

Hiperbilirubinemili yenidoğanlarda fototerapinin serbest radikaller üzerine etkisi*

Hasan Koç¹, Mehmet Aköz², Mehmet Gürbilek², Mehmet Ak¹, Mahmut Ay², Ahmet Gürel², Ümran Çalışkan¹

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi ¹Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ve ²Biyokimya Anabilim Dalları, Konya

Amaç: İndirekt hiperbilirubinemili yenidoğanlarda fototerapinin serbest radikallere etkisinin araştırılması amaçlandı. **Yöntem:** Total bilirubinleri 15 mg/dl'nin üzerinde olan ve ortalama 44 saat fototerapi uygulanan 25 bebekte (fototerapi grubu) fototerapi öncesi ve sonrası bilirubin, hematokrit ve reaktif oksijen metabolitleri (ROM) düzeyi ölçüldü. Fototerapi uygulanmayan ve total bilirubin seviyeleri 10-15 mg/dl olan 25 bebek de (kontrol grubu) takibe alındı. **Bulgular:** Bebeklerin gebelik yaşları, ağırlıkları ve numune alındığı zamanki yaşam süreleri bakımından iki grup arasında önemli fark yoktu. Total bilirubin, direkt bilirubin, hematokrit ve ROM değerleri sırasıyla; fototerapi grubunda fototerapi öncesi 16.6±1.2 mg/dl, 0.5±0.1 mg/dl, % 56.8±4.8, 322±81 car unit. Fototerapi sonrası 8.1±1.5 mg/dl, 0.4±0.2 mg/dl, % 53.9±5.4, 240±64 car unit, kontrol grubunda ise 1. numunede 11.6±2.6 mg/dl, 0.4±0.1 mg/dl, % 55.0±4.8, 307±92 car unit, 2. numunede 11.8±1.9 mg/dl, 0.4±0.1 mg/dl, % 51.5±4.8, 314±80 car unit idi. Bilirubin değerleri yüksek olan ve fototerapi uygulanan grubun bilirubin ve ROM değerleri fototerapi sonrasında fototerapi öncesine göre anlamlı olarak düşüktü. Kontrol grubunda ise ilk ve ikinci ölçümler arasında fark yoktu. **Sonuç:** Fototerapi ile bilirubin değerleri düşerken ROM değerlerinde azalma olmaktadır.

Anahtar kelimeler: Yenidoğan, fototerapi, serbest radikal

The effect of phototherapy on free radicals in newborns with hyperbilirubinemia

Objective: It was aimed to evaluate the effects of phototherapy on free oxygen radicals in newborns with indirect hyperbilirubinemia. **Methods:** Determination of bilirubin, hematocrit and reactive oxygen metabolites (ROM) levels were carried out before and after phototherapy in 25 newborns (phototherapy group) in whom total bilirubin was higher than 15 mg/dl. 25 newborn in whom total bilirubin was 10-15 mg/dl constituted the control group. **Results:** There was no statistical difference between gestational age, weight and life-span of the infants. The values of total bilirubin, direct bilirubin, hematocrit and reactive oxygen metabolites (ROMs) were 16.6±1.2 mg/dl, 0.5±0.1 mg/dl, 56.8±4.8%, 322±81 car unit before and 8.1±1.5 mg/dl, 0.4±0.2 mg/dl, 53.9±5.4%, 240±64 car unit after phototherapy in the phototherapy group, respectively. The values were 11.6±2.6 mg/dl, 0.4±0.1 mg/dl, 55.0±4.8%, 307±92 car unit and 11.8±1.9 mg/dl, 0.4±0.1 mg/dl, 51.5±4.8%, 314±80 car unit in the control group at the first and the second samples, respectively. The levels of total bilirubin and ROMs before phototherapy were higher than those after phototherapy in the patient group. There was no statistical differences between values of hematocrit before and after phototherapy. **Conclusion:** We conclude that phototherapy decreases the levels of bilirubin as well as ROMs.

Key words: Newborn, phototherapy, free radicals

Genel Tıp Derg 1999;9(3):87-91.

*IX. Ulusal Neonatoloji Kongresinde (UNeko-98, Mersin, 25-28 Ekim 1998) bildiri olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi: Doç.Dr.Hasan Koç, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, 42080-Konya

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektronu olan atom veya moleküllerdir. Organizmada oluşan serbest radikallerin lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve DNA üzerine zarar verici etkileri vardır. Sağlıklı kişilerde serbest radikallerin üretimi ile antioksidan savunma sistemleri denge halindedir (1,2).

Doğum, oksijen yoğunluğu daha fazla olan bir ortama çıkan bebek için oksidatif bir streştir (3). Doğumdan sonra intrauterin döneme göre daha oksidatif bir ortama çıkan bebekte serbest radikal üretimi artar (3,4). Bebeklerin, özellikle de prematüre bebeklerin antioksidan savunma sistemleri yetersizdir. Bu nedenle prematürel retinopatisi, bronkopulmoner displazi, periventriküler-intraventriküler kanama ve nekrotizan enterokolit gibi hastalıkların sebebi olarak serbest radikaller gösterilmektedir. Serbest radikal üretiminde bebeğin doğum ağırlığı, prematüre olup olmadığı ve doğum sonrası yaşam süresi de önemlidir (3,5-8).

İndirekt hiperbilirubinemi yenidoğan bebeklerde sık karşılaşılan bir problemdir. Hiperbilirubinemi olan yenidoğan bebeklerde tedavi amacıyla, prematüre bebeklerde ise hayatın ilk günlerinde profilaktik olarak uygulanan fototerapi, fizyolojik bir antioksidan olan bilirubinin kan seviyesini düşürmektedir. Yapılan çalışmalarla (9-11) bilirubinin antioksidan etkisi kesin olarak gösterilmiştir. İndirekt hiperbilirubinemi tedavisinde en sık kullanılan yöntem fototerapidir (12,13). Fototerapinin bilinen ve henüz tam olarak belirlenememiş birçok yan etkisi vardır (14,15). Özellikle beta, gama ve x ışınları olmak üzere bütün yüksek enerjili elektromanyetik dalgaların serbest radikal kaynağı olduğu bilinmektedir. Fototerapi etkisi ile çift bağları okside etme yeteneği bulunan bir reaktif oksijen türü olan singlet oksijen açığa çıkmaktadır (16).

Bu çalışma fototerapi uygulaması ile kan bilirubin düzeyi düşürülürken serbest radikallerin nasıl etkilendiğini araştırmak amacıyla planlandı.

Yöntem

Bu çalışma Kasım 1996-Mart 1997 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Yenidoğan Ünitesinde hiperbilirubinemili bebekler üzerinde yapıldı.

Çalışmaya alınacak hiperbilirubinemili bebeklerde şu kriterler gözönünde tutuldu: Gestasyonal yaşın 38 haftadan küçük, 42 haftadan büyük olmaması; doğum ağırlığının 2500-4250 gram arasında olması; doğumun normal spontan vajinal yolla gerçekleşmiş olması ve asfiksi hikayesi bulunmaması (1. ve 5. dk Apgar skorunun 8'in üzerinde olması); bebeklerin fizik muayene bulgularının, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının tamamen normal olması; bebeklerin anne sütü ile besleniyor olması ve K vitamini dışında herhangi bir ilaç kullanma öyküsünün bulunmaması; bebeklerde ABO ve Rh uygunsuzluğu ile direkt Coombs testi pozitifliği bulunmaması ve hematokrit değerlerinin yenidoğan için belirlenen normal sınırlar arasında olması; bebeklerin direkt bilirubinlerinin total bilirubinlerinin % 10'undan daha az olması.

Bebekler iki gruba ayrıldı: Çalışma grubuna (fototerapi grubu) total bilirubini 15 mg/dl'nin üzerinde olup yatırılarak fototerapi uygulanan, ağırlıkları 2610-4250 gram arasında değişen ve ilk başvuru tarihinde yaşları 3-5 günlük olan 13'ü kız, 12'si erkek, toplam 25 bebek alındı. Kontrol grubu olarak da, total bilirubini 10 ila 15 mg arasında bulunan, ağırlıkları 2700-4000 gram arasında değişen ve yine 3-5 günlük olan 11'i kız, 14'ü erkek olmak üzere 25 bebek çalışmaya dahil edildi.

Fototerapi için 6 adet beyaz floresan lambadan (Philips 20w/52) oluşan cihaz kullanıldı. Bebeklere yaklaşık 40 cm mesafeden gözleri hariç tüm vücutlarına ortalama 44 saat süre ile fototerapi uygulandı.

Numuneler Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışıldı. İlk başvuruda alınan kanlar iki kısma ayrılarak 2 ml'si plastik tüpte 250 Ü (0.05 ml) heparin üzerine konulup hemen 2000 devirde 5 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve çalışma vaktine kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklandı. Alınan kanların heparinsiz kısımlarından serumları ayrılarak kan şekeri, üre, kreatinin, ALT, AST, total bilirubin, direkt bilirubin seviyelerine Technicon RA-XT marka otoanalizörde rutin metotlarla bakıldı. Hemolizli numuneler çalışmaya alınmadı. Venöz kanlardan hematokrit ölçümleri yapıldı. Fototerapi grubunun fototerapi sonrası ve kontrol grubunun 2 gün sonrası kanlarında total bilirubin, direkt bilirubin ve hematokrit ölçümleri tekrarlandı.

Saklanan plazma örneklerinde ROM (reaktif oksijen metabolitleri) düzeyleri Technicon RA-XT oto analizöründe ticari kit (d-ROMs test, Diacron s.r.l. Diagnostics Division, Via Zircone n. 8-58100 Grosseto-Italy) kullanılarak belirlendi. Mevcut materyaldeki peroksitlerle orantılı olarak serbest radikalın metal iyonları varlığında aromatik aminler ile reaksiyonu neticesinde karakteristik kırmızı renk oluşması prensibine dayanan test sonuçları convansiyonel ünite (car unit) olarak verilmektedir. 1 car unit % 0.08 mg hidrojen peroksit eşdeğer olarak kabul edilmektedir.

Elde edilen veriler bilgisayar ortamında SPSS for Windows 6.0 programı kullanılarak analiz edildi. Önce değişkenlerin dağılımı incelendi. Daha sonra fototerapi uygulanan ve uygulanmayan bebeklerin ağırlık, maturite ve ilk numune alındığındaki yaşları ve çalışılan parametreler Student'in t-testi kullanılarak karşılaştırıldı. Fototerapi öncesi ve sonrası ile kontrol grubunda ilk başvuru ve 2 gün sonraki kontrolde belirlenen total bilirubin, direkt bilirubin, hematokrit ve ROMs düzeyleri eşleştirilmiş t testi ile karşılaştırıldı.

Bulgular

Çalışma ve kontrol grubundaki bebeklerin ağırlık, maturite ve ilk numune alındığı zamanki yaşam süreleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$) (Tablo 1).

Tablo 1. Vakaların gebelik yaşları, ağırlıkları ve ilk numunelerin alındığı zamanki yaşam süreleri

	Kontrol grubu	Fototerapi grubu	t	P
Vaka sayısı (n)	25	25	-	-
Gebelik yaşı (hafta)	39.64±1.18	39.52±1.19	0.36	0.72
Ağırlık (g)	3241±694	3231±443	0.53	0.60
Yaşam süresi (saat)	96±16	96±18	0.00	1.00

Grupların total bilirubin, direk bilirubin, hematokrit ve ROM değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Çalışma grubunda fototerapi öncesi total bilirubin değerleri 16.56±1.22 mg/dl, fototerapi sonrası ise 8.11±1.51 mg/dl idi. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$). Kontrol altındaki grubun ilk (11.60±2.55 mg/dl) ve ikinci (11.79±1.90 mg/dl) total bilirubin düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($P>0.05$). Fototerapi sonrası total bilirubin düzeyi (8.11±1.51 mg/dl) kontrol altındaki grubun

her iki numunesindeki (11.60±2.55 ve 11.79±1.90 mg/dl) total bilirubinden anlamlı olarak düşüktü ($P<0.05$).

Tablo 2. Vakaların total bilirubin, direkt bilirubin, hematokrit ve ROM değerleri

	Kontrol grubu		Fototerapi grubu	
	İlk numune	İki gün sonra	Fototerapi öncesi	Fototerapi sonrası
Vaka sayısı	25	25	25	25
Total bil. (mg/dl)	11.6±2.6	11.8±1.9	16.6±1.2	8.1±1.5 ^{a,c}
ROM (car unit)	307±92	314±8	322±81	240±64 ^{a,c}
Hematokrit (%)	55.0±4.8	51.5±4.8 ^b	56.8±4.8	53.9±5.4 ^a

^a Fototerapi öncesine göre $P<0.05$

^b İlk ölçüme göre $P<0.05$

^c Kontrol grubuna göre $P<0.05$

Fototerapi sonrası ve kontrol grubunun son ölçümünde ilk ölçümlere göre hematokrit düzeyi önemli derecede düşük bulundu ($P<0.05$).

Fototerapi grubunda fototerapi öncesi 322±81 car unit bulunan ROM düzeyi fototerapi sonrasında 240±64 car unit; kontrol grubunda ise ilk ve son ölçümde ROM düzeyi 307±92 car unit, 314±80 car unit bulundu. Fototerapi sonrası ROM düzeyi hem fototerapi öncesine göre hem de kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde idi ($P<0.05$).

Fototerapi ile bilirubin seviyeleri düşerken ROM değerlerinde de azalma olduğu görüldü.

Tartışma ve sonuç

Bu çalışmada fototerapi sonrası ROM seviyesi fototerapi öncesine göre azalmış olarak bulunmuştur (Tablo 2). Fototerapinin sebep olduğu hemolizin eritrosit membranından potasyum kaybı veya membran ATPaz aktivitesinde azalmaya bağlı olduğu savunulmaktadır (17,18). Ayrıca sarılıklı ratlarda fototerapinin eritrosit osmotik frajilitesini artırdığı bildirilmiştir (19). Hemoliz ile açığa çıkan serbest hemoglobinin antioksidan etkisi olduğu bilinmektedir. Yang ve Bono yaptıkları in vitro bir çalışmada (20) fizyolojik konsantrasyondaki oksimiyoglobinin (bir hem proteini) kültürdeki endotel hücrelerini ksantin/ksantin oksidaz ve hidrojen peroksitin sebep olduğu zarardan koruduğunu göstermişlerdir. Ayrıca hemoliz ile artan bilirubinin potansiyel olarak fizyolojik bir antioksidan madde olduğu bilinmektedir (9,10). Çalışmadaki fototerapi öncesi ROM değerleri

322±81 car unit düzeyindeydi. Sağlıklı erişkin için bildirilen normal değerler ise 260-340 car unit arasındaydı. Oysa antioksidan savunma mekanizması yetersiz olan ve oksidatif strese maruz kalan bu bebeklerde ROM değerlerinin yüksek olması beklenirdi. ROM değerlerinin normal sınırlar içinde bulunması bilirubin antioksidan etkisine bağlanabilir.

Fototerapi öncesinde bilirubin değerleri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen ROM değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 2). Stocker ve Peterhans (21) sıvı fazda konjuge bilirubin ve biliverdinin direkt olarak belli bir sınıra kadar lipid radikallerini temizlediğini gösterdiler. Oysa Gopinathan ve ark preterm bebeklerde yaptıkları bir çalışmada (10) bilirubin düzeyi ile plazma toplam antioksidan kapasitesinin korele olduğunu bildirmişlerdir. Bu farklılık bizim bebeklerimizin miadında yenidoğanlar olmasından kaynaklanabilir. Araştırmacılarından Yoshioka ve ark (22) doğum sonrası anne kanında ve bebek kordon kanında antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz ile E vitamini düzeyine bakmışlar ve kordon kanında nisbeten düşük olduğunu göstermişlerdir.

Aplin ve ark 14 bebeğe 48 saat fototerapi vererek yaptıkları çalışmada (23) plazma in vivo reaktif prostaglandin A düzeyinin azaldığını göstermişlerdir.

Prostaglandinlerin sentezi hücre zarında araşidonik asidenden siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolu enzimlerinin katalizörlüğünde yapılmaktadır. Bu sentez sırasında serbest oksijen radikali de açığa çıkar. Fototerapi ile prostaglandin sentezinin azalması serbest radikal üretiminde azalma anlamına gelebilir.

Kontrol grubundan alınan ilk numune ile iki gün sonraki nünuneler arasında total bilirubin ile ROM değerleri arasında anlamlı fark bulunmaması, iki günlük postnatal yaşam süresinin bu parametrelerin düzeyini etkilemediğini göstermektedir.

Bilirubinun fotookside olmasının antioksidan özelliğini etkilemediği bilinmektedir (9). İki günlük yaşam süresinin ROM düzeyini değiştirmediği görülmesine rağmen, fototerapi ile total bilirubinde azalmayla birlikte ROM değerlerinde de azalma olması, bu etkinin fototerapiden kaynaklandığını düşündürmektedir. Fototerapi uygulaması sırasında

serbest radikal kaynağı olan yağ asitlerinin oksidasyonunun azalması, hemoliz ile açığa çıkan serbest hemoglobinin antioksidan etkisi ve bilirubinun fotookside olmasıyla antioksidan özelliğinin etkilenmemesi gibi faktörlerle ve başka tam bilemediğimiz yollarla ROM düzeyinde de azalma olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak hiperbilirubinemili bebeklerde ROM düzeyleri sağlıklı erişkin için bildirilen normal sınırlar arasındadır. ROM değerlerinin bu düzeyde tutulması bilirubin antioksidan etkisine bağlanabilir. Çalışmamızda, fototerapi ile bilirubin değerleri düşerken ROM değerlerinde de azalma olduğu belirlenmiş ve konu üzerinde daha ileri ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Cheesman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 1993; 49:481-93.
2. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In: Armstrong D, editor. Free radicals in diagnostic medicine. New York: Plenum Press; 1994. p.17-27.
3. Saugstad OD. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: Implications for neonatal disease. Acta Paediatr 1996;85:1-4.
4. Öztürk MA, Büyükpatır A, Doğan P, Köse K. Asfiktik yenidoğan bebeklerde ve annelerinde antioksidan aktivite. Çocuk Sağlığı Hastalıkları Derg 1996;39:665-75.
5. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical mediated tissue injury. Br Med Bull 1993;49:700-18.
6. Saugstad OD. Free radicals in neonatal intensive care. In: Tibboel D, Von der Voort E, editors. Intensive care in childhood: A challenge to the future, update in intensive care and emergency medicine. Berlin: Springer; 1996. p.38-52.
7. Sullivan JL, Newton RB. Serum antioxidant activity in neonates. Arch Dis Child 1988;63:748-57.
8. Yiğit Ş, Yurdakök M. Yenidoğanlarda serbest radikallere bağlı hastalıklar. Çocuk Sağlığı Hastalıkları Derg 1996;39:749-65.
9. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science 1987;235:1043-6.
10. Gopinathan V, Miller NJ, Milner AD, Rice-Evans CA. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. FEBS Lett 1994;349:197-200.
11. Hulea SA, Smith TL, Wasowicz E, Kummerow FA. Bilirubin sensitized photooxidation of human plasma low density lipoprotein. Biochim Biophys Acta 1996;1304:197-209.
12. Kliegeman RM. Jaundice and hiperbilirubinemia in the newborn. In: Behrman RF, Kliegeman RM, editors. Nelson textbook of pediatrics. 15th ed. Philadelphia:WB Saunders; 1996. p.493-9.

13. Cin A, Özkaya B, Tansuğ N, Özbek A, Engindeniz E, Bektaşlar D ve ark. Hiperbilirubinemili olguların irdelenmesi. İçinde: VIII. Ulusal Neonatoloji Kongresi; 26-29 Mayıs 1997; İzmir: 1997. p.82.
14. Drew JH, Marriage KJ, Bayle VV, Bajraszewski E, Mc Namara JM. Phototherapy short and long-term complications. Arch Dis Child 1976;57:454-8.
15. Roshchupkin DI, Murina MA. Free-radical and cyclooxygenase-catalyzed lipid peroxidation in membranes of blood cells under UV irradiation. Membr Cell Biol 1998;12:279-86.
16. Whittington PF, Gartner LM. Disorders of bilirubin metabolism. In: Nathan DG, Oski FA, editors. Hematology of infancy and childhood, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders;1992. p.74-114.
17. Odell GB, Brown RS, Kopelman AE. The photodynamic action of bilirubin on erythrocytes. J Pediatr 1972;81:473-83.
18. Ostrea EM, Cepeda EE, Fleury CA, Balun JE. Red cell membrane lipid peroxidation and hemolysis secondary to phototherapy. Acta Pediatr Scand 1985;74:378-81.
19. Cukier JO, Maglalang AC, Odell GB. Increased osmotic fragility of erythrocytes in chronically jaundiced rats after phototherapy. Acta Pediatr Scand 1979;68:903-9.
20. Yang W, Bono D. Myoglobin protects against endothelial cell membrane damage associated with hydrogen peroxide or xanthine/xanthine oxidase. FEBS 1993;319: 145-50.
21. Stocker R, Peterhans E. Synergistic interaction between vitamin E and the bile pigments bilirubin and biliverdin. Bioch Bioph Acta 1989;1002:238-44.
22. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. Amer J Obstet Gynecol 1979;135:372-6.
23. Aplin CE, Brouhard BH, Cunningham RJ, Richardson CJ. Phototherapy and plasma immunoreactive prostoglandin A values. Am J Dis Child 1979;133:625-7.