektedir. İdrar PSSA değerleri 3 aylıktan sonra yavaş yavaş azalmakla birlikte bu dönem ile istatistiksel olarak anlamlı fark 9. ayın sonunda 9.59±3.52 mmol/gr değeri ile oluşmaktadır (p<0.001).

Daha büyük çocuklarda (2-8 yaş) saptadığımız ortalama değerler erişkin değerlerinden daha yüksek olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0.05).

TARTIŞMA

Sağlıklı bir insanın serum ve idrar safra asit seviyeleri düşüktür. İdrar safra asit değerlerinin serum safra asit değerlerini yansıttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (1). Renal safra asit atılımının günün her saatinde hemen hemen eşit olduğu,

açlık ve tokluktan etkilenmediği ve böbrek fonksiyonları %50'nin üzerinde bozulmadıkça değişmediği bilinmektedir. Safra asitlerinin barsağa atılımının bozulduğu hepatobiliyer hastalıklarda serum ve idrar safra asit seviyeleri artar. Bu nedenle karaciğer hastalıklarının tanı ve izlenmesinde idrar safra asit düzeyi tayinleri en az kandaki düzeylerin tayini kadar yararlıdır.

Çok değerli bir karaciğer fonksiyon testi olmasına karşın, safra asit tayin yöntemlerinin birçoğu çok pahalı, zaman alıcı ve sofistikedir. Laboratuvarımızda geliştirdiğimiz enzimatik-fluorimetrik yöntem ise hassas ve kolaylığı dışında spot idrara uygulanabilme (kolay örnek toplama, kan ile geçen hastalıkların rizikosunu taşıması) ve çabukluk (bir iş gününde 30 kadar örnek çalışılabilir) gibi özellikleri ile diğer metodlardan daha üstündür (4). Bu çalışma değişik çocukluk yaşlarında spot idrarda kreatinin ile düzeltilmiş primer sülfatlanmış safra asit düzeylerini tayin etmek amacı ile yapılmıştır.

Kordon arter ve veninde total safra asit konsantrasyonlarının erişkin düzeylerine benzer olması yenidoğanda safra asitlerinin sentezinde bir azlığın söz konusu olmadığını göstermektedir (6).

Yapılan iki ayrı çalışmada hayatın ilk günlerinde serum (2) ve idrar (3) safra asit düzeylerinin yükseldiği ve 4-6. günde doruk noktaya çıktığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da 1 günlük yeni doğan idrar total safra asitlerinin erişkinlerinkinden çok daha yüksek olduğunu ve bu değerlerin 5. günde doruk noktaya ulaştığını gözledik. Çalışmamızın sonuçları yukarıda belirtilen literatür verileri ile uyum göstermektedir.

Mevcut sonuçlar erken yenidoğan döneminde safra asit sentezinin normal olduğunu, buna karşılık plasentanın temizleyici etkisinin ortadan kalkması ve hepatik ekskresyonun düşük olması nedeni ile serum ve dolayısıyla da idrar safra asit değerlerinin yükseldiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Simko V, Michael S. Bile acid levels in diagnosing mild liver disease. *Arch Intern Med* 1986; 146: 695-97.
2. Suchy FJ, Balistreri WF, Heubi JE, et al. Physiologic cholestasis: elevation of the primary serum bile acid concentrations in normal infants. *Gastroenterology* 1981; 80: 1037-41.
3. Obinata K, Nittono H, Yabuta K, et al. 1b-hydroxylated bile acids in the urine of healthy neonates. *J Ped Gastroenterol Nutr* 1992; 15: 1-5.
4. Aydın T, Baban N, Aydın A, et al. Erişkinler ve çocukların spot idrarlarında kreatinin ile düzeltilmiş primer sülfatsız safra asitlerinin enzimatik fluorimetrik yöntem ile tayini. *İst Çocuk Klin Derg* 1994; 29: 61-65.
5. Bauer JD, Ackerman PG, Toro G. Clinical laboratory methods. Saint Louis, Mosby 1968; 397-98.
6. Shoda J, Mahara R, Osuga T, et al. 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: 847-58.
7. Balistreri WF. Fetal and neonatal bile acid synthesis and metabolism: Clinical implications. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 459-77.
8. Moyer MS, Heubi JE, Goodrich AL et al. Ontogeny of bile acid transport in brush border membrane vesicles from rat ileum. *Gastroenterology* 1986; 90: 1188-96.
9. Suchy FJ, Courchene SM, Balistreri WF. Ontogeny of hepatic bile acid conjugation in the rat. *Pediatr Res* 1985; 19: 97-101.

Normal bir yenidoğanda duodenuma atılan safra asiti miktarı erişkinin yaklaşık %50'si kadardır ve hayatın ilk 3-4 ayı civarında belirgin bir artış gösterir (2). Bu dönem kan ve idrarda safra asit düzeylerinde düşüş ile çakışmaktadır. Bu nedenle hayatın yaklaşık üçüncü ayında safra asitlerinin karaciğerden atılımının giderek arttığını ve serum, dolayısıyla da idrar safra asit seviyelerinin düşmeye başladığı kabul edilebilir. Bu sonuçlar normal bebeklerde hayatın ilk aylarında fizyolojik bir kolestazın varlığını göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada 5. günden sonraki idrar PSSA değerleri azalmakla birlikte anlamlı düşüş 3. ayın sonunda gerçekleşmiştir. Bu dönem safra asitlerinin safra yolu ile ekskresyonunda belirgin bir artışın olduğu dönem ile çakışmaktadır.

Yenidoğan ve süt çocuğu serum ve idrar safra asit seviyelerindeki artış, safra asiti atılımı azlığı dışında portal kandan safra asit alımının yetersizliği, safra asit metabolizma yetersizliği, safra asit konjugasyonunda yer alan enzimlerin yetersizliği, yenidoğanda atipik safra asitlerinin varlığı ve enterohepatik dolaşımın azalması gibi faktörler ile de açıklanmaya çalışılmaktadır (6-9).

Fizyolojik kolestazın ne gibi bir yararı olduğu ise henüz iyi bilinmemektedir. Fakat yenidoğan ve süt çocuğunda hepatik ekskresyon fonksiyonunun düşük olması, kolestatik karaciğer hastalığına yatkınlığı (örneğin gram negatif sepsis ve intravenöz amino asit enfüzyonları gibi hastalık ve uygulamalar) arttırmaktadır.

Yaptığımız çalışmada 9 aylık bebeklerin PSSA düzeyleri 3 aylık bebeklerinkinden anlamlı düşük bulunmuştur. Daha sonraki yaşlara ait değerler ise erişkinlerinkinden yüksek olmakla birlikte giderek normal düzeylere doğru yaklaşıyordu. Bu sonuçlar karaciğerin eks kretevar fonksiyonun hayatın ilk yılı içinde büyük ölçüde olgunlaştığını daha sonraki dönemlerde ise olgunlaşmaya devam ettiğini göstermektedir.