

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI
NEONATOLOJİ BİLİM DALI

ANNE SÜTÜ MİKROBİYAL İÇERİĞİNİN UZAMIŞ
SARILIK GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ

DR. FUNDA TÜZÜN

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından desteklenmiştir.

İZMİR-2011

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI
NEONATOLOJİ BİLİM DALI

ANNE SÜTÜ MİKROBİYAL İÇERİĞİNİN UZAMIŞ
SARILIK GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ

DR. FUNDA TÜZÜN

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ABDULLAH KUMRAL

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından desteklenmiştir.

İZMİR-2011

İÇİNDEKİLER

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	ii
1.ÖZET.....	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER.....	7
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
6. SONUÇLAR.....	34
7. TARTIŞMA	41
8. KAYNAKLAR	46

TABLO VE ŞEKİLLER

Tablo 1. Yenidoğan sarılığında risk faktörleri	11
Tablo 2. Patolojik indirekt hiperbilirubinemi nedenleri.....	13
Tablo 3 Uzamış indirek hiperbilirubinemi nedenleri	14
Tablo 4. Sağlıklı Annelerin Sütünden İzole Edilen Bakteri Türleri	25
Tablo 5. NSVY ile doğan term bebeklerde anne sütü ve formulanın bakteriyel kolonizasyona etkileri	26
Tablo 6. Gaita ve anne sütünde PCR ile değerlendirilen mikroorganizmalar	32
Tablo 7. Çalışma gruplarının demografik ve klinik özellikleri	34
Tablo 8. Çalışma gruplarında anne sütü mikrobiyal içeriğinin karşılaştırılması	35
Şekil 1: Hem metabolizması.....	8
Şekil 2. Yenidoğanda Bilurubin Metabolizması.....	10
Şekil 3 B adolentis süt ve gaitadaki miktarları için korelasyon eğrisi.....	36
Şekil 4. B. bifidum anne sütü ve gaitadaki miktarlar için korelasyon eğrisi	37
Şekil 5 .B. adolentis gaita miktarları-bilirubin düzeyi korelasyon eğrisi	38
Şekil 6 .B. bifidum gaita miktarları-bilirubin düzeyi korelasyon eğrisi	38
Şekil 7 B. longum gaita miktarları-bilirubin düzeyi korelasyon eğrisi	39
Şekil 8. B. Bifidum anne sütündeki miktarları-bilirubin düzeyi korelasyon eğrisi	40

1. ÖZET

Sarılık yenidoğan döneminin en sık görülen ve sıklıkla kendiliğinden düzelen ancak, kritik düzeylere ulaştığında da kalıcı nörolojik hasar bırakabilen bir sorundur. Yaşamın ilk haftasından sonra başlayan ve ikinci haftadan sonra 10 mg/dl'nin üzerinde seyreden sarılık uzamış sarılık olarak tanımlanmaktadır. Uzamış sarılıklarda en sık neden anne sütü olsa da bu hastalarda patolojik nedenlerin ekarte edilmesi için çok sayıda tetkik gerekmektedir. Ancak anne sütünün neden sarılığa yol açtığı konusundaki veriler yetersizdir.

Anne sütü sarılığında en önemli mekanizmalardan birisi anne sütüne bağlı artmış enterohepatik dolaşımdır. Anne sütünün bilirubinin intestinal absorpsiyonundaki artışa yol açmasının kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Anne sütünün bilirubinin intestinal absorpsiyonu azaltmasının mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir ancak anne sütü içeriğinde sitokinler ve büyüme hormonlarının bundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

İnfanttaki intestinal bilirubin emilimini etkileyebilecek önemli faktörlerden biri de intestinal bakteri popülasyonudur. Son yapılan çalışmalarda anne sütünün steril bir sıvı olmaktan çok uzak olduğu ve infant barsağı için sürekli ve yoğun bir bakteri kaynağı olduğu gösterilmiştir. İnsan sütünde bulunan bakteriler; staphilococcus, lactococcus, enterococcus ve lactobacillus türlerindedir. Probiyotiklerin gastrointestinal sistem üzerindeki bu etkileri bilirubinin intestinal absorpsiyonunu azaltarak enterohepatik dolaşımı azaltabileceğini düşündürmektedir. Anne sütüne bağlı uzamış sarılık pekçok açıdan incelenmiş olmasına rağmen bu konuyla ilgili hiçbir veri bulunmamaktadır.

Çalışmamızda anne sütüne bağlı uzamış sarılıklarda anne sütündeki bakteri popülasyonunun, uzamış sarılık gelişimindeki rolü araştırılmak istenmiştir. Bu amaçla

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi yenidoğan polikliğine başvurup postnatal 15. gününde sarılığı devam eden ve anne sütü dışında uzamış sarılığa yola açabilecek patolojik nedenleri ekarte edilen 30 term bebek ve sarılığı olmayan 30 bebek kontrol grubu olarak çalışmaya alındı.

Uzamış sarılık için bakılan bilirubin ile eş zamanlı olarak annenin sütü ve gaitası standart koşullarda toplanarak PCR çalışmaları yapılana kadar -80 derecede saklandı. Örneklerden mikrobakteriyal DNA izolasyonu süt için High Pure PCR Template Preparation Kit® (Roche, Germany), gaita için ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo, U.S.A.) kullanılarak yapıldı.

Anne sütü ve gaitada PCR ile 21 bakteri türüne ait DNA elde edildi. Kontrol grubunda anne sütündeki bifidobakterium bifidum türlerinin konsantrasyonu uzamış sarılık grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Gaita mikrobiyal içerikleri kıyaslandığında ise kontrol grubunda Bifidobakterium adolentis, bifidobakterium longum ve bifidobakterium bifida türlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı.

Anlamlı çıkan sonuçlarla korelasyon analizi yapıldığında anne sütündeki bifidobakterium bifidum yoğunluğunun ve gaitadaki bifidobakterium adolentis, bifidobakterium bifidum ve bifidobakterium longum türlerinin bilirubin değeri ile negatif korele olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak anne sütü mikrobiyal içeriğinin bireysel farklılıklar göstermekte olup özellikle anne sütünde ve gaitadaki bifidobakterium türlerinin artan yoğunluğunun uzamış sarılığa karşı koruyucu olduğu görüldü. Çalışma sonuçlarımızın ileri çalışmalarla desteklenmesi ve probiyotiklerin yenidoğanda etkinlik ve güvenilirliğinin netlik kazanması durumunda anne sütüne bağlı uzamış sarılıkta bifidobakterium türlerinin kullanımı yeni bir tedavi seçeneği olarak düşünülebilir.

2. SUMMARY

Neonatal jaundice is a common and usually benign condition that resolves on its own or with minimal intervention but, if sufficiently severe, can cause permanent neurological damage. Prolonged jaundice is defined as jaundice which develops after the first week of life and ongoing over >10 mg/dl after the two weeks of age. Although the breast feeding is the most common cause of the prolonged jaundice, those infants need further evaluation for eliminating the pathological causes.

One of the most accepted pathophysiologic mechanism leading breast feeding jaundice is increased enterohepatic circulation due to the breast milk. Intestinal absorption is a key step in the enterohepatic circulation of bilirubin. It is not understood clearly how breast milk increases the intestinal absorption of bilirubin. But some authors have been suggested that cytokins and growth factors might be responsible for the increased bilirubin absorption.

Bacteria population of the intestine seems a possible factor which can affect the bilirubin absorption. In the recent years it has been shown that breast milk is a biologic active nutrient enriched with cytokins, growth hormones and bacteria population. The staphylococcus, lactococcus, enterococcus and lactobacillus are the most common determined bacterial species in the human milk. In these species lactobacillus have been suggested to play probiotic action. The antiinflammatory and immune modulating role of probiotics have been demonstrated in several studies. The gastrointestinal effects of probiotics found in the breast milk considered the possible role of bacterial agents in the prolonged breast milk jaundice. Although breast milk related prolonged jaundice have been evaluated for several ways, we have not found any study investigating the role of probiotic properties of breast milk in prolonged jaundice.

In the present study, it is aimed to investigate the effect of bacterial content of breast milk and infant feces on prolonged jaundice. For this purpose 30 healthy and 30 breast milk related prolonged jaundice (jaundice ongoing at 15th day) followed up in the newborn outpatient's clinic of Dokuz Eylul University Faculty Of Medicine included the study. The breast milk samples and feceses of newborns were evaluated in content of selected bacterial population with PCR.

By the end of this research, inter-individual differences has been detected between breast milk and feces samples. Bifidobacterium bifidum content of the breast milk and bifidobacterium adolentis, bifidum and longum content of the feces samples were higher in the control group than the prolonged jaundice group. After corelation analysis breast milk bifidobacterium bifidum and feces bifidobacterium bifidum, aolentis and longum content have been found to be negative correleted with bilirubin level.

Our results suggested that bifidobacterium species seem to be protective against breast milk jaundice. If the results of the further studies support our findings, and the efficacy and safety of probiotics gain more clarity in neonatal area, probiotics may be suggested as a treatment modality in breast milk jaundice.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Sarılık yenidoğan döneminde en sık görülen, neden olabileceği santral sinir sistemi toksisitesi nedeniyle hekimleri ve aileyi endişelendiren bir klinik sorundur. Hayatın ilk bir haftasında term bebeklerin %60, preterm bebeklerin ise %80'inde sarılık gözlenir. Tüm yenidoğanlarda %2-15, anne sütü ile beslenenlerde ise %40'a varan oranlarda uzamış sarılık görülmektedir ¹.

Anne sütüne bağlı uzamış sarılık, yenidoğan döneminde oldukça sık görülmesine rağmen patolojik nedenlerin ekarte edilmesi için çok sayıda tetkik gerektirmektedir ¹.

². Anne sütüne bağlı uzamış sarılığın nedenine dair bugüne kadar onlarca teori ortaya atılmıştır. Buna neden olduğu düşünülen anne sütünün içeriği ile ilişkili en klasik mekanizmalar; anne sütünde hepatik glukoronil transferaz inhibitörü bulunması, bilirubin konjugasyon ve metabolizmasını engelleyen serbest yağ asitleri, yüksek bilirubin glukuronidaz içeriği ve bilirubin içeren enterohepatik siklusunun artmasıdır ³.

⁴. Anne sütü sarılığında Uridin difosfat glukuroniltransferaz (UGT 1A1) ve hem oksijenaz (HOX) enzim genlerindeki polimorfizmlerin rolü olduğunun gösterilmesi anne sütünün genetik zemini olan hastalarda çevresel bir faktör olarak rol oynadığını düşündürmektedir ⁵.

Anne sütü sarılığında en önemli mekanizmalardan birisi artmış enterohepatik dolaşımdır. Mekonyum ciddi miktarlarda bilirubin içerir ve gecikmiş pasajı bilirubin geri emiliminde artışa neden olmaktadır. Mekonyum pasajındaki gecikme ve artmış enterohepatik dolaşımın özellikle erken anne sütü sarılığında rolü olduğu düşünülmektedir ⁶.

Çalışmamıza konu olan ve intestinal bilirubin emilimini etkileyen bir başka önemli faktör ise intestinal bakteri popülasyonudur. Buradaki bakteriler bilirubin glukuronidleri çeşitli urobilinoidlere çevirerek intestinal emilimi azaltırlar. Son

yapılan çalışmalarda anne sütünün steril bir sıvı olmaktan çok uzak olduğu ve infant barsağı için sürekli ve yoğun bir bakteri kaynağı olduğu gösterilmiştir ⁷. İnsan sütünde bulunan bakteriler staphilococcus, lactococcus, enterococcus, lactobacillus ve bifidobacteria türlerindedir. Bu grup içinde en fazla probiyotik olarak bilinen ve son zamanlarda üzerinde çok fazla çalışma yapılan laktobasillus türleridir. Probiotiklerin anti inflamatuvar, antimikrobiyal, immun modülatör ve gastrointestinal sistem üzerine etkileri vardır. Yenidoğanlarda laktobasillus reuteri suplementasyonunun beslenme toleransını ve barsak fonksiyonlarını arttırdığı görülmüştür ⁸.

Anne sütünden izole edilen bakterilerin türleri, sıklığı ve bireysel farklılıklar, bunların bebeğin gastrointestinal florasına ve uzamış sarılıкта çok önemli bir mekanizma olan enterohepatik siklusa olan etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı; anne sütüne bağlı uzamış sarılığın anne sütü içeriğindeki ve bebeğin barsak florasındaki mikroorganizmalarla ilişkisini araştırmak, bakteri populasyonu açısından tür ve sayıca bireysel farklılıkları ortaya koymaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. YENİDOĞAN SARILIĞININ TANIMI

Yenidoğan sarılığı, tanım olarak bilirubin düzeyinin deri ve sklerada gözle görülebilir sarı renge neden olacak kadar yükselmesidir. Bebeğe sarılığın fark edilir hale gelmesi plazma bilirubin düzeyinin 5mg/dl veya üstüne çıktığı durumlarda görülür. Hayatın ilk bir haftasında term bebeklerin %60, preterm bebeklerin ise %80'inde sarılık gözlenir. Fizyolojik yenidoğan sarılığı bilirubin metabolizmasındaki temel basamakların aktivasyon düzeylerindeki gelişimsel farklılıklar sonucunda oluşan aşırı bilirubin yükü nedeniyle ortaya çıkar. Yenidoğan sarılığının en büyük zorluğu bir yandan fizyolojik olması, diğer yandan da indirek hiperbilirubineminin kalıcı nörolojik hasar nedeniyle acil yaklaşım gerektiren bir sorun olması nedeniyledir^{9,10}.

4.2 BİLURUBİN METABOLİZMASI

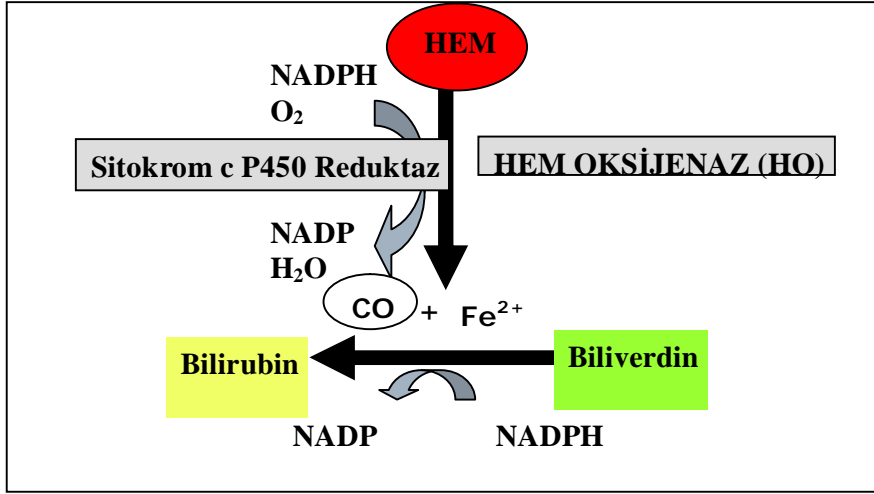
Bilirubin metabolizmasındaki ana basamaklar; bilirubin sentezi, plazmada taşınması, karaciğere alımı, hepatik konjugasyon, safraya atılması ve barsaktan geri emilmesidir¹¹.

4.2.1 Bilirubin sentezi:

Bilirubin hem katabolizması sonucunda oluşan yeşil bir pigment olan biliverdinin indirgenmesi sonucunda oluşan yeşil-turuncu bir pigmenttir. Yenidoğanlarda üretilen bilirubinün yaklaşık %75'i dolaşan eritrositlerin hemoglobininin gelen eritropoetik hem metabolizmasından kaynaklanır. Kalan %25 ise noneritropoetik heminin yıkılması ile ortaya çıkar.

Hem molekülünün katabolik yolundaki ilk basamak aynı zamanda hız kısıtlayıcı basamak olan biliverdin oluşumudur. Mikrozoal bir enzim olan hem oksijenazın etkisiyle gerçekleşen bu basamakta heminin alfa metilen bağı açılır, böylece vücutta yeniden kullanılabilen demir ve solunum yoluyla uzaklaştırılan karbon monoksit (CO)

açığa çıkar ve biliverdin oluşur. Biliverdin suda eriyebilen ve kolayca atılabilen bir moleküldür ve biliverdin redüktaz enzimi ile hızla bilirubine dönüştürülür (Şekil 1). Sonuçta ortaya çıkan indirekt bilirubindir ve lipofilik olduğu için lipid hücre membranlarını kolayca geçebilme ve normal pH'da suda erimeme özelliklerine sahiptir ^{11,12}.



Şekil 1: Hem metabolizması

Hemin yıkılması ile oluşan indirekt bilirubin serumda taşınmaz, karaciğer ya da böbrek tarafından atılamaz, çünkü serbest bilirubinin çözünürlüğü 7,8'in altındaki pH'larda oldukça düşüktür. Ancak indirekt bilirubin plazma albumini veya hepatik ligandin gibi nonpolar, hidrofobik bileşikler için yüksek afiniteli proteinlere bağlandığında plazma gibi su içeren solüsyonlarda çözünür hale gelir. ¹¹.

4.2.3 Bilirubin metabolizması ve karaciğerdeki transportu:

Hepatositte bilirubinin alımı, konjugasyonu ve atılımı olmak üzere 3 ana basamak meydana gelir. Her bir basamak erişkinle karşılaştırıldığında yenidoğanda yetersiz kapasitededir ¹¹.

4.2.4 Alımı:

Hepatosit hücre duvarını geçtikten hemen sonra suda erimeyen indirekt bilirubin hücre içi proteinlere bağlanır. Sitoplazmik bu proteinlerin en önemlisi glutatyon-S transferaz

(Y proteini) olarak bilinen ligandindir, diğerk bağlayıcı protein Z-proteinidir. ¹¹.

4.2.5 Konjugasyon:

Bilirubin konjugasyonu endoplazmik retikulumda üridindifosfat (UDP)-glukuronil transferaz enziminin katalizörlüğü ile oluşur. Bir dizi enzimatik reaksiyon sonucunda UDP-glukuronik asitten bilirubine glukuronik asit transfer edilerek konjugasyon sürecinin ilk aşamasında bilirubin monoglukuronid oluşur. Oluşan monoglukuronid ya atılır, ya da depolanarak diglukuronid haline dönüştürülür ¹¹.

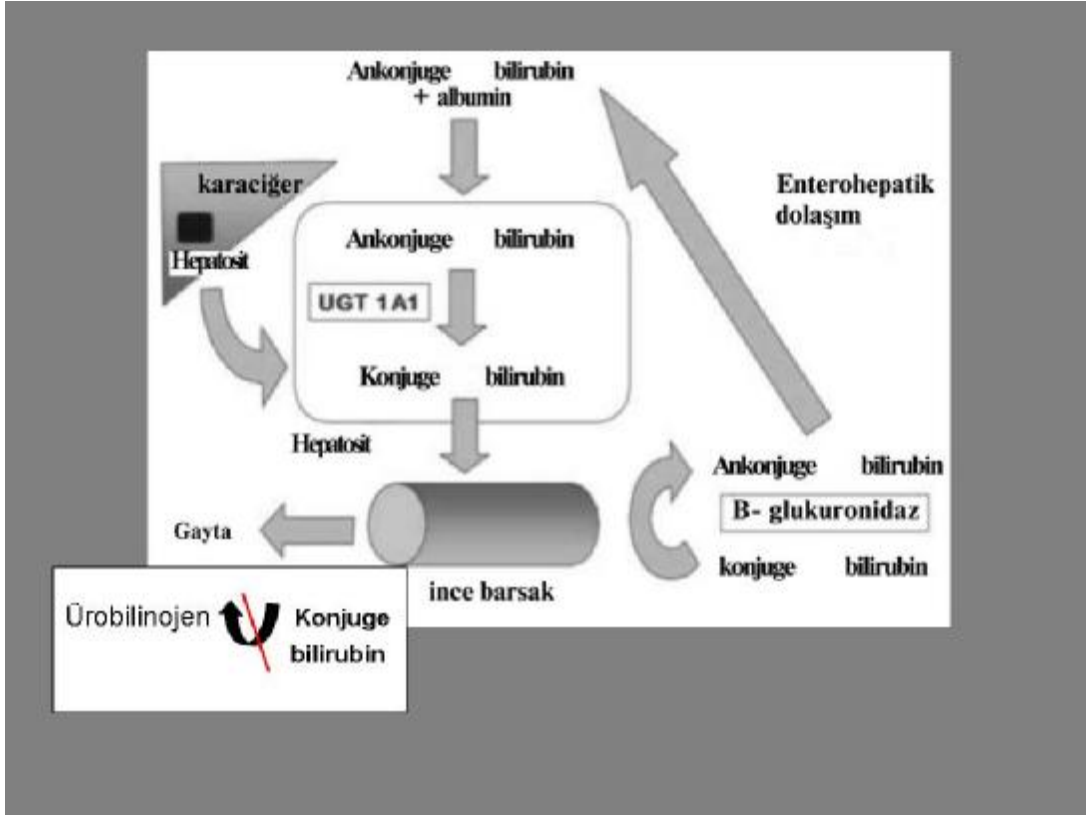
4.2.6 Atılımı:

Bilirubin konjuge olduktan sonra büyük konsantrasyon farkına karşın enerji gerektiren aktif bir süreçle safraya atılır. Bilirubinün transhepatik taşınmasında konjuge bilirubinün hepatositte kanaliküllere taşınması hız kısıtlayıcı bir basamaktır. ¹¹.

4.2.7 Enterohepatik dolaşım:

Barsağa ulaşan konjuge bilirubin geri emilemez. Konjuge bilirubin stabil olmayan ester olarak intestinal lümeninde kolayca indirek şekilde hidrolize olabilir. Yenidoğanlarda başlangıçta mukozal bir enzim olarak bulunan ve daha ileri dönemlerde bakterilerce oluşturulan beta glukuronidaz ve yenidoğanın üst intestinal sistemindeki alkali pH'da konjuge olan bilirubinün indirek bilirubine dönüşümünü sağlar. Oluşan indirek bilirubin pasif mekanizma ile geri emilir. Geri emilen bilirubin portal dolaşım ile tekrar karaciğere gelmektedir.

Distal barsak kesimlerine gelen bilirubin ise burada bir seri hidroksilasyon ve redüksiyon işlemleri ile ürobilinoidlere (ürobilin, ürobilinojen, sterkobilinojen, sterkobilin) dönüşür. Bu aşamada E.coli ve Clostridyum perfringens rol oynamaktadır. Oluşan ürobilinojenin de bir kısmı karaciğerk tarafından reabsorbe olup enterohepatik dolaşıma girer (şekil 2) ^{4, 11}. Böylece total hepatik bilirubin ekskresyonun hemen hepsi fekal yolla atılırken, çok küçük bir kısmı idrarla ürobilinojen olarak atılır (Şekil 2) ^{10, 12}



Şekil 2. Yenidoğanda Bilurubin Metabolizması

4.3.YENİDOĞAN SARILIĞININ EPİDEMİYOLOJİSİ

Yenidoğanların büyük bir kısmında yaşamlarının ilk günlerinde sarılık gelişse de çoğunluğu fizyolojiktir. Fizyolojik sarılık için klasik tanımlamalar yapılmakla birlikte sarılık doğal seyri ırk ve etnik kökene göre anlamlı değişiklikler göstermektedir ¹¹. Klasik olarak patolojik sarılığa yol açabilecek, ırk, etnik köken, maternal diabet, düşük doğum ağırlığı, anne sütü ile beslenme, sarılıklı kardeş öyküsü gibi risk faktörleri tanımlanmasına rağmen olguların yaklaşık %50 'sinde altta yatan neden tanımlanamamaktadır. İndirek hiperbilirubinemi gelişimi açısından risk faktörleri Tablo 1 'de özetlenmektedir ².

Doğu Asya ırkından olma (Çin, Japonya, Kore), sarılıklı kardeş öyküsü ve aile öyküsünün risk faktörleri içinde bulunması altta yatan genetik nedenleri düşündürmektedir ^{9, 13}.UGT 1A1 genindeki bazı polimorfizmlerin etnik farklılıklardan

sorumlu olabileceği ortaya konulmuştur. Bu genin promotör bölgesindeki timinadenin (TA) tekrar sayısındaki farklıklarının Asya, Afrika ve Kafkas ırkında değişiklikler gösterdiği ve UGT enzim aktivitesinde farklılıklar yaratarak bilirubin metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir. Asya ırkına UGT geninde gösterilmiş başka bir mutasyonun ise (G71R) ciddi hiperbilirubinemi riskinde artışa yol açtığı saptanmıştır¹³.

Tablo 1. Yenidoğan Sarılığında Risk Faktörleri

Maternal faktörler	Perinatal faktörler	Neonatal faktörler
1. Irk veya etnik grup <ul style="list-style-type: none"> – Asya – Yerli Amerikalılar – Yunanistan adaları 2. Gebelik komplikasyonları <ul style="list-style-type: none"> – Diabetes mellitus – Rh uygunsuzluğu – ABO uygunsuzluğu 3. Doğum sırasında hipotonik solüsyonlarda oksitosin kullanımı 4. Anne sütüne ait faktörler (geç başlangıçlı anne sütü sarılığı)	1. Doğum travması <ul style="list-style-type: none"> – Sefal hematom – Ekimozlar 2. Enfeksiyon <ul style="list-style-type: none"> – Bakteriyel – Viral – Protozoal 	1. Prematürite 2. Genetik faktörler a) Konjugasyonun ailesel hastalıkları <ul style="list-style-type: none"> – Gilbert sendromu – Crigler-Najjar sendromu tip I-II b) Diğer enzimatik defektler <ul style="list-style-type: none"> – G6PD eksikliği – Pirüvat kinaz eksikliği – Heksokinaz eksikliği – Konjenital eritropoetik porfiri c) Yapısal eritrosit defektleri <ul style="list-style-type: none"> – Sferositoz – Eliptositoz 3. Polisitemi 4. İlaçlar 5. Anne sütünün yetersiz alımı (erken başlangıçlı anne sütü sarılığı)

4.4. SARILIKLI YENİDOĞANIN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.4.1 Fizyolojik Sarılık:

Sarılığın yenidoğanlarda çok sık rastlanan bir sorun olması ve çoğu hastada sarılığın fizyolojik nedenlere bağlı olması nedeniyle fizyolojik sarılık tanımında güçlüklerle karşılaşmaktadır. Normal koşullar altında kord kanındaki indirek bilirubin düzeyi 1-3 mg/dL' dir. Yaşamın ilk 24 saatinde < 5mg/dL olacak şekilde yükselir ve 2-4 günlerde 5-6 mg/dL'yi bulur ve 5-7. günlerde 2 mg/dL'ye kadar düşme eğilimi gösterir. Klasik olarak 12,9 mg/dl'yi aşan total bilirubin değerleri patolojik sarılık olarak kabul edilmektedir.

Aşağıdaki koşulların varlığında fizyolojik sarılık tanısı dışlanır.

- İlk 24 saate gözlenen sarılık
- Serum Total Bilurubin konsantrasyonunun 12, 9mg/dL'yi aşması
- Serum Total Bilurubin konsantrasyonunun saatte 0,2 mg/dL'den veya günde 5 mg/dL'den daha fazla artış göstermesi
- Direkt serum bilirubininin total bilirubin değerinin %20 'sini aşması.
- Sarılığın term bebekte 2, preterm bebekte 3 haftayı aşması ¹⁰.

Sarılık şiddetinin toplumsal kökene göre değişiklik göstermesi, bebeğin kaçınıcı saatinde hangi bilirubin değerinde olduğunun tek bir bilirubin değerine göre riskli bebekleri saptamada daha değerli oluşu nedeniyle fizyolojik sarılığın klasik tanımı günümüzde eleştirilere hedef olmaktadır ¹⁴.

4.4.2.PATOLOJİK SARILIK

İndirekt hiperbilirubinemi ile ilgili major patolojik durumlar Tablo 2’de özetlenmiştir

11 .

Tablo 2. Patolojik indirekt hiperbilirubinemi nedenleri
A- Artmış bilirubin üretimi (yenidoğanın hemolitik hastalığı)
1. Kan Grup Uyumsuzluğu
a. Rh uyumsuzluğu
b. ABO uyumsuzluğu
c. Subgrup uyumsuzluğu
2.Eritrosit enzim anomalileri
a. Glukoz-6 fosfat dehidrogenaz eksikliği
b. Pirüvat kinaz eksikliği
3. Sepsis
4. Eritrosit membran bozuklukları
a. Herediter sferositoz
b. Eliptositoz
c. Poikilositoz
5. Damar dışı alanda kan (ekimoz, sefal hematom)
6. Polisitemi
B-Bilirubin atılımında azalma
1- Hormonal bozukluk (hipotiroidizm, hipopituitarizm)
2. Bilirubin metabolizma bozuklukları
a. Crigler Najjar sendromu tip1 ve tip 2
b. Gilbert sendromu
c. Lucey-Driscoll sendromu
3. Artmış Enterohepatik dolaşım
a. İntestinal obstrüksiyon, pilor stenozu
b. İleus, mekonyum plağı, kistik fibrozis

4.5. UZAMIŞ SARILIK

Uzamiş sarılık fizyolojik sarılık süresini aşan dönemde klinik olarak saptanan sarılıktır. Klasik olarak term bebeklerde 2 haftayı, preterm bebeklerde ise 3 haftayı aşan sarılık uzamiş sarılık olarak tanımlanmaktadır ^{15, 16}. Uzamiş sarılık tüm yenidoğanlarda %2-15, anne sütü ile beslenenlerde ise %40'a varan oranlarda görülmektedir ¹. Anne sütü dışında uzamiş sarılığa yol açan nedenlerin çoğu nadir görülse de özellikle acil tanı ve tedavi gerektiren konjenital hipotiroidi ve direkt hiperbilirubinemi ekarte edilmelidir ¹⁵. Sarılığın hemolitik olup olmadığının belirlenmesi yaklaşım açısından önemlidir (Tablo 3) ⁴.

Tablo 3 Uzamiş indirek hiperbilirubinemi nedenleri

Hemoliz bulgular var	Hemoliz bulguları yok
Neonatal durumlar Yaygın ekimoz, sefal hematom Polisitemi ABO ve Rh uyumsuzluğu Eritrosit enzim anomalileri G6PD eksikliğine bağlı hemolitik kriz Piruvat kinaz eksikliği Eritrosit membran defektleri Hereditör sferositoz Diğer membran defektleri	Neonatal durumlar Anne sütü sarılığı G6PD eksikliği Konjugasyon bozuklukları UGT 1A1 promotor defektleri Crigler Najjar Tip 1 ve Tip 2 Diğer Hipotiroidizm Galaktozemi Pilor stenozu İntestinal obstrüksiyon İlaç tedavileri
G6PD: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz; UGT 1A1: Uridin difosfat glukuroniltransferaz.	

4.5.1 Hemoliz varlığında uzamış sarılık

Yenidoğan infantlarda fizyolojik olarak eritrositlerde artmış yıkım söz konusudur. Özellikle polisitemik infantlarda, sefal hematumlu ve doğum travmalı vakalarda abartılı hemoliz görülebilir. Hemoliz açısından diğer risk faktörleri ABO ve Rh uyumsuzluğunda olduğu gibi maternal antijenlere maruziyettir.

Eritrosit glukoz metabolizmasında yer alan G6PD, piruvat kinaz gibi enzimlerin eksikliğinde eritrosit yaşam ömrü azalır ve hemoliz artar. G6PD enzim eksikliği dünya popülasyonunun yaklaşık olarak %4,9'luk bir kısmını etkilemektedir. Daha çok Yunanistan, Türkiye, Sardinya ve Nijerya'dan gelen ailelerde ve özellikle Irak, İran ve Suriye'den gelen Yahudilerde görülür. G6PD eksikliği tanısı bilirubini anlamlı şekilde yüksek tüm bebeklerde, özellikle erkekse ve bilirubinde geç başlangıçlı bir artış varsa her zaman düşünülmelidir ¹⁵. X'e bağlı genetik geçiş gösterse de X kromozomunun inaktivasyonuna bağlı olarak dişi infantları da etkileyebilmektedir. G6PD enzim eksikliğine neden olan 140'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu nedenle G6PD enzim eksikliği klinik olarak kronik hemolitik anemiden normal enzim aktivitesine kadar geniş bir yelpazede kendini göstermektedir. G6PD eksikliğine bağlı uzamış sarılıkta hemolizin belirgin izlenmediği sinsi bir gidiş izlenebilir. Bu infantlar tehlikeli sarılık düzeylerine ulaşırsalar dahi masif hemoliz bulguları gözlenmeyebilir. Bu gibi durumlarda hiperbilirubinemi bozulmuş bilirubin konjugasyonu ve G6PD eksikliğine bağlı düşük seviyeli hemolize bağlı olabilir ⁴.

Herediter sferositoz gibi eritrosit membran anomalileri de artmış eritrosit yıkımına neden olarak indirekt hiperbilirubinemiye yol açar. Hafif hemoliz yapan durumların saptanmasında büyük çocuk ve erişkinlerde kullanılan geleneksel tanı metotlarının sıklıkla faydalı olmadığı unutulmamalıdır ⁴.

4.5.2. Hemoliz olmayan durumlarda uzamış sarılık

Hepatik bilirubin konjugasyonundaki bozukluklar hemoliz olmaksızın uzamış sarılığa neden olurlar.

2.5.2.1 UGT 1A1 mutasyonları

Bilirubin konjugasyonundan sorumlu olan UGT 1A1 enzimini kodlayan gende mutasyon hem anne sütü, hem de formülayla beslenen infantlarda enzim aktivitesini azaltarak konjugasyonu bozar. Çok sayıda UGT 1A1 gen mutasyonu tanımlanmış olup bu mutasyonların bir dizi hastalık spektrumuna yol açtığı bilinmektedir. En ciddi formu UGT 1A1 enziminin hiç sentezlenemediği Crigler Najjar Tip 1'dir. Yenidoğan döneminde kernikterus ve ölüme yol açabilecek kritik bilirubin değerleriyle karşımıza çıkmaktadır. Otozomal resesif geçişli çok nadir bir hastalık olup görülme sıklığı milyonda birdir. Crigler Najjar Tip 2 enzim aktivitesinin kısmen korunmuş olduğu formu olup bilirubin değerleri nadiren fototerapi sınırını aşar. Crigler Najjar Tip 2'deki hastalar ayrıca UGT 1A1 enzimini indükleyen fenobarbital tedavisinden de fayda görmektedir¹⁷.

UGT 1A1 mutasyonlarının yol açtığı spektrumun en az ciddi hastalığı Gilbert Sendromudur. UGT 1A1 enzim fonksiyonel aktivitesi korunmuştur ancak düzeyi normalin 1/3-1/10'u arasındadır. Açlık, yorgunluk, hastalık durumunda kendiliğinden düzelen hafif sarılığa neden olmaktadır. Gilbert Sendromuna yol açan mutasyonlar sık görülmekte olup %8'in üzerinde prevalansı olduğu tahmin edilmektedir^{4, 17}.

Türkiye'deki UGT 1A1 gen polimorfizmi, sarılık ilişkisi incelendiğinde farklı iki çalışmada açıklanamayan uzamış sarılık ve patolojik sarılıkta Gilbert Sendromunda en sık saptanan polimorfizm olan UGT 1A1 geninin promotör bölgesindeki timin-adenin (TA) tekrar sayısındaki farklılıkların rolü araştırılmıştır. Her iki çalışmada da bu bölgedeki tekrar polimorfizminin çalışma popülasyonunda sık olarak saptandığı ve

uzamış veya patolojik sarılık etiolojisinde anlamlı rolü olmadığı belirtilmiştir^{18, 19}. Yakın dönemde Türkiye'den bildirilen bir çalışmada ise yalnızca anne sütü ile beslenen sağlıklı term bebeklerde UGT 1A1 geni promoter bölgesindeki homozigot veya heterozigot TATA box polimorfizminin anlamlı hiperbilirubinemi gelişiminde risk faktörü olduğu saptanmıştır²⁰.

Formulayla beslenen infantlarda da UGT 1A1 mutasyonlarının uzamış sarılığa yol açtığı bilirse de yalnızca anne sütü alan UGT 1A1 mutasyonlu bebeklerde uzamış sarılık daha sık görülmektedir^{21, 22}. Bu durum anne sütündeki bir veya daha fazla maddenin genetik yatkınlığı olan infantlarda sarılığı tetiklediğini düşündürmektedir²¹.

4.5.2.2 Diğer non-hemolitik etiolojik nedenler:

Normal bilirubin metabolizması ve hemoliz yokluğunda hiperbilirubineminin diğer nedenleri de akılda tutulmalıdır. Galaktoz-1 fosfat üridiltransferaz eksikliğinden kaynaklanan galaktozemi uzamış indirek hiperbilirubinemi ile karşımıza çıkabilse de konjuge hiperbilirubinemi daha sık gözlenmektedir. Hipotiroidizmde uzamış sarılık nedeni net olarak anlaşılmasa da hipotiroidizmin UGT enzim maturasyonunda gecikmeye yol açtığı düşünülmektedir^{23, 24}.

Pilor stenozu uzamış sarılığa yol açabilir. Özellikle pilor stenozu ve UGT 1A1 mutasyonu ile birlikteliğinde sarılığa eğilim artmaktadır⁴.

Uzamış sarılığı olan asemptomatik infantların idrar yolu enfeksiyonu açısından tetkik edilmesi konusundaki görüşler çelişkilidir. İdrar yolu enfeksiyonunun araştırılmasının gerekliliğini destekleyen bir çalışmada geç başlangıçlı sarılık vakalarında (>8 gün) idrar yolu enfeksiyonu sıklığında normal populasyonda belirtilene göre anlamlı artış saptanmıştır. Ancak kontrol grubunun olmaması, enfeksiyonun sünnetsiz erkeklerde daha fazla saptanması ve direkt hiperbilirubinemide artış saptanması nedeniyle bu sonuç tartışmalara yol açmıştır²⁵.

Günümüzde yaygın olan görüş diğer açılardan sağlıklı olan asemptomatik uzamış sarılıklı infantlarda idrar kültürünün gereksiz olduğudur²⁶⁻²⁸. Amerikan Pediatri Akademisi direk hiperbilirubinemi veya sepsis kuşkusu varlığında idrar kültürü alınmasını önermektedir. National Institute for Health and Clinical Excellence'in (NICE) 2010 yılında yayınladığı yenidoğan sarılığı klavuzunda ise uzamış sarılıklı yenidoğanlarda idrar kültürü alınması önerilmektedir.¹⁶

4.5.3 Uzamış sarılıkta ileri tetkik zamanı

Uzamış sarılıkta önemli fakat nadir rastlanan etiyolojik nedenlerin ekarte edilmesi bir yandan bebeğe çok sayıda testin yapılmasına yol açmakta, diğer yandan aile üzerinde ciddi bir endişe yaratmaktadır. Yakın dönemde bildirilen bir çalışmada uzamış sarılık nedeniyle 14. günde değerlendirilen ve diğer açılardan sağlıklı görünen bebekler ileri tetkikler için 21. gün tekrar çağrıldığında bu bebeklerin %43'ünde sarılığın iyileştiği gözlenmiştir. Uzamış sarılık tetkiklerinin 1 hafta ertelenmesi hastaların yarıya yakınında gereksiz tetkik yapılmasını engellerken bu gecikme nedeniyle önemli bir patolojinin gözden kaçırılmadığı bildirilmiştir²⁹.

Amerikan Pediatri Akademisi 35 haftanın üzerindeki yenidoğanlarda hiperbilirubinemiye yaklaşım kılavuzunda hastalık bulgusu olmayan infantlarda sarılık 3. haftayı aşarsa direk hiperbilirubinemi açısından değerlendirilmesini, hipotiroidi ve galaktozemi açısından yapılmış olan tarama testlerinin gözden geçirilmesini önermektedir². NICE 2010 yılında yayınladığı yenidoğan sarılığına yaklaşım klavuzunda term bebeklerde 2 haftayı, preterm bebeklerde 3 haftayı aşan sarılık durumunda ileri tetkiklerin yapılmasını önermektedir¹⁶. Ülkemizde galaktozemi açısından tarama yapılmaması ve hastaların düzenli takibinde karşılaşılabilen sorunlar nedeniyle kliniğimizde term bebeklerde 14 günü aşan sarılık durumunda ileri tetkikler yapılmaktadır.

4.5.4. ANNE SÜTÜ VE SARILIK

Anne sütü sarılığı uzamış sarılığın en sık nedenidir. Anne sütü ve sarılık ilişkisi ilk kez 1960'lı yıllarda ortaya atılmıştır. Sarılığın başlangıç dönemine göre erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı anne sütü olmak üzere iki gruba ayrılır³.

Anne sütü ile ilişkili sarılık yaşamın birinci veya ikinci haftasında başlar ve 12. haftaya kadar sürebilir. Anne sütü ile ilişkili sarılık insidansı 2-3. haftadaki infantlarda % 36 olarak bildirilmiştir. Amerikan Pediatrik Akademisinin “yalnızca anne sütü ile beslenme devam etmeli” önerilerine rağmen anne sütünü kesmek hem tanısal, hem de tedavi yaklaşımı olarak sıklıkla uygulanmaktadır³⁰. Güncel olarak anne sütüne bağlı sarılıkta anne sütünün kesilmesi desteklenmemektedir. Uzamış sarılığa neden olabilecek patolojik nedenlerin dışlanması kesintisiz anne sütünün devamına olanak sağlayacaktır⁴.

Anne sütüne bağlı persistan indirek hiperbilirubinemi normal kilo alımı, normal gaita ve idrar çıkışı ve patolojik bulguların olmaması ile karakterizedir. Başlangıçta anne sütü sarılığı klinik bir sorun olarak tanımlandığından dolayı anne sütünün içeriğinde hiperbilirubinemiyle ilişkili olan ajanı anlamaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Hayvan deneylerinde matür anne sütünün indirekt bilirubin düzeylerini enterohepatik dolaşımı stimule ederek arttırdığı saptanmıştır^{31, 32}. Yakın dönemde yapılan bir çalışmada anne sütüne bağlı sarılıklı hastalarda serum ve anne sütündeki Epidermal Growth Factor (EGF) düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Artmış EGF'nin bilirubin emilimini arttırarak uzamış sarılığa yol açtığı düşünülmektedir³³.

4.5.4.1 Erken başlangıçlı anne sütü sarılığı:

Anne sütü ile yeterince beslenememe veya yetersiz anne sütü ile beslenme sarılığı olarak adlandırılması daha uygundur. Genellikle yaşamın 2-3. günlerinde başlar. Yaşamın ilk haftasında anne sütü ile beslenenlerde insidansı % 12,9 (bilirubin düzeyi > 12 mg/dl) olarak saptanmıştır. Altta yatan nedenin kalori alımındaki yetersizlik sonucu artmış enterohepatik dolaşım olduğu düşünülmektedir. Mekonyum ciddi miktarlarda bilirubin içerir ve gecikmiş pasajı neonatal hiperbilirubinemi ile ilişkilidir. Formula ile beslenen infantlarda hayatın ilk üç gününde daha fazla gaita çıkışı ve daha fazla bilirubin atılımı vardır. Anne sütü alanlarda serum bilirubin seviyeleri gaita çıkışının artmasıyla düşer³⁴. 2000'li yılların başında Amerikan Pediatri Akademisi ve CDC (Centers for Disease Control) tarafından son 15 yılda kernikterus vakalarında belirgin artış olduğu, anne sütünün ağır hiperbilirubinemide ciddi bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir. Anne sütü sarılığının ilk tanımlandığı yıllarda hemolizle ilişkisinin saptanmaması kernikterusa yol açmayacağı yanlıgısına düşürmüştür. Ancak kernikteruslu vakaların dörtte birinden daha az bir kısmında hemoliz bulunması, diğer açılardan sağlıklı anne sütü ile beslenen term bebeklerde de kernikterusun gösterilmesi anne sütü sarılığı ile ilgili ciddi endişelere neden olmaktadır. Amerikan Pediatri Akademisi 2004 yılındaki 35 hafta ve üzerindeki yenidoğanlarda sarılığa yaklaşım klavuzunda ağır hiperbilirubineminin önlenmesi için anahtar önerilerde öneride bulunmuştur. 2009 yılında bu klavuz güncellenerek ağır hiperbilirubinemi riskini saptamak için taburculuk öncesi her bebekte bilirubin ölçümü önerilmiş, hastaların risk grubuna göre takibinde net algoritmeler sunulmuştur^{2,3}.

4.5.2.2. Anne Sütüne Bağlı Uzamış Sarılık

Anne sütüne bağlı uzamış sarılık oranı infantların %2-4'ünde gözlenmektedir. Anne sütü ile beslenenlerin ise %10-30'unda 2-3 haftadan sonra sarılık gözlenmekte ve 3 aya kadar devam edebilmektedir. Anne sütü ile beslenen bebeklerin yaklaşık üçte birinde klinik olarak, üçte ikisi ise biyokimyasal olarak iki haftalık olduklarında sarılık gözlenmektedir ve bu bebeklerin tümü indirekt hiperbilirubinemilidir. 8000 infantın değerlendirildiği bir çalışmada anne sütü alan bebekler formula ile beslenenlerle kıyaslandığında orta dereceli sarılık insidansı 3 kat (total bilirubin >12 mg/dl), ağır düzeyde sarılık görülme insidansı ise (total bilirubin düzeyi >16 mg/dl) 6 kat daha fazla bulunmuştur³⁵.

Erken başlangıçlı anne sütü sarılığı anne sütünün yetersiz alımına bağlı iken geç başlangıçlı anne sütü sarılığı anne sütünün biyolojik özellikleriyle ilişkilidir. Bu iki sarılık türü farklı durumlara işaret etse de aralarında ilişki bulunmaktadır. Yaşamın 2-3. haftasından sonra anne sütüne bağlı uzamış sarılığı tespit edilen infantlarda yaşamın ilk 3-5 günü içerisinde anne sütüne veya başka bir nedene bağlı sarılık daha yüksek oranda gözlenmektedir. Yaşamın ilk günlerinde vücutta artan bilirubin yükünün bu birliktelikten sorumlu olduğu düşünülmektedir³.

4.5.2.2.1 Anne sütü içeriğine bağlı uzamış sarılığın olası mekanizmaları

Yaklaşık 50 yıldır anne sütünün sarılık riskini arttırdığının bilinmesine ve bunun patofizyolojisine dair çok sayıda hipotezler ortaya konmasına rağmen anne sütünün neden hiperbilirubinemiye yol açtığı hala netlik kazanmamıştır³⁰.

Anne sütüne bağlı sarılık düşünölen olgularda kanda karboksihemoglobin, karbonmonoksit eskresyonunun mama ile beslenenlerden farklı olmayışı hemoliz faktörünü ekarte etmektedir,³

Anne sütü sarılığına neden olduğu düşünölen en klasik mekanizma anne sütünde bulunan progesteronun nadir bir metaboliti olan pregnan-3-alfa,20-beta-diol'ün Uridin Difosfat Glukuronik Asit (UDPGA) Glucuronil Transferaz enzimini inhibe ederek bilirubinin hepatik konjugasyonunun engellenmesidir^{3, 36}.

Anne sütü içeriğindeki lipaz ve serbest yağ asitleri uzamış sarılıkla ilişkisi en çok araştırılan biyolojik maddelerdendir. Anne sütündeki trigliseritlerden açığa çıkan yağ asitlerinin bilirubin konjugasyonunu inhibe ettiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Uzamış sarılığa yol açan annelerden alınan sütün invitro olarak UDPGT aktivitesini ve Z proteinin bağlayıcı etkisini inhibe ettiği saptanmıştır. Bu etki donmuş süt hemen çözdüröldüğünde veya 56 C° 'ye ısıtılmış sütte gözlenmemektedir. Isıtılmış süt sonradan +4 C° 'de bekletilse dahi inhibitör etki gözlenmemektedir. Ancak çözüdükten sonra 96 saat 4 C° bekletilmiş sütte sonradan ısıtılsa dahi inhibitör etki gözlenmiştir. Bu etki bekleyen sütte artmış lipolitik etkiyle açığa çıkan serbest yağ asitlerine bağlanmıştır. Isıtma ve bekletmenin sonuçları etkilemesi lipaz aktivitesinin ısıtmayla inhibe olması, bu nedenle de serbest yağ asidi oluşumunun önlenmesine bağlanmıştır. Yenidoğanda eksik olan safra tuzları nedeni ile yağ asitlerinin portal kana geçerek Z protein bağlanma noktalarını doldurduğu düşünölmektedir³⁷. Farklı çalışmalarda da uzamış sarılığı olan infantların anne sütünde sarılık olmayanların anne sütüne göre konjugasyonu inhibe eden artmış serbest yağ asitleri, lipaz ve safra asitlerinde artış gözlenmişse de³⁸, takip eden çalışmalarda bu farklılık doğrulanmamıştır^{37, 39, 40}.

Anne sütünde bulunan artmış β glukuronidaz aktivitesinin konjuge bilirubin hidrolizini arttırarak enterohepatik dolaşıma katılan bilirubin yükünü arttırması üzerinde durulan diğer bir mekanizmadır ^{41, 42}. Glukuronidasyon bilirubin atılımı sırasında gereken major metabolik basamaktır. Glukuronidasyon işleminin tersi barsakta glukuronik asitle konjuge olmuş bilirubin β glukuronidaz yoluyla hidrolize olarak reabsorbe olabilen indirek bilirubine dönüşümüdür. β glukuronidaz, çeşitli doku ve vücut sıvılarındaki lizozom ve mikrozomlarda bulunur. Anne sütüyle beslenen 34 yenidoğanın değerlendirildiği bir çalışmada anne sütündeki β glukuronidaz miktarları 3. gün ve 21. günde değerlendirildiğinde annelerin serum β glukuronidaz düzeylerinden 7-8 kat daha yüksek bulunmuştur. Formulada ise ihmal edilebilecek kadar az düzeyde β glukuronidaz saptanmıştır ⁴². Anne sütü ile beslenen infantların serumlarındaki β glukuronidaz düzeyleri ise formula ile beslenenlere göre anlamlı yüksek bulunmuştur ⁴²⁻⁴⁴. Yüksek gaita β glukuronidaz düzeylerinin yüksek bilirubin düzeyi ile korelasyon gösterdiğinin saptanması da anne sütündeki β glukuronidazın anne sütü sarılığındaki rolünü desteklemiştir⁴². Ancak daha sonraki çalışmalarda anne sütüne bağlı sarılığı olan ve olmayan bebeklerde anne sütü ve gaitada β glukuronidaz düzeylerinde anlamlı fark olmadığı, β glukuronidaz düzeyi ve bilirubin düzeyleri arasında da korelasyon bulunmadığı gösterilmiştir⁴⁵⁻⁴⁷.

Anne sütündeki Epidermal Growth Factor (EGF) düzeylerinin uzamış sarılık ile ilişkili olduğu saptanmıştır. EGF'nin sarılığı arttırıcı etkilerinin mekanizması tam olarak ortaya konmamış olsa da olası mekanizma olarak gastrointestinal motilitede ve intestinal absorpsiyonda artışa neden olduğu düşünülmektedir ³³.

Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada anne sütü alan bebeklerde bilirubin 20 mg/dl'nin üzerinde olma riskinin beraberinde UGT 1A1 veya organik anyon taşıyıcı gen (SLCO1B1) polimorfizmi birlikteliğinde 22 kat arttığı gösterilmiştir ⁴⁸.

Bilirubin oluşumu sırasında hız kısıtlayıcı basamak olan Hem'den biliverdin oluşumunu katalizleyen Hem Oxygenaz enzim genindeki (HOX) uzunluk polimorfizminin de anne sütüne bağlı uzamış sarılıkta rolünün olduğu gösterilmiştir ⁴⁹.

Anne sütüne bağlı sarılıkta UGT 1A1, HOX gibi bilirubin metabolizmasında rol oynayan gen polimorfizmlerinin rolünün gösterilmesi anne sütünün bazı genotipler için sarılığa yatkınlık sağlayıcı çevresel bir etmen olduğunu düşündürmektedir ^{5, 21, 48, 49}. Anne sütünün genotip-fenotip dönüşümünü hangi mekanizma yoluyla etkilediği günümüzde henüz açıklığa kavuşmamıştır.

4.5.2.2.2 Anne Sütü Mikrobiyal İçeriğinin Etkisi

İntestinal bilirubin emilimini etkileyen önemli faktörlerden biri intestinal bakteri popülasyonudur. Buradaki bakteriler bilirubin glukuronidleri çeşitli urobilinoidlere çevirerek intestinal emilimi azaltırlar ³⁰. Anne sütünde bakterilerin varlığı 30 yıl önce de bilinmekte olup bunların sütün sağılması esnasındaki kontaminasyondan kaynaklandığı düşünülmekteydi. Son yapılan çalışmalarda anne sütünün içeriğinin steril bir sıvı olmaktan çok uzak olduğu ve infant barsağı için sürekli ve yoğun bir yararlı bakteri kaynağı olduğu gösterilmiştir ⁵⁰. İnsan sütünde bulunan bakteriler Staphilococcus, Lactococcus, Enterococcus, Lactobacillus ve Bifidobacteria türlerindedir (Tablo 4). Bu grup içinde en fazla probiotik olarak bilinen ve son zamanlarda üzerinde çok fazla çalışma yapılan L.reuteri, L. gasseri, L. salivarius, L. rhamnosus, L. plantarum and L. Fermentum gibi laktobasiller dikkati çekmektedir. Probiotikler etkilerini antimikrobiyal, anti inflamatuvar, immun modülatör ve gastrointestinal sistem üzerinden mekanizmalarla gösterirler ⁸. İnvitro çalışmalarda çeşitli probiyotik ajanların H₂O₂, organik asitler ve bakteriosin üretimi yaparak E.Coli, salmonella spp., Listeria monositogenez gibi patojen bakterilerin üremesini

engellediği gösterilmiştir ^{51, 52}. Gastrointestinal sistemde kolonositlerin en önemli enerji kaynağı olan bitürat gibi metabolik ürünlerin oluşumunu sağladıkları ve besinlerin biyoyararlılıklarını arttırdıkları, gaita volüm ve sıklığını arttırdıkları bildirilmiştir ⁵³. Formulayla beslenen preterm infantlarda *L.reuteri* suplementasyonunun beslenme toleransını ve barsak fonksiyonlarını arttırdığı görülmüştür ⁵⁴.

Bifidobacterium türleri anne sütüyle beslenen infantlarda 3-6. günlerde intestinal floradaki predominant mikroorganizmadır. *Bifidobacteria*'ların doğum sırasında annenin doğum kanalından geçerken vertikal transferle alındığı düşünülmekteyken son zamanlarda yapılan çalışmalarda anne sütüyle beslenen infantların intestinal mikroflorasının anne sütündeki *bifidobacterium*ların direkt transferine bağlı olduğu gösterilmiştir ⁵⁵.

Tablo 4. Sağlıklı Annelerin Sütünden İzole Edilen Bazı Bakteri Türleri ⁸

<p>Staphylococcus spp</p> <p>S. Epidermidis</p> <p>S. Hominis</p> <p>S.Capitis</p> <p>S.aureus</p>	<p>Lactobacillus spp.</p> <p>L.gasseri</p> <p>L.rhamnosus</p> <p>L.acidophilus</p> <p>L.plantarum</p>	<p>Enterococcus sp</p> <p>E.faecium</p> <p>E.faecalis</p>
<p>Streptococcus spp</p> <p>S. salivarius</p> <p>S. mitis</p> <p>S.parasanguis</p> <p>S. peores</p>	<p>Bifidobacterium spp.</p> <p>B.Longum</p> <p>B.Bifidum</p> <p>B.Breve</p> <p>B.Catenatum</p> <p>B.adolescentis</p>	

4.5.2.2.3 Yenidoğan İntestinal Florası

Yenidoğan barsağı doğumda sterilidir. Yenidoğan barsak florasını etkileyen en önemli faktörler gestasyonel yaş, doğum şekli, perinatal-postnatal antibiyotik tedavisi ve beslenme şeklidir. Sezeyan seksiyoy ile doğum, prematürite ve antibiyotik maruziyeti bakteriyel kolonizasyonu geciktirir⁵⁶.

Normal spontan vajinal yol (NSVY) ile doğan term bebeklerde anne sütü ve formulanın bakteriyel kolonizasyona etkileri değerlendirildiğinde her iki grupta da 48. saatte Enterobakter hakimiyeti olduğu, ancak ilerleyen günlerde florada değişiklikler olduğu gözlenmiştir (Tablo 5)⁵⁷.

Tablo 5. NSVY ile doğan term bebeklerde anne sütü ve formulanın bakteriyel kolonizasyona etkileri:

Beslenme	48.h	6.gün	1.ay
Anne sütü	Enterobakter	Bifidobakter	Bifidobakter
Formula	Enterobakter	Bakteroides	Bifidobakter

Birinci ayda her iki grupta da Bifidobakter hakimiyeti olmakla birlikte anne sütü ile beslenenlerde 10 kat daha fazla kolonizasyon gözlenmiştir⁵⁷.

Anne sütü ve formula ile beslenen bebeklerde intestinal florayı değerlendiren başka bir çalışmada ise her iki grupta da bifidobakter türlerinin hakim olduğu, ancak formula ile beslenenlerde bakteroides, eubacteria, enterobacter, streptokok, clostridium ve pseudomonas türlerinin anne sütüyle beslenen gruba göre anlamlı olarak daha yoğun olduğu bulunmuştur⁵⁸.

Bifidobakteriler ve Laktobasillusların temel özellikleri:

- i. Fakültatif anaerob,
- ii. Hareketsiz,
- iii. Fermantasyon yapabilen,
- iv. Laktik asit üreten,
- v. Kısa zincirli yağ asidi (butirat) üretebilen,
- vi. Gram negatif basil olmalarıdır.

Bu özellikleri nedeniyle klebsiella, proteus, enterobakter gibi barsakta kolonize olan diğer fırsatçı patojenlerden ayrılırlar.

Laktobasillus ve bifidobakteriler tarafından oluşturulduğu bilinen **butirat** kolonositlerin temel enerji kaynağıdır ve intestinal fonksiyonların modülasyonunda temel rol oynar.

Laktobasillus türleri fekal nemi, gaita sıklığını ve volümünü arttırmaktadır. Ayrıca oluşturdukları mucus sayesinde intestinal bariyer oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Formulanın Lactobacillus rhamnosus ile desteklenmesinin besinlerin biyoyararlılığını arttırdığı saptanmıştır. L. Rhamnosus ile desteklenen formula ile beslenenlerde kontrol grubuna göre ilk 6 ayda büyüme artmıştır. Ancak 2009 yılındaki başka bir randomize kontrollü çalışmada büyüme üzerine anlamlı bir etki kaydedilmemiştir⁵⁹

Diğer yandan laktobasilluslar H₂O₂ gibi antimikrobiale ürünler üreterek ve besin ve intestinal epitelyal reseptörler için yarışa girerek enterotoksijenik bakterilerin üremesini engellerler⁸.

Bilirubin pigmentleri ve ürobilinoidler yaşamın ilk haftasındaki yenidoğanların gaitasında ölçüldüğünde infantların %57'lik bir kısmında 5. günden itibaren saptanabilmiştir. Ancak fekal ürobilinoid seviyesi erişkin düzeylerinin 10 'da birinden daha düşüktür. Yaşamın 6. haftasından itibaren fekal ürobilinoid düzeyleri erişkin düzeylerine yaklaşır. Clostridium ramusum, Clostridium perfringes, Clostridium difficile ve Bacteroidis fragiles türlerinin bu dönüşümden sorumlu olduğu saptanmıştır⁶⁰. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzamış kullanımının intestinal floradaki bu mikroorganizmaları baskılayarak fekal ürobilinoid olumunu azaltıp serum bilirubin düzeylerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir⁶¹. Clostridium türlerine özgü olan bilirubini ürobilinoidlere dönüştürerek atılmasını sağlama özelliği laktobasillus ve bifidobakteri türlerindeki bulunmamaktadır⁶².

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi yenidoğan polikliniğine başvuran, 38 hafta ve üzerinde olup 14. günden sonra bilirubin değeri 10 mg/dL üzerinde olan 30 bebek ile kontrol grubu olarak aynı demografik özelliklere sahip sklera ve ciltte gözle görülen sarılığı olmayan bebekler alındı. Tüm bebeklerde yalnız anne sütü ile beslenme ön koşulu arandı. Hastaların bilirubin düzeylerine göre takip ve tedavisi Amerikan Pediatri Akademisinin önerileri doğrultusunda uygulandı².

Bu çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Etik Kurulundan onay alındı. Bebeklerin ebeveynlerine bilgi verilerek Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu okuyarak imzalayan ailelerin bebekleri çalışmaya alındı.

5.1-Anne Sütü Sarılığının Tanımlanması

Postnatal 15. gün ve üzerinde olup klinik olarak sarılığı devam eden hastalarda öncelikle uzamış sarılık etiyojisinde rol oynayabilecek anne sütü sarılığı dışındaki nedenler dışlandı. Bu amaçla aşağıdaki tetkikler değerlendirildi.

- a. Kapiller bilirubin
- b. Tam kan sayımı
- c. Kan grubu, direk coombs testi
- d. Total ve direk bilirubin
- e. Tam idrar analizi, idrar kültürü
- f. Tiroidi fonksiyon testleri

g. G6PD enzimi

h. İdrarda redüktan madde

Kapiller bilirubin düzeyi 10 mg/dl'nin üzerinde olup uzamış sarılığa yönelik tetkikleri normal saptanan bebekler çalışma grubuna alındı. Bu tetkiklerin sonucunda hemolize sekonder anemisi olanlar, direk hiperbilirubinemisi olanlar, idrar yolu enfeksiyonu ve hipotiroidi saptananlar, idrarda redüktan maddesi pozitif olanlar çalışma dışı bırakıldı. Klinik olarak sarılığı olmayan bebekler ise kontrol grubuna dahil edildi. Her iki grupta da yalnızca anne sütü ile beslenenler, annede ve bebekte antibiyotik kullanım öyküsü olmayanlar ve doğum ağırlığına göre %10'un altında kilo kaybı olanlar çalışmaya alındı.

Uzamış sarılıkta istenen biyokimyasal, metabolik ve mikrobiyolojik tetkikler hastanemiz merkez laboratuvarında çalışıldı.

5.2. Örnek toplanması

Çalışma kriterlerini karşılayan hasta annelerinden her iki göğsünden sütün tamamı sağılarak içerisinden 5 cc steril tüp içine alındı. Bebeklerden steril kaba gaita numunesi alınarak örnekler - DNA eldesi ve PCR analizi yapılana kadar -20 °C'de dondurularak saklandı.

5.3. DNA Eldesi

Çalışma öncesinde süt örnekleri hızla eritilecek, DNA eksresyonu Clement ve Kitts metoduna göre, Ultra Clean Soil DNA izolasyon kiti (Mo Bio Laboratories, CA, USA) kullanılarak yapıldı⁶³. Fekal örnekler (0.1 gr) ve anne sütü (5 ml) 5ml'lik tamponda (10Mm Tris-HCL ve 50Mm EDTA, PH 7,5) tutularak aynı tamponda 4 kez yıkandı.

Daha sonra fekal ve anne sütü örnekleri 0,5 mg/ml lizozim ve 0,08 mg/ml N-asetilmuramidaz içeren 5 ml'lik solüsyonda tutuldu. Hücre lizizi için 37 C'de 30 dakika inkübe edilerek DNA ekskresyonu ve purifikasyonu yapıldı.

5.4. PCR Analizi.

RNase-DNase free tüplere toplanan süt ve gaita örnekleri izolasyon yapıncaya kadar -80°C'de saklandı. Örneklerden mikrobakteriyal DNA izolasyonu süt için High Pure PCR Template Preparation Kit® (Roche, Germany), gaita için ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo, U.S.A.) kullanılarak yapıldı.

Gaitadan mikrobakteriyel DNA izolasyonu için kitin kullanma kılavuzunda belirtilen protokol kullanıldı. Sütten mikrobakteriyal DNA izolasyonu için ticari bir kit bulunmadığından High Pure PCR Template Preparation Kit'in liziz basamağı modifiye edildi. 200µl süt rneği 3000 rpm'de RNase-DNase tüplerde santrifüj edildikten sonra süpernatantları atılıp dipte kalan pellet üzerine 5 µl Lysozyme (Roche, Germany) ve 200 µl RNase-DNase free su ilave edilip pipetaj ile homojenize hale getirildi ve 37°C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı. 15 dakika sonunda tp içerisinde bulunan örneğin tamamı kullanılarak kitin kullanma kılavuzunda belirtilen protokol ile DNA izolasyonu yapıldı.

Mikroorganizmanın Real-Time PCR ile deteksiyonu için UPL (Roche,Germany) taqman probları ve bu probların içine alan spesifik primerler (Genmar R&D,Turkey) kullanıldı. Real-Time PCR için kullanılan miks ve PCR koşulları tüm organizmalar için ortak dizayn edildi ve 1 çalışmada 21 farklı mikroorganizma saptanabildi (Tablo 6). Sonuçlar Real-Time PCR çalışmasının yapıldığı LightCycler 480 II (Roche, Germany) cihazının analiz programı kullanılarak "Abs Quant/2nd Derivative Max" metodu ile Crossing Point (Cp) değeri olarak hesaplandı. Elde edilen Cp değerleri konsantrasyonu bilinen DNA rnekleri kullanılmadığı için kantitatif olarak

değerlendirilemedi ve Real-Time PCR sonucu olarak elde edilen Cp değerlerinin DNA konsantrasyonu ile ters orantılı olmasından dolayı elde edilen Cp değerleri 100/Cp olarak istatistiksel analizde kullanılacak hale dönüştürüldü.

PCR çalışmaları Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) ve GENMAR Teşhis ürünleri araştırma geliştirme laboratuvarında gerçekleştirildi

Tablo 6. Gayta ve Anne sütünde PCR ile değerlendirilen mikroorganizmalar

Tür	Alt tür
Staphylococcus spp.	S. epidermidis S. hominis S. capitis S. aureus
Streptococcus spp.	S. salivarius S. mitis Streptococcus parasanguis
Lactobacillus spp.	L.gasseri L.fermentum L.salivarius L.reuteri
Enterococcus spp.	E. faecium E.faecalis
Bifidobacterium spp.	B.Longum B.Bifidum B.Adolentis
Bacteriodes spp.	Bacteroides fragilis
Clostridium spp.	Clostridium perfringes Clostridium ramusum Clostridium difficile

5.5-İstatistiksel Analiz

İstatistik analiz SPSS 17.0 versiyonu kullanılarak yapıldı; sonuçlar ortalama \pm standart sapma biçiminde verildi. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Student-t testi, kategorik verilerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı. $p<0,05$ saptanması anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenen mikroorganizmaların bilirubin değeri ile korelasyonunun değerlendirilmesi için bivariate pearson korelasyon analizi uygulandı.

6. SONUÇLAR

Çalışma koşullarına uyan 30 uzamış sarılık, 30 kontrol vakası alındı. Kontrol grubuna ait bir vakada gaita ve süttten teknik nedenlerden dolayı DNA izolasyonu yapılamadı.

Her iki grup demografik özellikler açısından kıyaslandığında ortalama doğum ağırlıkları, gestasyon haftaları, cinsiyet açısından gruplar arasında anlamlı fark görülmedi Anne sütü mikrobiyal içeriğini etkilediği bilinen doğum şekli açısından gruplar arasında fark izlenmedi. Gaita ve sütlerin toplandığı gün bakılan ortalama bilirubin değeri uzamış sarılıklı grupta $14,0\pm 2,7$ saptanırken kontrol grubunda $3,8\pm 1,1$ saptandı. Gaita ve sütlerin postnatal toplanma zamanı açısından gruplar arasında istatistiksel fark gözlenmedi (Tablo 7).

Tablo 7. Çalışma gruplarının demografik ve klinik özellikleri

	Uzamış Sarılık	Kontrol	p
Gestasyon haftası*	38,54±0,88	38,95±0,93	0,683
Doğum ağırlığı*	3158± 423	3275±424	0,891
Cinsiyet (kız/erkek)	16/14	18/12	0,351
Doğum şekli (n) (normal/sezeryan)	8/22	7/23	0,590
Anne yaşı*	29,06±5,14	27,80±	0,338
Bilirubin düzeyi* (mg/dl)	14,0±2,7	3,8±1,1	<0,001
Tetkik zamanı* (gün)	17,41±2,57	18,04±2,01	0,324

*Ortalama ± SD olarak belirtilmiştir.

Anne sütü ve gaitada PCR ile 21 bakteri türüne ait DNA eldesi yapıldı. Gruplar

arasında anne sütü ve gaitadaki bakteri türlerinin yoğunluğu (100/CP değeri olarak kantite edilmiş değerler) arasındaki fark student t testi ile değerlendirildi. Kontrol grubunda anne sütündeki bifidobakterium bifidum türlerinin konsantrasyonu uzamış sarılık grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Tablo 8). Kontrol grubundaki laktobasillus konsantrasyonu sarılık grubuna göre daha yüksek görünse de istatistiksel anlam saptanmadı.

Tablo 8. Çalışma gruplarında anne sütü mikrobiyal içeriğinin karşılaştırılması

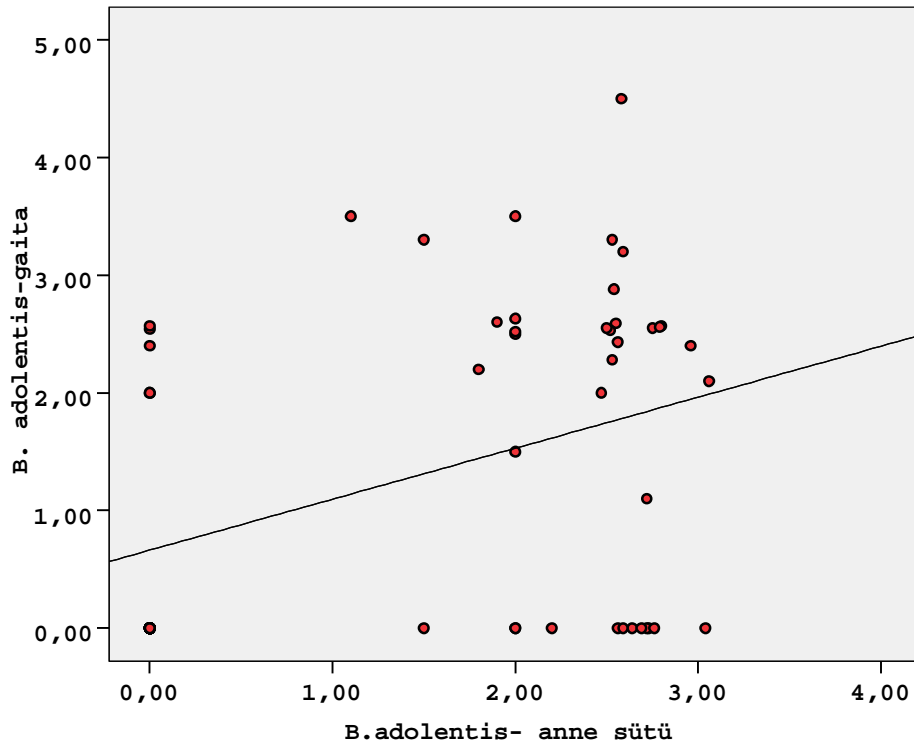
	Grup	Ortalama*	Std. Sapma	p
B. adolentis	us	1,0264	0,23478	0,006
	kontrol	1,9117	0,20008	
B.bifibifidum	us	0,6929	0,21043	0,002
	kontrol	1,6600	0,20431	
B.longum	us	0,6500	0,21942	0,376
	kontrol	0,9393	0,23688	
E. fecalis	us	0,6867	0,24044	0,470
	kontrol	0,9379	0,24777	
L.fermantum	us	0,2414	0,13505	0,846
	kontrol	0,2821	0,15978	
L.gasseri	us	0,4853	0,18193	0,499
	kontrol	0,6662	0,19426	
S.aures	us	1,4668	0,29531	0,515
	kontrol	1,2062	0,26738	
S.epidermidis	us	2,5815	0,18760	0,330
	kontrol	2,8243	0,16192	
S.salivarius	us	2,2822	0,22023	0,486
	kontrol	2,4918	0,20230	
S. Hominis	us	2,3574	0,22750	0,055
	kontrol	2,8848	0,12985	

* 100/ CP değerleri olarak ifade edilmiştir.

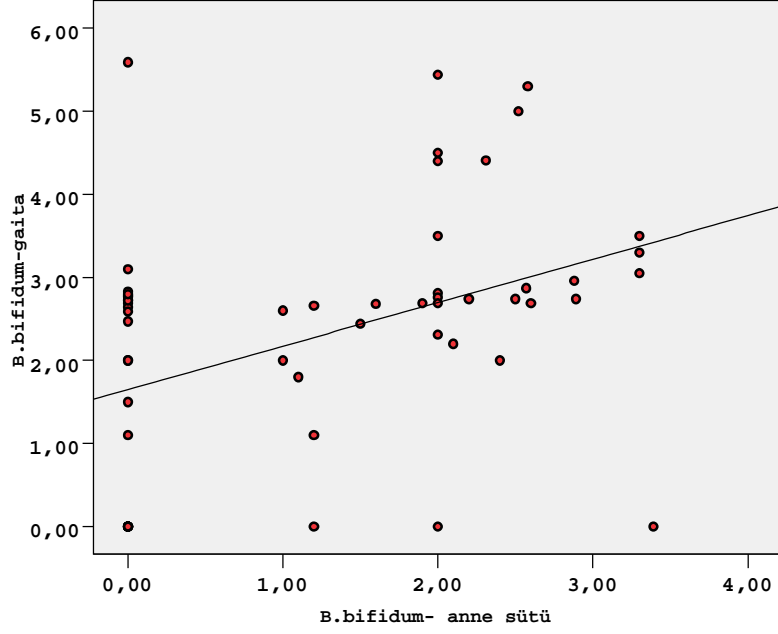
Gaita mikrobiyal içerikleri kıyaslandığında ise kontrol grubunda Bifidobakterium adolentis, bifidobakterium longum ve bifidobakterium bifida türlerinde istatistiksel anlamlı olarak artış saptandı. Kontrol grubunda gaitadaki laktobasillus türleri daha yüksek konsantrasyonda görünmekle birlikte istatistiksel

anlam saptanmadı. Clostridium türleri ve diğer bakteriler açısından gruplar arasında fark gözlenmedi.

Gruplar arasında gaita ve sütteki konsantrasyonu anlamlı olarak farklı çıkan mikroorganizmalar için gaita ve sütteki yoğunlukları arasında korelasyon analizi yapıldı. Bifidobakterium adolentisin ve bifidobakterium bifidum'un gaita ve sütteki miktarları arasında pozitif korelasyon saptandı (Şekil 3, 4).

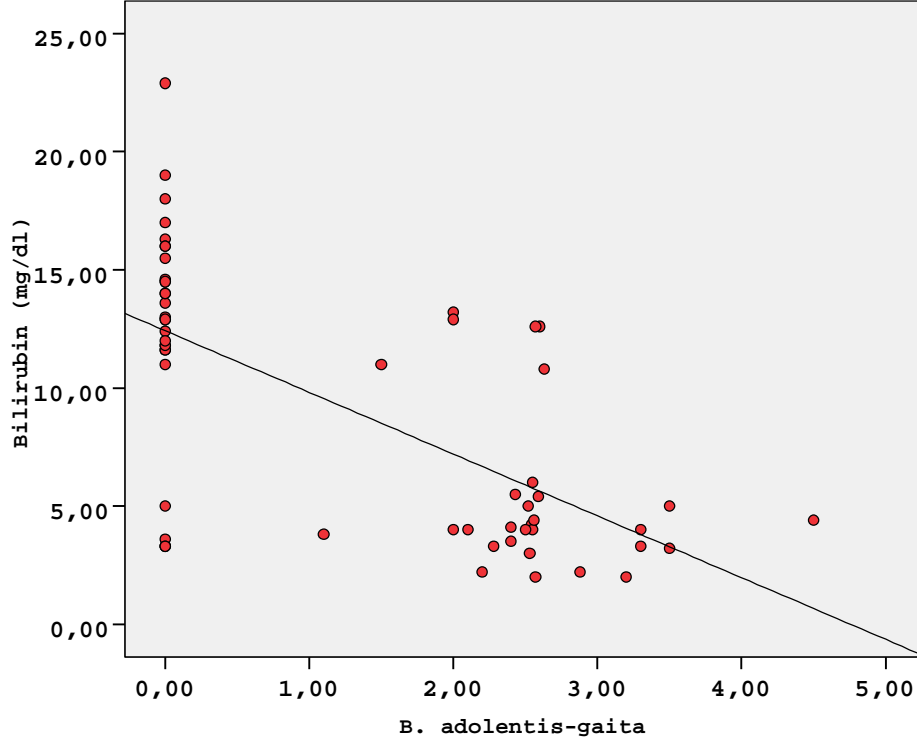


Şekil 3 B adolentis süt ve gaitadaki miktarları için korelasyon eğrisi R: 0,383, p= 0,003

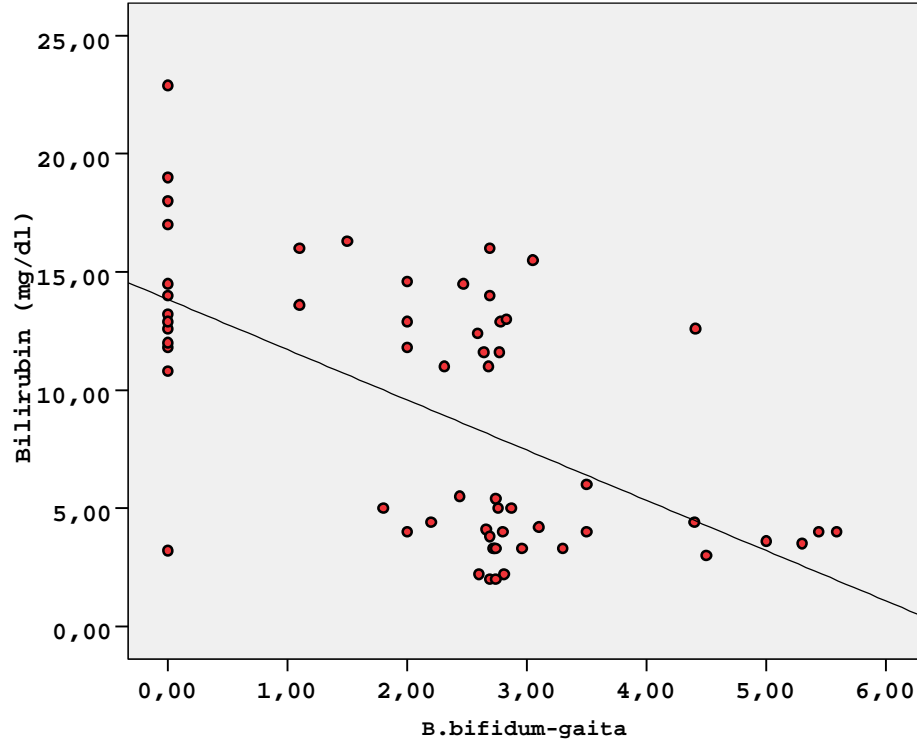


Şekil 4. B. bifidum anne sütü ve gaitadaki miktarlar için korelasyon eğrisi R: 0,481, p= 0,001

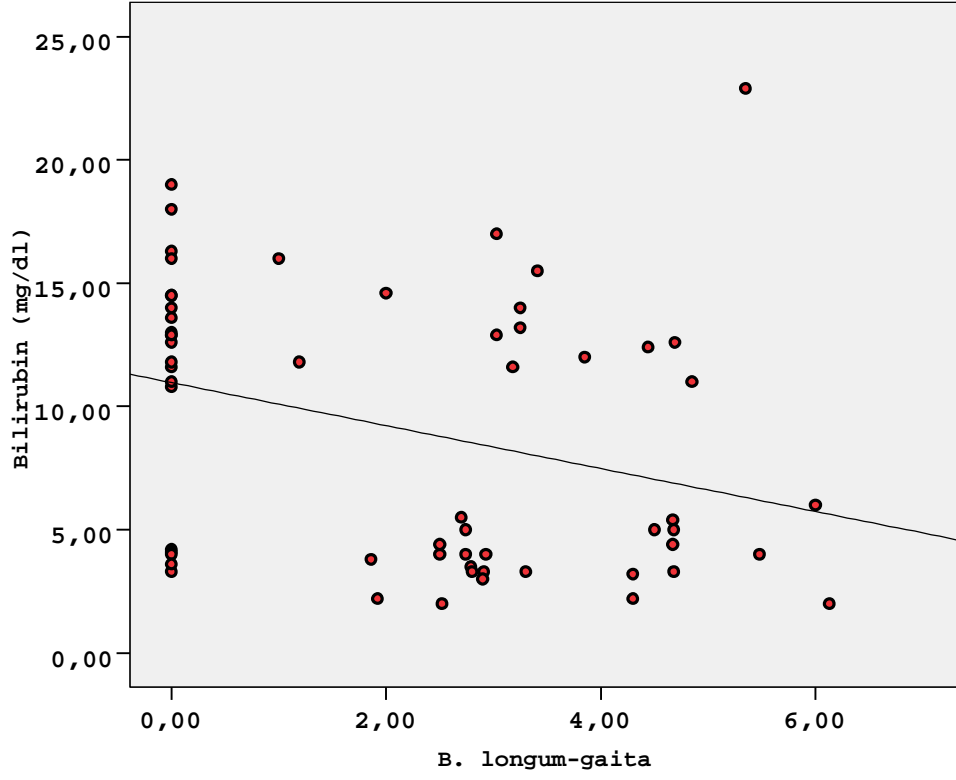
Aynı mikroorganizmaların gaita ve sütteki konsantrasyonları ile bilirubin değerleri arasında korelasyon analizi yapıldı. Gaitadaki B. adolentis, B. bifidum ve B. longum miktarları ile bilirubin değerleri arasında negatif korelasyon saptandı (Şekil 5,6,7). Sütteki B. bifidum konsantrasyonu ve bilirubin değerleri arasında negatif korelasyon izlenirken b. adolentis ve b. longum için korelasyon izlenmedi (Şekil 8)



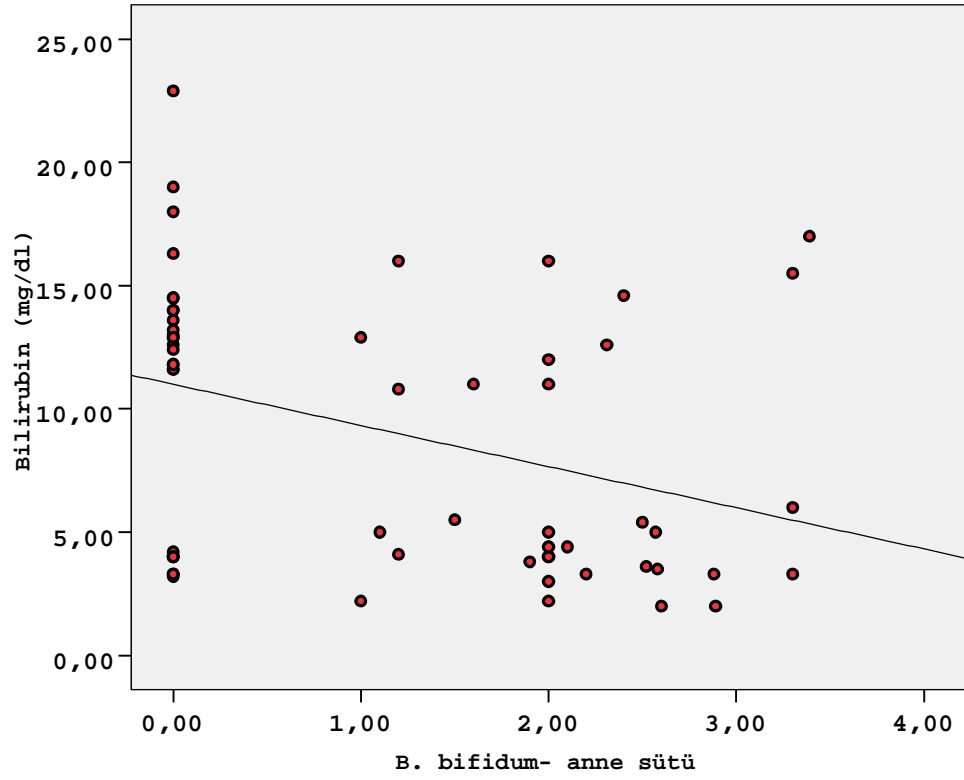
— Şekil 5 .B. adolentis gaita miktarları-bilirubin düzeyi korelasyon eğrisi $r: -0,584$, $p<0,001$



— Şekil 6 .B. bifidum gaita miktarları-bilirubin düzeyi korelasyon eğrisi $r: -0,584$, $p<0,001$



Şekil 7 B. longum gaita miktarları-bilirubin düzeyi korelasyon eğrisi $r: -0,358$, $p=0,005$



Şekil 8. B. Bifidum anne sütündeki miktarları-bilirubin düzeyi korelasyon eğrisi $r = -0,358$, $p=0,005$

7. TARTIŞMA

Anne sütüne bağlı uzamış sarılığın patofizyolojisine dair günümüze kadar çok sayıda hipotez öne sürülmüştür. Genetik yatkınlığı olan bireylerde anne sütü içeriğindeki çok çeşitli biyolojik faktörlerin buna neden olduğu genel olarak düşünülse de neden yalnızca anne sütü alan bebeklerin bir kısmında uzamış sarılık görülürken diğer bir kısmında görülmüyor sorusunun yanıtı henüz netlik kazanmamıştır.

Anne sütü sarılığında en önemli mekanizmalardan birisi anne sütüne bağlı artmış enterohepatik dolaşımdır. Anne sütünün bilirubinin intestinal absorpsiyonundaki artışa yol açmasının kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Anne sütünün bilirubinin intestinal absorpsiyonu azaltmasının mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir ancak anne sütü içeriğinde sitokinler ve büyüme faktörlerinin bundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda ise daha önceden anne sütünde bulunduğu gösterilmiş olan mikroorganizmaların anne sütü sarılığı ile ilişkisi ilk kez gösterilmiştir.

Bifidobacterium türleri anne sütüyle beslenen infantlarda üç ile altıncı günler arasında intestinal floradaki predominant mikroorganizmadır. Bifidobacteria'ların doğum sırasında annenin doğum kanalından geçerken vertikal transferle alındığı düşünülmekteyken son zamanlarda yapılan çalışmalarda anne sütüyle beslenen infantların intestinal mikroflorasının anne sütündeki bifidobacteriumların direkt transferine bağlı olduğu gösterilmiştir⁵⁵. Çalışmamızda da anne sütü ve gaitadaki bifidobakteri oranlarının pozitif korelasyon gösterdiği görülmüştür. Ancak anne sütündeki Bifidobacteriumların bebeğin intestinal florası ve allerjik hastalıklarla ilişkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada anne sütü ve infantın gaitasındaki bifidobakteri konsantrasyonlarının korele olmadığı saptanmıştır. Bunun nedeni olarak

çevredeki bakterin kolonizasyonu, anne sütündeki bifidogenik bakterilerin büyümesini destekleyen galaktooligosakkarid içeriği gibi faktörlerin bireysel farklılığı ya da feçesin bakteri kolonizasyonunu tam olarak yansıtmayabileceği düşünülmüştür⁶⁴.

Laktobasillus türleri fekal nemi, gaita sıklığını ve volümünü arttırmaktadır. Ayrıca oluşturdukları musin sayesinde intestinal bariyer oluşumuna katkıda bulunmaktadır⁵⁹. İntestinal florada bulunan Laktobasillus plantarum türlerinin epitelyel tight junction fonksiyonlarını düzenlediği ve intestinal homeostazdaki rolü in vivo olarak gösterilmiştir⁶⁵. Yakın zamanda yapılmış hücre kültür çalışmalarında da intestinal floradaki Laktobasillus plantarum türlerinin unkonjuge bilirubinin neden olduğu intestinal bariyer disfonksiyonunu düzelttiği gösterilmiştir⁶⁶. Gaita volümünü, sıklığını arttırması, musin sayesinde bariyer oluşturması ve epitelyal tight junction fonksiyonlarını düzenlemesi laktobasillusların enterohepatik dolaşımı azaltarak hiperbilirubinemiye karşı koruyucu olabileceği düşündürmüştür. Çalışmamızda kontrol grubunda uzamış sarılık grubuna göre gaitadaki laktobasillus yoğunluğu daha fazla görünmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Bilirubinin vücuttan uzaklaştırılmasında bilirubin-ürobilinojen döngüsünün rolü yıllardır bilinmektedir. *Clostridium ramosum*, *Clostridium perfringes*, *Clostridium difficile* ve *Bacteroidis fragiles* türlerinin bu dönüşümden sorumlu olduğu saptanmıştır⁶⁰. Yenidoğanlarda fekal ürobilinoit seviyesi erişkin düzeylerinin onda birinden daha düşüktür. Yaşamın 6. haftasından itibaren fekal ürobilinoit düzeyleri erişkin düzeylerine yaklaşır. Erişkin sıçanlarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzamış kullanımının intestinal floradaki clostridium türlerini baskılayıp fekal ürobilinoit oluşumunu azaltarak serum bilirubin düzeylerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir⁶¹. Clostridium türlerine özgü olan bilirubini ürobilinoidlere dönüştürerek atılmasını sağlama özelliği laktobasillus ve bifidobakteri türlerinde

bulunmamaktadır ⁶². Çalışmamızda infantların gaitalarındaki clostridium türleri yoğunluğunun uzamış sarılık üzerine etkisi görülmemiştir. Ancak gaitadaki bifidobakterium türlerinin yoğunluğu arttıkça clostridium türlerinin yoğunluğunun azalma eğiliminde olduğu göze çarpmaktadır. Yenidoğanlarda zaten clostridium düzeylerinin erişkine göre çok düşük bulunması⁶¹ veya fekal mikroorganizma içeriğinin intestinal florayı tam olarak yansıtmayışı clostridium konsantrasyonu ve bilirubin düzeyleri arasında ilişki bulmamamızın nedeni olarak düşünülmüştür.

Çalışmamızda anne sütündeki prebiyotik düzeyleri ve bu düzeylerin bilirubin değerleri ve gaitadaki probiyotik mikroorganizma konsantrasyonu ile ilişkisi değerlendirilmemiştir. Ancak prebiyotiklerin intestinal florayı etkileyerek intestinal motiliteyi arttırdığı ve bu sayede hiperbilirubinemiye karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir. Formula ile beslenen sağlıklı term yenidoğanlarda yapılan prospektif randomize kontrollü bir çalışmada formulaya ek olarak prebiyotik desteği kullanıldığında (kısa zincirli galakto-oligosakkarit) hiperbilirubinemiye karşı koruduğu gözlenmiştir ⁶⁷. Prebiyotik desteğinin de hiperbilirubinemi ile negatif korelasyon göstermesi yenidoğan intestinal florasındaki probiyotiklerin (özellikle de bifidobakterium türlerinin) uzamış sarılığı önleyebileceğini düşündürmektedir.

Anne sütüne bağlı uzamış sarılık gelişiminde Epidermal Büyüme Faktörünün (EGF) rolü daha önce tarafımızca gösterilmiştir. Çalışmamızla benzer çalışma protokolüne sahip bu çalışmada 30 sağlıklı kontrol ve 30 uzamış sarılık vakasında total bilirubin düzeyleri ile anne sütündeki EGF düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. EGF'nin hiperbilirubinemiye yol açan etkisi tam olarak gösterilememiş olsa da gastrik motiliteyi azaltmak, intestinal absorpsiyonu arttırmak ve bilirubin transportunu arttırmak yoluyla bu etkiye yol açtığı düşünülmektedir ³³. Bu iki çalışma sonuçları arasında bağlantı kurulduğunda bilirubin düzeyleri ile negatif korelasyon

gösteren bifidobakterium türleri ile EGF arasında daha önceden saptanmış bir ilişki gözlenmemiştir. Ancak genel olarak probiyotiklerin EGF ile etkileşimi incelendiğinde maya türü bir probiyotik olan *Sacharomyces Boulardi*'nin EGF reseptörlerini inhibe ettiği sonucu göze çarpmıştır ⁶⁸. Yaptığımız iki çalışma sonucunda anne sütündeki EGF ile intestinal bifidobakteri türleri yoğunluğunun hiperbilirubinemi üzerinde zıt etki yaratması bifidobakterilerin de EGF reseptörleri üzerinde inhibisyon yapabileceğini düşündürmektedir. Ancak çelişkili olarak intestinal probiyotiklerin barsaktaki EGF düzeylerini arttırdığını saptayan deneysel çalışmalar da mevcuttur ^{69, 70}.

Probiyotiklerin immunmodülatör ve gastrointestinal sistemdeki koruyucu özellikleri nedeniyle alerjik hastalıklarda, infantil kolikte, antibiyotikle ilişkili ishalden korunmada ve nekrotizan enterokolitte koruyucu özellikleri değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Anne sütünün canlı, biyolojik bir karışıma sahip olduğu uzun yıllardır bilirse de anne sütü mikrobiyal florasının türce ve sayıca bireysel farklılık gösterebileceği, bu farklılığın uzamış sarılık gelişiminde rolü olabileceği ilk kez gösterilmiştir. Her ne kadar anne sütüne bağlı uzamış sarılık kendi kendine gerileyen, zararsız bir durum olarak görülse de uzamış tetkiklere, tekrarlayan hastaneye yatışlara neden olmakta, aileleri ve hekimi tedirgin etmektedir. Özellikle intestinal bifidobakterium türlerinin artan yoğunluğunun bilirubin düzeyi ile negatif korelasyonunun saptanması ve anne sütündeki miktarların gaitadaki miktarlarla korele olması probiyotik desteğinin uzamış sarılıklı yenidoğanlarda faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak probiyotiklerin faydalı etkilerini destekleyen hızla artan klinik çalışmalara rağmen optimal doz, kullanım süresi, güvenilirlik açısından belirsizlikler mevcuttur. Probiyotiklerin kullanımına ilişkin cesaret verici kanıtlara rağmen çalışmaların çoğunun firma destekli olması, tek merkezli bağımsız çalışmalar

olması ve uzun dönem güvenilirlik sonuçlarının yetersiz olması nedeniyle Avrupa Pediatrik Gastroenteroloji ve Nutrisyon Komitesi (ESPHGAN) probiyotiklerin rutin olarak infant formulalarında kullanımını henüz onaylamamaktadır⁷¹.

Sonuç olarak, anne sütü mikrobiyal içeriği bireysel farklılıklar göstermekte olup özellikle anne sütünde ve gaitadaki bifidobakterium türlerinin artan yoğunluğu uzamış sarılığa karşı koruyucu görünmektedir. Anne sütü mikrobiyal içeriğinin annenin diyeti, meme başı florası ve çevresel koşullardan etkilenmekte olduğu düşünülmekle birlikte bu farklılığın nedeni henüz ortaya konmuş değildir. Çalışma sonuçlarımızın ileri çalışmalarla desteklenmesi ve probiyotiklerin yenidoğanda etkinlik ve güvenilirliğinin netlik kazanması durumunda anne sütüne bağlı uzamış sarılıkta bifidobakterium türlerinin kullanımı yeni bir tedavi seçeneği olarak düşünülebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Hannam S, McDonnell M, Rennie JM. Investigation of prolonged neonatal jaundice. *Acta Paediatr.* Jun 2000;89(6):694-697.
2. Pediatrics AAo. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics.* Jul 2004;114(1):297-316.
3. Gartner LM. Breastfeeding and jaundice. *J Perinatol.* Dec 2001;21 Suppl 1:S25-29; discussion S35-29.
4. Preer GL, Philipp BL. Understanding and managing breast milk jaundice. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* Aug 5.
5. Watchko JF. Genetics and the risk of neonatal hyperbilirubinemia: commentary on the article by Huang et al. on page 682. *Pediatr Res.* Nov 2004;56(5):677-678.
6. Gartner LM, Herschel M. Jaundice and breastfeeding. *Pediatr Clin North Am.* Apr 2001;48(2):389-399.
7. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol.* Oct 1999;65(10):4506-4512.
8. Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Rodriguez JM, Boza J, Xaus J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr.* Oct 2007;98 Suppl 1:S96-100.
9. Watchko JF, Daood MJ, Biniwale M. Understanding neonatal hyperbilirubinaemia in the era of genomics. *Semin Neonatol.* Apr 2002;7(2):143-152.
10. Maisels MJ. Jaundice. In: MacDonald Mea, ed. *Avery's Neonatology:*

Pathophysiology & Management of the Newborn. 6th ed. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams& Wilkins; 2005:768-846.

11. Madan A MJ, Stevenson DK. . Neonatal Hyperbilirubinemia. In: Taeusch HW BR, Gleason CA, ed. Avery's Diseases of the Newborn. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005:1226-1253.
12. Kleigman R. The fetus and the neonatal infant: Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. In: Kleigman RM BR, Jenson HB, Stanton BF, ed. Nelson Textbook of Pediatrics. 18 th edition ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2008:756-766.
13. Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Doida Y, Shimada M. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-glucuronosyltransferase polymorphism. Pediatrics. Jun 1999;103(6 Pt 1):1224-1227.
14. Maisels MJ. Neonatal jaundice. Pediatr Rev. Dec 2006;27(12):443-454.
15. Maisels MJ. Clinical rounds in the well-baby nursery: treating jaundiced newborns. Pediatr Ann. Oct 1995;24(10):547-552.
16. Neonatal Jaundice. 2010. <http://www.nice.org.uk/CG98>.
17. Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. J Hepatol. Jan 2003;38(1):107-117.
18. Ulgenalp A, Duman N, Schaefer FV, et al. Analyses of polymorphism for UGT1*1 exon 1 promoter in neonates with pathologic and prolonged jaundice. Biol Neonate. 2003;83(4):258-262.
19. Babaoğlu MO, Yigit S, Aynacıoğlu AS, Kerb R, Yurdakok M, Bozkurt A. Neonatal jaundice and bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene polymorphism in Turkish patients. Basic Clin Pharmacol Toxicol. Apr 2006;98(4):377-380.

20. Ergin H, Bican M, Atalay OE. A causal relationship between UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter polymorphism and idiopathic hyperbilirubinemia in Turkish newborns. *Turk J Pediatr.* Jan-Feb;52(1):28-34.
21. Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Sawa H, Shimada M. Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate- glucuronosyltransferase gene. *Pediatrics.* Nov 2000;106(5):E59.
22. Monaghan G, McLellan A, McGeehan A, et al. Gilbert's syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn. *J Pediatr.* Apr 1999;134(4):441-446.
23. Van Steenberghe W, Fevery J, De Vos R, Leyten R, Heirwegh KP, De Groote J. Thyroid hormones and the hepatic handling of bilirubin. I. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on the hepatic transport of bilirubin mono- and diconjugates in the Wistar rat. *Hepatology.* Feb 1989;9(2):314-321.
24. Labrune P, Myara A, Huguet P, et al. Bilirubin uridine diphosphate glucuronosyltransferase hepatic activity in jaundice associated with congenital hypothyroidism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* Jan 1992;14(1):79-82.
25. Garcia FJ, Nager AL. Jaundice as an early diagnostic sign of urinary tract infection in infancy. *Pediatrics.* May 2002;109(5):846-851.
26. Maisels MJ, Newman TB. Neonatal jaundice and urinary tract infections. *Pediatrics.* Nov 2003;112(5):1213-1214; author reply 1213-1214.
27. Sarici SU, Kul M, Alpay F. Neonatal jaundice coinciding with or resulting from urinary tract infections? *Pediatrics.* Nov 2003;112(5):1212-1213; author reply 1212-1213.
28. Rodie ME, Barclay A, Harry C, Simpson J. NICE recommendations for the

formal assessment of babies with prolonged jaundice: too much for well infants? Arch Dis Child. Oct 27.

29. Tyrell M, Hingley S, Giles C, Menakaya JO. Impact of delayed screening for prolonged jaundice in the newborn. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. Mar 2009;94(2):F154.
30. Gourley GR. Breast-feeding, neonatal jaundice and kernicterus. Semin Neonatol. Apr 2002;7(2):135-141.
31. Gartner LM, Lee KS, Moscioni AD. Effect of milk feeding on intestinal bilirubin absorption in the rat. J Pediatr. Sep 1983;103(3):464-471.
32. Alonso EM, Whittington PF, Whittington SH, Rivard WA, Given G. Enterohepatic circulation of nonconjugated bilirubin in rats fed with human milk. J Pediatr. Mar 1991;118(3):425-430.
33. Kumral A, Ozkan H, Duman N, Yesilirmak DC, Islekel H, Ozalp Y. Breast milk jaundice correlates with high levels of epidermal growth factor. Pediatr Res. Aug 2009;66(2):218-221.
34. De Carvalho M, Robertson S, Klaus M. Fecal bilirubin excretion and serum bilirubin concentrations in breast-fed and bottle-fed infants. J Pediatr. Nov 1985;107(5):786-790.
35. Schneider AP, 2nd. Breast milk jaundice in the newborn. A real entity. JAMA. Jun 20 1986;255(23):3270-3274.
36. Arias IM, Gartner LM, Seifter S, Furman M. Prolonged Neonatal Unconjugated Hyperbilirubinemia Associated with Breast Feeding and a Steroid, Pregnane-3(Alpha), 20(Beta)-Diol, in Maternal Milk That Inhibits Glucuronide Formation in Vitro. J Clin Invest. Nov 1964;43:2037-2047.
37. Constantopoulos A, Messaritakis J, Matsaniotis N. Breast milk jaundice; the

- role of lipoprotein lipase and the free fatty acids. *Eur J Pediatr.* Jun 1980;134(1):35-38.
38. Poland RL, Schultz GE, Garg G. High milk lipase activity associated with breast milk jaundice. *Pediatr Res.* Dec 1980;14(12):1328-1331.
 39. Odievre M, Luzeau R. Lipolytic activity in milk from mothers of unjaundiced infants. *Acta Paediatr Scand.* Jan 1978;67(1):49-52.
 40. Forsyth JS, Donnet L, Ross PE. A study of the relationship between bile salts, bile salt-stimulated lipase, and free fatty acids in breast milk: normal infants and those with breast milk jaundice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* Aug 1990;11(2):205-210.
 41. Cole AP, Hargreaves T. Conjugation inhibitors and early neonatal hyperbilirubinaemia. *Arch Dis Child.* Jun 1972;47(253):415-418.
 42. Gourley GR, Arend RA. beta-Glucuronidase and hyperbilirubinaemia in breast-fed and formula-fed babies. *Lancet.* Mar 22 1986;1(8482):644-646.
 43. Gaffney PT, Buttenshaw RL, Ward M, Diplock RD. Breast milk beta-glucuronidase and neonatal jaundice. *Lancet.* May 17 1986;1(8490):1161-1162.
 44. el-Kholy MS, Halim HY, Marzouk AH. Beta-glucuronidase and hyperbilirubinemia in breast-fed versus formula-fed babies. *J Egypt Public Health Assoc.* 1992;67(3-4):237-248.
 45. Wilson DC, Afrasiabi M, Reid MM. Breast milk beta-glucuronidase and exaggerated jaundice in the early neonatal period. *Biol Neonate.* 1992;61(4):232-234.
 46. Yau KI, Chien CH, Fong LL, Chen CL. Breast milk beta-glucuronidase in breast milk jaundice. *J Formos Med Assoc.* Mar 1992;91(3):287-293.

47. Yigit S, Ciliv G, Aygun C, Erdem G. Breast milk beta-glucuronidase levels in hyperbilirubinemia. *Turk J Pediatr.* Apr-Jun 2001;43(2):118-120.
48. Huang MJ, Kua KE, Teng HC, Tang KS, Weng HW, Huang CS. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatr Res.* Nov 2004;56(5):682-689.
49. Bozkaya OG, Kumral A, Yesilirmak DC, et al. Prolonged unconjugated hyperbilirubinaemia associated with the haem oxygenase-1 gene promoter polymorphism. *Acta Paediatr.* May;99(5):679-683.
50. Martin R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* Dec 2003;143(6):754-758.
51. Olivares M, Diaz-Ropero MP, Martin R, Rodriguez JM, Xaus J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol.* Jul 2006;101(1):72-79.
52. Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother.* May 1989;33(5):674-679.
53. Olivares M, Diaz-Ropero MA, Gomez N, et al. Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *Int J Food Microbiol.* Mar 15 2006;107(2):104-111.
54. Indrio F, Riezzo G, Raimondi F, Bisceglia M, Cavallo L, Francavilla R. The effects of probiotics on feeding tolerance, bowel habits, and gastrointestinal motility in preterm newborns. *J Pediatr.* Jun 2008;152(6):801-806.
55. Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology.*

2007;92(1):64-66.

56. Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. Aug 2006;118(2):511-521.
57. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*. Sep 1983;72(3):317-321.
58. Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol*. 1984;28(9):975-986.
59. Vendt N, Grunberg H, Tuure T, et al. Growth during the first 6 months of life in infants using formula enriched with *Lactobacillus rhamnosus* GG: double-blind, randomized trial. *J Hum Nutr Diet*. Feb 2006;19(1):51-58.
60. Vitek L, Kotal P, Jirsa M, et al. Intestinal colonization leading to fecal urobilinoid excretion may play a role in the pathogenesis of neonatal jaundice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Mar 2000;30(3):294-298.
61. Vitek L, Zelenka J, Zadinova M, Malina J. The impact of intestinal microflora on serum bilirubin levels. *J Hepatol*. Feb 2005;42(2):238-243.
62. Norin KE, Persson AK, Saxerholt H, Midtvedt T. Establishment of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in germfree mice and their influence on some microflora-associated characteristics. *Appl Environ Microbiol*. Jun 1991;57(6):1850-1852.
63. Clement BG, Kitts CL. Isolating PCR-quality DNA from human feces with a soil DNA kit. *Biotechniques*. Apr 2000;28(4):640-642, 644, 646.
64. Gronlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the

- Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy*. Dec 2007;37(12):1764-1772.
65. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Jun;298(6):G851-859.
 66. Zhou Y, Qin H, Zhang M, et al. *Lactobacillus plantarum* inhibits intestinal epithelial barrier dysfunction induced by unconjugated bilirubin. *Br J Nutr*. Aug;104(3):390-401.
 67. Bisceglia M, Indrio F, Riezzo G, Poerio V, Corapi U, Raimondi F. The effect of prebiotics in the management of neonatal hyperbilirubinaemia. *Acta Paediatr*. Oct 2009;98(10):1579-1581.
 68. Chen X, Fruehauf J, Goldsmith JD, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits EGF receptor signaling and intestinal tumor growth in *Apc(min)* mice. *Gastroenterology*. Sep 2009;137(3):914-923.
 69. Fordjour L, D'Souza A, Cai C, et al. Comparative effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on growth factors in the large bowel in a rat model of formula-induced bowel inflammation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Oct;51(4):507-513.
 70. D'Souza A, Fordjour L, Ahmad A, et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on messenger RNA expression of caveolin-1, NOS, and genes regulating oxidative stress in the terminal ileum of formula-fed neonatal rats. *Pediatr Res*. May;67(5):526-531.
 71. Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the

ESPGHAN committee on nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr.
Feb;52(2):238-250.