



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SARILIKLI YENİDOĞANLARDA
BİLİRUBİN VE FOTOTERAPİDEN
KAYNAKLANABİLECEK GENOTOKSİK ETKİLERİN
ALKALİ COMET TEKNİĞİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. ÇİĞDEM KARAKÜKCÜ

KAYSERİ-2008



T. C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SARILIKLI YENİDOĞANLARDA
BİLİRUBİN VE FOTOTERAPİDEN
KAYNAKLANABİLECEK GENOTOKSİK ETKİLERİN
ALKALİ COMET TEKNİĞİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. ÇİĞDEM KARAKÜKCÜ

Danışman
Prof. Dr. K. MUZAFFER ÜSTDAL

KAYSERİ-2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR.....	ii
TABLO LİSTESİ.....	iii
EK TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.BİLİRUBİN	3
2.1.1.Yapısı	3
2.1.2. Metabolizması.....	4
2.1.3. Bilirubin Hücresel Toksisitesi	6
2.1.4. Bilirubin Ölçüm Metodları.....	8
2.2.NEONATAL SARILIK VE FİZYOPATOLOJİSİ	10
2.2.1.Fizyolojik Sarılık	11
2.2.2.Anne Sütü Sarılığı.....	12
2.2.3.Patolojik Sarılık	13
2.3.İNDİREKT HİPERBİLİRUBİNEMİ TEDAVİSİ.....	14
2.3.1.Fototerapi.....	15
2.3.1.1.Etki Mekanizması.....	15
2.3.1.2.Fototerapinin Etkinliğini Belirleyen Faktörler.....	18

2.3.1.3.Fototerapinin Komplikasyonları	20
2.3.1.4.Fotokimyasal Genotoksisite	22
2.4.COMET (TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ) TEKNİĞİ	23
2.4.1. Tarihçe.....	23
2.4.2.Kullanım Alanları	24
2.4.3.Uygulama Protokolü	25
2.4.4.Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler.....	26
2.4.5.Comet Tekniğinin Avantajları.....	27
2.6.KATALAZ.....	27
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1.HASTA VE KONTROL GRUPLARININ TANIM	28
3.2.COMET TEKNİĞİ İÇİN KULLANILAN REAKTİF VE KİMYASAL MADDELER	29
3.3 COMET TEKNİĞİ İÇİN KULLANILAN KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER	30
3.4.COMET TEKNİĞİ İÇİN KULLANILAN REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI	30
3.5.COMET TEKNİĞİ PROTOKOLÜ	32
3.5.1.Lam Kaplama	32
3.5.2.Lenfosit İzolasyonu.....	32
3.5.3. Lamların Jelle Kaplanması	33
3.5.4. Elektrophorez	33
3.5.5. Boyama	34
3.5.6. İmmünfluoresan Mikroskopik İnceleme	34
3.5.7. Görüntü Analiz Programı ile Cometleri Değerlendirme	34

3.5.8. Pozitif ve Negatif Kontrol Çalışmaları.....	35
3.6.BİLİRUBİN ÖLÇÜMÜ	36
3.7.KATALAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ	38
3.8.FOTOTERAPİ ÜNİTESİ.....	39
3.9.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	39
4.BULGULAR.....	40
5.TARTIŞMA.....	50
6.SONUÇLAR.....	58
KAYNAKLAR.....	60
EKLER.....	71
TEZ ONAY SAYFASI	74

TEŞEKKÜR

Çalışmanın her aőamasında gösterdiği hoőgörölü ve yapıcı yaklaőımlarından dolayı,

Sayın **Prof. Dr. K. Muzaffer ÜSTDAL**'a;

Çalışmanın gerçekteőmesine katkılarından dolayı,

Sayın **Prof. Dr. M. Adnan ÖZTÜRK** ve **Yenidoğan Servisi Elemanlarına**,

Desteklerinden dolayı,

Sayın **Doç. Dr. Gülden BAŞKOL**'a;

Laboratuvar çalıőması ve değerlendirmesi sırasındaki katkılarından dolayı,

Sayın **Biyolog Hatice KARACA**'ya ve Sayın **Biyolog Hilal AKALIN**'a,

İstatistiksel değerlendirmede katkılarından dolayı,

Sayın **Ruően EREZ**'e ve eőim **Yrd. Doç. Dr. Musa KARAKÜKCÜ**'ye

içtenlikle teşekkür ederim.

Dr. Çiğdem KARAKÜKCÜ

KISALTMALAR

CO	: Karbon monoksit
dL	: Desilitre
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EU	: Work–group of European Union
G-6-PD	: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
GPx	: Glutatyon peroksidaz
Gy	: Gray
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	: Yüksek basınçlı likid kromatografi
ICH	: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
LMA	: Low melting agarose
LSM	: Laser-scanning microscopy
mg	: Miligram
µL	: Mikrolitre
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Na-K ATP'az	: Sodyum potasyum ATP'az
nm	: Nanometre
NMA	: Normal melting agarose
OD	: Otosomal dominant
OECD	: Organization for Economic Co-operation and Development
OH•	: Hidroksil
OR	: Otosomal resesif
PBS	: Fosfat tamponu
RES	: Retikulo endotelyal sistem
ROS	: Reaktif oksijen metabolitleri
SCGE	: Tek hücre jel elektroforezi
SOD	: Süperoksid dismutaz
UDPGT	: Üridin difosfat glutamil transferaz
UV	: Ultraviyole

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Lenfositlerin farklı dozlarda irradasyon sonrası ölçülen kuyruk DNA %'leri	36
Tablo 2: Prematür ve matür yenidoğanlarda total bilirubin referans intervalleri.....	38
Tablo 3: Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımı	40
Tablo 4: Hasta ve kontrol gruplarının yaş ve doğum ağırlıkları dağılımı	41
Tablo 5: Hasta ve kontrol gruplarının doğum şekli dağılımı.....	41
Tablo 6: Hasta ve kontrol gruplarının hemoglobin değerleri, Apgar skorları ve fototerapi süreleri açısından karşılaştırılması	42
Tablo 7a: Fototerapi öncesi ve sonrası direkt ve indirekt bilirubin değerlerinin karşılaştırılması.....	42
Tablo 7b: Fototerapi öncesi hasta ve kontrol grupları arasında direkt ve indirekt bilirubin değerlerinin karşılaştırılması	43
Tablo 7c: Fototerapi sonrası hasta ve kontrol grupları arasında direkt ve indirekt bilirubin değerlerinin karşılaştırılması	43
Tablo 8a: Fototerapi öncesi ve sonrası comet parametrelerinin karşılaştırılması	44
Tablo 8b: Fototerapi öncesi comet parametrelerinin, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırılması.....	44

Tablo 8c: Fototerapi sonrası comet parametrelerinin, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırılması.....	45
Tablo 9a: Fototerapi öncesi ve sonrası plazma katalaz aktivitelerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 9b: Fototerapi öncesi ve kontrol grupları arasında plazma katalaz aktivitelerinin karşılaştırılması	47
Tablo 9c: Fototerapi sonrası ve kontrol grupları arasında plazma katalaz aktivitelerinin karşılaştırılması	48
Tablo 10: Hiperbilirubinemisi olan bebeklerin fototerapi öncesi ve sonrası bilirubin değerleri ile diğer parametreler arasındaki ilişki.....	49

EK TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Ek Tablo 1: Hasta grubuna ait fototerapi öncesi değerler	71
Ek Tablo 2: Hasta grubuna ait fototerapi sonrası değerler	72
Ek Tablo 3: Kontrol grubuna ait değerler.....	73

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa no
Şekil 1: Bilirubinin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2: Hemden hem oksijenaz ve biliverdin redüktaz aracılığıyla bilirubin oluşumu	4
Şekil 3: <i>UDP-glukuronil transferaz</i> tarafından bilirubinin konjügasyonu.....	6
Şekil 4: Bilirubinin Z-E karbon çift bağı geometrik izomerizasyonu.	17
Şekil 5: Bilirubinin lumirubine dönüştüğü intramoleküler siklizasyonu.....	17
Şekil 6: Yenidoğan sarılığı tedavisinde kullanılan fototerapinin etki mekanizmaları	18
Şekil 7: Alkali comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi.....	24
Şekil 8: Comet kuyruklarının gözle amprik değerlendirilmesi	26
Şekil 9: Görüntü analiz programı ile DNA hasarı miktarının hesaplanması.....	35
Şekil 10: Radyasyon dozu ile kuyruk DNA %'si arasındaki ilişki.....	36
Şekil 11: Gruplara ait serum total bilirubin değerleri ve comet parametreleri skorları	45
Şekil 12: Sarılıklı yenidoğanların comet tekniği ile yürütülmüş lenfosit DNA'larına ait fototerapi öncesi ve sonrası görüntüleri ve comet skorları	46
Şekil 13: Kontrol grubundan iki yenidoğana ait comet tekniği ile yürütülmüş lenfosit DNA'larının görüntüleri ve comet skorları	46
Şekil 14: Fototerapi öncesi, sonrası ve kontrol gruplarına ait plazma katalaz aktivitesi düzeyleri	48

**SARILIKLI YENİDOĞANLARDA
BİLİRUBİN VE FOTOTERAPİDEN KAYNAKLANABİLECEK GENOTOKSİK
ETKİLERİN ALKALİ COMET TEKNİĞİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÖZET

Amaç: Fototerapi alan term, indirekt hiperbilirubinemili yenidoğanlarda oluşabilecek DNA hasarının comet tekniği ile belirlenmesi ve plazma katalaz aktivitesinin bu hasarı önlemedeki rolünün araştırılması.

Gereç ve Yöntemler: Hasta grubuna non-hemolitik indirekt hiperbilirubinemisi bulunan ve fototerapi uygulanan 20 term yenidoğan alındı. DNA zincir kırık miktarları periferik lenfositlerde, alkali comet tekniği ile değerlendirilerek kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA yüzdeleri belirlendi. Bu yenidoğanların fototerapi öncesi ve sonrasında serum bilirubin düzeyleri, comet skorları ve plazma katalaz aktiviteleri ölçülerek, fizyolojik düzeyde sarılığı bulunan 20 sağlıklı term yenidoğandan oluşan kontrol grubunun sonuçları ile karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma veya ortanca (min-max) olarak verildi. İstatistiksel analizde Student's *t*-test, Mann-Whitney U, Wilcoxon Rank ve korelasyon testleri kullanıldı.

Bulgular: DNA hasarı düzeyinin göstergesi olan comet skorları (kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA yüzdeleri) fototerapi öncesi grupta sırasıyla 23.5 ± 16.3 , 9.6 ± 9.6 , 33.0 ± 12.1 ; fototerapi sonrası grupta sırasıyla 3.2 ± 1.8 , 0.6 ± 0.5 , 10.7 ± 3.7 bulundu. Kontrol grubu comet skorları ise sırasıyla 3.0 ± 2.9 , 0.25 (0.03-3.22), 10.9 ± 4.5 idi. Fototerapi öncesi grupta comet skorları, hem fototerapi sonrası, hem de kontrol grubuna göre yüksek olarak değerlendirildi ($p<0.001$). Fototerapi sonrası ve kontrol grupları arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Plazma katalaz aktiviteleri benzer şekilde fototerapi öncesi grupta (150.3 ± 47.5), fototerapi sonrası (64.9 ± 18.5) ve kontrol grubuna (55.0 ± 16.3) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$).

Sonuç: Bu çalışmada comet tekniği ile, orta derecede yüksek serum bilirubin değerlerinin oksidatif DNA hasarı yapıcı etkilerinin olduğu tespit edildi. İndirekt hiperbilirubinemi tedavisinde kullanılan fototerapinin, DNA hasar derecesini artırmadığı, aksine tedaviyle azalan bilirubin değerlerine paralel olarak, fototerapi sonrası comet skorlarının azaldığı gösterildi. Sarılıklı yenidoğanlardaki yüksek plazma katalaz düzeylerinin, fototerapi ile oluşabilecek toksik fotoürünlerin zararlı etkilerinden korumuş olabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: **İndirekt hiperbilirubinemi, fototerapi, comet, DNA hasarı, katalaz.**

**ASSESSMENT OF GENOTOXIC EFFECTS
OF BILIRUBIN AND PHOTOTHERAPY IN JAUNDICED NEWBORNS BY
ALKALINE COMET ASSAY**

ABSTRACT

Aim: To determine the possible DNA damage in term indirect hyperbilirubinemic newborns receiving phototherapy and to investigate the role of plasma catalase activities in preventing this damage.

Materials and methods: Non-hemolytic hyperbilirubinemic jaundiced 20 term neonates receiving phototherapy were included in the study group. DNA strand breaks were assessed by alkaline comet assay in peripheral lymphocytes and tail length, tail moment and % DNA in tail were measured. Serum bilirubin levels, comet scores and plasma catalase activities of these newborns were determined before and after phototherapy and compared with those of 20 healthy term neonates who all had bilirubin levels in physiological ranges. The results were expressed as mean \pm SD and median (min-max). Student's *t*-test, Mann-Whitney U, Wilcoxon Rank and correlation tests were used for statistical analysis.

Results: Comet scores (tail length, tail moment and % DNA in tail) of before phototherapy group were 23.5 ± 16.3 , 9.6 ± 9.6 , 33.0 ± 12.1 respectively and scores of after

phototherapy group were 3.2 ± 1.8 , 0.6 ± 0.5 , 10.7 ± 3.7 respectively. Comet scores in control group were also 3.0 ± 2.9 , 0.25 (0.03-3.22), 10.9 ± 4.5 respectively. Comet scores and plasma catalase activities in hyperbilirubinemic newborns were significantly higher in before phototherapy, according to the after phototherapy and control groups ($p < 0.001$). There was not any statistical difference between after phototherapy and control groups ($p > 0.05$).

Conclusion: In this study it's revealed that moderate bilirubin levels have oxidative DNA damaging effects. Phototherapy does not cause an increase on DNA oxidation or induce genotoxic effects of bilirubin; decreasing bilirubin levels after phototherapy results in a decrease of comet scores. Higher catalase activities in hyperbilirubinemic newborns may be responsible inactivating toxic and the damaging effects of these photoproducts on DNA.

Key words: **Indirect hyperbilirubinemia, phototherapy, comet, DNA damage, catalase.**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yenidoğan sarılığı, term bebeklerin yaklaşık %50-60'ında, pretermilerin %80'inde gözlenmektedir (1). Yenidoğan sarılığı tedavisinde en sık kullanılan yöntem olan fototerapi sayesinde bilirubin, toksik olmayan, suda eriyebilen metabolitlerine çevrilerek idrarla atılmaktadır.

Yaklaşık kırk yıldır kullanımda olmasına ve henüz uzun süreli yan etkileri yeterince açık bilinmemesine rağmen, fototerapinin doğal ve non-invaziv bir tedavi şekli olduğu ileri sürülmüştür (2). Farklı çalışmalarda ise fototerapinin bir fotodinamik stres olduğu ve oksidatif stresi indükleyebileceğine ait bilgiler mevcuttur (2-4).

Ultraviyole (UV) veya görünür ışıkla maruziyeti sonrası meydana gelen toksik etkiler, çeşitli endojen veya ekzojen maddeler tarafından ışığın absorblanması yoluyla meydana gelen flavin ve porfirinler gibi fotoeksitasyon ürünlerinden kaynaklanır. Bu ürünler direkt veya indirekt yollarla DNA hasarı meydana getirirler (5). Prooksidant/antioksidant dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir (6,7). Stabil bir molekül olan DNA da, lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi kimyasal olarak oksidatif hasara uğrayabilmektedir (8).

Ayrıca, yenidoğanlarda yüksek bilirubin düzeylerinin, oksidatif stresle ilişkisine dair de zıt bilgiler mevcuttur. Plazma bilirubininin önemli bir antioksidant olduğunu ve lipid peroksidasyonundan koruduğunu belirten çalışmalar (9-12) olduğu gibi; bebeklerde, plazma bilirubin miktarının düştükçe, antioksidant enzim kapasitesinin arttığını, oksidatif stresin ise azaldığını bildiren çalışmalara rastlanmıştır (13). Yine de, ileri derecede yüksek serum bilirubin düzeylerinin sitotoksik ürünler oluşturabileceği bilinmektedir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında bilirubine bağlı toksik etkiler fototerapi uygulaması ile artmıştır (14,15). Bu sitotoksik fotoürünlerin *in vitro* çalışmalarda peroksitler olduğu ve ortama eklenen bir peroksidazla (katalaz) DNA hasarının azaldığı, farklı genotoksisite çalışmalarında gösterilmiştir (16)

Bu çalışmada, nonhemolitik indirekt hiperbilirubinemili yenidoğanlarda, yüksek bilirubin düzeylerinden ve tedavi amaçlı uygulanan fototerapiden kaynaklanabilecek genotoksik etkilerin, 'comet tekniği' ile belirlenmesi ve plazma katalaz aktivitelerinin araştırılması amaçlandı.

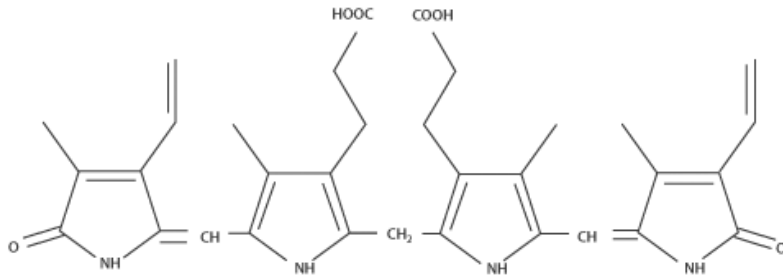
2. GENEL BİLGİLER

2.1. BİLİRUBİN

2.1.1.Yapısı

Bilirubin, hemoglobin katabolizması sonucu oluşan portakal sarısı renkli bir pigmenttir. Bilirubinün büyük bir kısmı eritrositlerin parçalanmasından kaynaklanır. Hemoglobin vücutta yıkıldığında hem ve globin yapı elemanlarına ayrışır. Protein kısmı olan globin, amino asit havuzuna dahil olur. Tetrapireol halkasından oluşan hem molekülü ise önce taşıdığı demiri kaybeder. Karaciğer tarafından dolaşımdan alınır, biyotransformasyona uğrar; ardından safra ve idrarla atılır.

Tetrapireolik bilirubin yapısı **Şekil 1**'de gösterilmektedir.

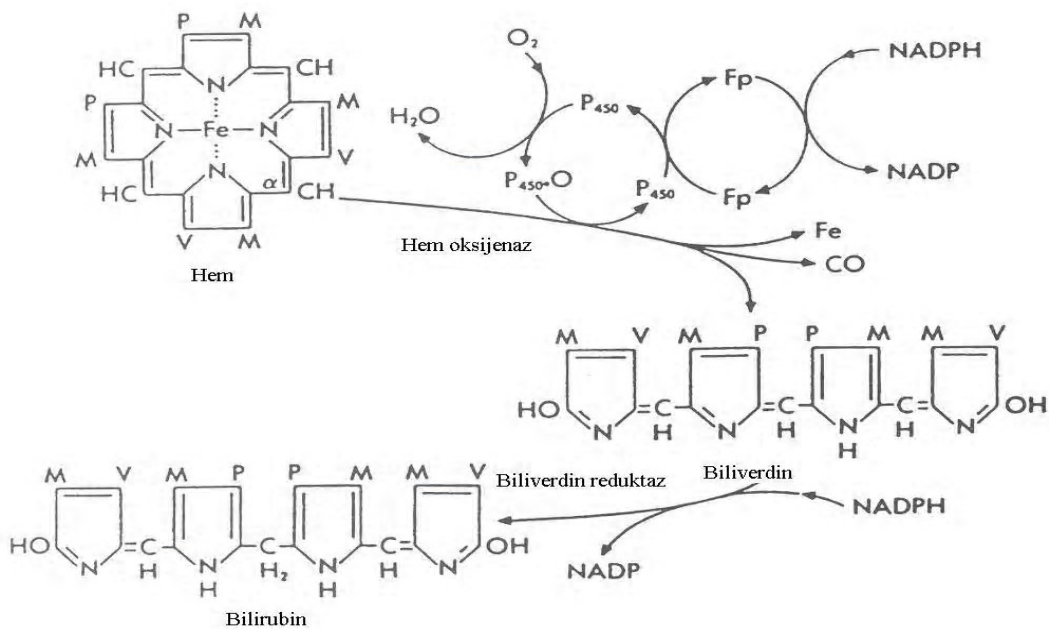


Şekil 1: Bilirubinün kimyasal yapısı

Bilirubin en önemli özelliklerinden birisi, suda çözünürlüğünün olmamasıdır. Ancak bilirubin bu suda çözünmeme özelliği **Şekil 1**'de gösterilen lineer tetrapireolik yapısından kaynaklanmaz. Çünkü yapıdaki iki propiyonik asit yan grubunun, bilirubine yüksek polar özellik, dolayısıyla suda çözünürlük kazandırması beklenir. X-ışını kristalografisi araştırmaları ile kristal bilirubin çok önemli iki özelliği daha olduğu belirlenmiştir: Bunlardan ilki 4.-5. ve 15.-16. karbon atomları arasında yer alan çift bağların yapıya Z-Z konformasyon olarak tanımlanan *trans* özellik kazandırması; ikincisi ise propiyonik asidin karboksil gruplarının, pirol halkası azot grupları ile molekül içi hidrojen bağları oluşturması, dolayısıyla suda çözünürlüklerinin zorlaşmasıdır. Işığa maruz kaldığında bilirubin, *trans* (Z-Z) formdan *cis* (4E-15Z, 4Z-15E) forma dönüşür. Bu da daha çözünebilir bir bilirubin yapısıdır. Pratikte bu özellik temel alınarak sarılıklı yenidoğanlar ışığa maruz bırakılmakta ve bilirubin suda çözünürlük ve atılımı artırılmaktadır (17,18).

2.1.2. Metabolizması

Günlük toplam bilirubin üretimi 250-300 mg kadardır. Oluşan bilirubin yaklaşık %85'i karaciğer, dalak ve kemik iliğinin retikulo endotelial sistem (RES) hücrelerinde parçalanan, ömrünü doldurmuş eritrositlerden salınan hem yapısından kaynaklanır (19). Geri kalan %15'i ise, kemik iliğinde parçalanan eritrositler ile miyoglobin, sitokromlar ve peroksizomlar gibi diğer hem içeren proteinlerin katabolizmasından oluşur (**Şekil 2**) (20,21).



Şekil 2: Hemden hem oksijenaz ve biliverdin reduktaz aracılığıyla bilirubin oluşumu

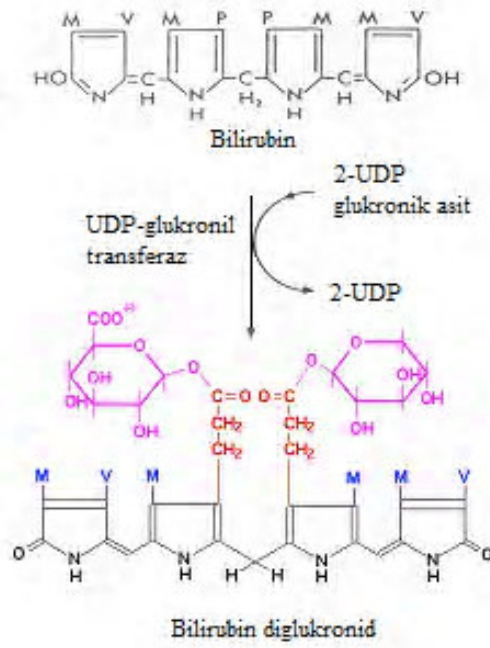
Hem yapısı, hem oksijenaz ve biliverdin redüktaz tarafından bilirubin oluşturmak amacıyla yıkılır. İşlemin ilk basamağında NADPH ve sitokrom c redüktaz rol oynamaktadır. Burada, moleküler oksijen kullanılır. Hem içindeki demir ferröz forma indirgenir; reaksiyon sonucunda biliverdin ve karbon monoksit (CO) üretilir, CO akciğerler yolu ile atılır (**Şekil 2**). CO'in solunum havasında ölçümü sayesinde hem metabolizması ve bilirubin üretimi hakkında bilgi edinilebilir (22). Suda çözünebilir bir bileşik olan biliverdin, biliverdin redüktaz ve NADPH ile bilirubine, bilirubin ise bilirubin redüktaz ile bilirubin IX α 'ya (insanlarda doğal olarak oluşan izomer) dönüştürülür. İnamoleküler hidrojen bağlarından dolayı, bilirubin IX α suda çözünmez.

Taşınması: Bilirubin, hidrofobik yapısından dolayı dolaşımında albümine bağlanarak karaciğere taşınır. Bir molekül insan albümini en az iki molekül bilirubin bağlar ve bu bağlama, bilirubinin plazmada çözünürlüğünü artırır. Albümine bağlı bilirubin genellikle kan beyin bariyerini aşamaz ve toksik değildir.

Hepatik tutulumu: Bilirubin, hepatosit sinüzoidal membranında albüminden ayrılır ve hücre membranından geçer. Hepatositlere giren bilirubin, *ligandinler* ve *proten Y* olarak bilinen çözünebilir proteinlere bağlanır. *Ligandinler* ve *proten Y*, glutatyon-S-transferaz gen ailesinin sitozolde bulunan proteinleridir ve insan karaciğer sitozolündeki total proteinin yaklaşık %5'ini oluştururlar.

Konjugasyon ve atılımı: Bilirubin hepatositler içinde, bilirubin monoglukuronidleri ve diglukuronidleri oluşturmak üzere glukuronik asitle hızla konjuge edilir (**Şekil 3**). Bu ürünler safra ile atılır. Mikrozomal bilirubin-UDP-glukuronil transferaz (UDPGT), bilirubin monoglukuronid sentezini katalizler. Konjuge bilirubinin safraya ekskresyonu kayda değer yükseklikteki konsantrasyon farkından ileri geldiği için, safraya atılımın enerjiye bağımlı aktif transport işlemi olduğu düşünülmektedir. Erişkinlerde bilirubinin yaklaşık %95'i glukuronid konjugatları formunda safraya verilir. Geri kalanını ise glukozidler ve ksilozidler oluşturur (23-26).

Serumdan izole edilen dört bilirubin formu ve bulunma yüzdeleri şöyledir: Konjuge-olmayan bilirubin (α -bilirubin) %27; mono-konjuge bilirubin (β -bilirubin) %24; di-konjuge bilirubin (γ -bilirubin) %13; proteinlere dönüşümsüz olarak bağlı olan bilirubin (δ bilirubin) %37. Atılım hızı farklılıklarından dolayı sarılığın derecesi ile üretilen bilirubin miktarları her zaman korele değildir (17).



Şekil 3. UDP-glukuronil transferaz tarafından bilirubinin konjugasyonu

Safra içinde taşınım ve intestinal transportu: Bilirubin glukuronidler bağırsakta önemli ölçüde geri emilmezler. Daha çok karaciğer, bağırsak epitel hücreleri ve bakteri kaynaklı β -glukuronidazın katalitik etkisiyle hidroliz olurlar. Oluşan konjuge olmayan bilirubin, üçlü renksiz tetrapiröllü grupları (hepsi birlikte ürobilinojenler olarak adlandırılır) oluşturmak üzere anaerobik bağırsak bakterileri tarafından indirgenir. Bu ürünlerden her birinde köprü karbonlar doymuş (metilen) durumdadır. Ürobilinojenler yan vinil zincirlerindeki ve uç iki pirol halkasındaki hidrojenlenme derecesi bakımından birbirlerinden farklıdırlar. Bilirubinden 6, 8 veya 12 hidrojen fazla içeren ürobilinojenler sırasıyla sterkobilinojen, mezobilinojen ve ürobilinojen olarak adlandırılırlar. Oluşan günlük ürobilinojenin %20 kadarı bağırsaktan geri emilir ve enterohepatik dolaşıma girer. Geri emilen ürobilinojenin büyük bir kısmı karaciğer tarafından tutulur ve safraya verilir. Çok az bir kısmı genel dolaşıma geçerek idrarla atılır. İnce bağırsakta ürobilinojen; sterkobilin, mezobilin ve ürobilini oluşturmak üzere kendiliğinden yükseltgenir. Bu ürünler portakal-kahve renklidir ve dışkıının önemli pigmentleridir. Safra ile atılan konjuge bilirubinin %50 kadarı ürobilinojenin dışındaki başka bileşiklere dönüştürülür (20,21).

2.1.3. Bilirubinin Hücresel Toksisitesi

Yüksek konsantrasyonlardaki konjuge olmamış bilirubin, başta sinir hücreleri olmak üzere pekçok hücrede metabolik fonksiyonları bozmaktadır. Ancak bu

etkilerin nedeni ve oluşum mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bilirubinün konjuge olmamış ve bağlanmamış formu, toksik olanıdır; albuminle bağlanma toksisiteyi azaltır.

Kan-beyin bariyeri, normalde albumine geçirgen olmadığı için albumine bağlanmış bulunan bilirubinün beyine geçişi söz konusu değildir. Kan beyin bariyeri ayrıca, konjuge olmuş bilirubin ve bilirubin IX α dışındaki konjuge olmamış bilirubin izomerlerine karşı da geçirgen değildir. Bu nedenle term yenidoğanlar fizyolojik sarılığın zararlı etkilerinden önemli oranda korunmuş olurlar (23).

Kan beyin bariyerinin geçirgenliğini bozan bazı klinik durumlarda bilirubinün beyine geçişi ve dolayısıyla toksisitesi artar (27-29). Kan-beyin bariyerinin hasarı, prematüre bebeklerde termlere göre ve hasta bebeklerde sağlamlara göre daha fazladır. Beyinde meydana gelebilecek hiperosmolarite, konvülsiyonlar, sepsis ve menenjit, hipertansiyon, ağır respiratuar asidoz ile prematürelerdeki intrakranial kanamalar, kan-beyin bariyerinde fonksiyon bozukluğuna yol açabilen olaylardır (28,29).

Bilirubin, albumine 1:1 molar oranda bağlanır. Bunun anlamı, her 1 g albuminin 8.3 mg bilirubin bağlaması demektir. Plazma albumini 3 g olan bir yenidoğanda, 24.9 mg bilirubinün albumine bağlanabileceği anlaşılır. Bilirubin: albumin oranının bir değerinin üzerine çıkması, albuminin bağlanma bölgelerinin başka moleküller tarafından doldurulması veya albumin düzeyinin düşük olması durumlarında, bilirubinün albumine bağlanması bozulur. Bir miktar bilirubin eritrositlere ve dokulara bağlansa bile, bu bağlanmaların klinik bir önemi yoktur (23,24).

Bilirubin hücrelerde, hücre membranı, lipozomlar, sinaptozomlar ve membranöz veziküllerdeki fosfolipidlere bağlanır. Nöronlarda ise önce distal aksonlara bağlanır ve daha sonra retrograd olarak giderek hücre gövdesine ulaşır (30).

Bilirubin, *in vitro* ortamda birçok hücresel fonksiyonu bozar. Bilirubin hem ekstraselüler ortamda bulunur, hem de membrana bağlanır. Membrana bağlanan bilirubin, surfaktan etkisi göstererek yüzey gerilimi ve membran polaritesini azaltır ve membrandaki iyon transport kanallarını etkileyerek iyon değişimine yol açar. Bilirubin, vazopresine bağlı su ve sodyum transportunu inhibe eder. Bu değişiklikler, kernikterus sonrası görülen nöronal şişme ve piknozis ile uyumludur (23).

Hücre içi metabolizmada bilirubinin inhibe ettiği özel bir enzim yoktur. Bilirubin *in vitro* ve *in vivo* olarak proteinlerin fosforilasyonunu ve protein kinazların aktivasyonunu önler. Diğer yandan mitokondrilerin fonksiyonlarını ve DNA sentezini bozar, DNA zincir kırıklarını indükler, Na-K-ATPaz aktivitesini azaltır. Sinaptozomlarda, tirozin alımını ve dopamin sentezini azaltır, diğer bazı hücrelerde ise metiyonin ve timidin alımını azaltarak mitokondri ve hücre canlılığını bozar (23,31).

Bilirubin, nöronlar arasındaki iletiyi de etkiler. Bilirubin toksisitesinin erken dönemlerinde membran potansiyellerinin azalması, hücreler arası iletiyi azaltır. Bu azalma, bilirubinin deterjan etkisine bağlanmıştır. Beyin sapındaki işitsel uyarılmış potansiyellerin azalması ve uzun dönemde görülebilen işitme kayıplarının ortaya çıkması, bilirubine bağlı bu etkilerin geçici veya kalıcı olmasıyla açıklanmaktadır. Sinaptozomlarda tirozin alımının, dolayısıyla dopamin sentezinin azalması da bilirubin konsantrasyonu ile orantılı olarak sinir iletisini azaltır (31). Değişik beyin bölgelerinin fonksiyonel durumları farklı olduğu gibi, nöronların bilirubine karşı duyarlılıkları da gestasyonel yaşı ve postnatal yaşa bağlı olarak farklılıklar gösterir (32).

Bilirubine bağlı nörotoksisite sonucunda ortaya çıkan kalıcı nörolojik hasarla karakterize tabloya kernikterus adı verilir. Bu terim, patolojik bir bulgu olarak bazal ganglionların sarıya boyanmış olmasını ifade etmek için ortaya atılmış olsa da, bu olayların sonucunda görülen klinik bulguları anlatmak için de kullanılır.

2.1.4. Bilirubin Ölçüm Metodları

Bilirubin ve ilgili bileşikler çeşitli kromatografik, kapiller elektroforetik ve fotometrik yöntemlerle ölçülürler. Bu metodlardan başlıcaları; diazo reaktifi, diklorobenzendiazonyum (DPD), bilirubin oksidaz ve direk spektrofotometrik ölçüm yöntemleridir.

HPLC (high pressure liquid chromatography) metodu referans metoddur (33, 34). Bilirubin ölçümünün en yaygın kullanılan kimyasal yöntemleri ise diazo reaksiyonuna dayalı olanlardır.

Diazo reaktifi metodları

Bilirubin ölçümünde en sık tercih edilen metoddur. İlk olarak 1883'te Erlich tarafından tanımlanan bu reaksiyonda diazolanmış sulfanilik asit (diazo reaktifi), bilirubinle iki azopireol oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu azopireol nötral pH'da

kırmızı-mor; yüksek veya düşük pH'larda mavi renklidir (Van der Berg reaksiyonu). Sonraki çalışmalarda, ankonjüge bilirubin diazolama reaksiyonunu alkolün hızlandırdığı gösterilmiştir. Alkolün yokluğunda diazo reaktifi ile reaksiyon veren bilirubin fraksiyonu *direkt bilirubin* olarak tanımlanmıştır. Reaksiyon ortamına alkol eklenerek yapılan bilirubin ölçümü total bilirubini gösterir ve total bilirubin ile direkt bilirubin arasındaki fark da *indirekt bilirubin* olarak adlandırılır. Daha sonraki değişikliklerde ankonjüge (indirekt) bilirubin diazo reaktifi ile reaksiyonunu hızlandıran çeşitli hızlandırıcılardan biri kullanılmıştır (17).

Pratikte, direkt reaksiyona giren bilirubin konjüge bilirubin ve indirekt bilirubin de ankonjüge bilirubin olarak tanımlanır. Total bilirubin ise bu ikisinin toplamıdır. Malloy ve Evelyn tarafından geliştirilen diazo yöntemi (bu yöntemde hızlandırıcı olarak metanol kullanılır) hemoglobinden ve ortama eklenen metanol nedeniyle proteinlerin oluşturduğu bulanıklıktan etkilenir ve reaksiyon süresi göreceli olarak daha uzundur (35).

Jendrassik ve Grof'un 1938'te tanımladığı ve daha sonra Doumas ve arkadaşları tarafından modifiye edilen diazo yöntemi (36), referans bir HPLC yönteminin verdiği serum bilirubin sonuçları kadar güvenilir sonuçlar verir. Bu yöntemde serum veya plazmadaki total bilirubin, reaksiyon ortamına önce kafein (hızlandırıcı) ve daha sonra diazolanmış sulfanilik asit eklenerek ölçülür. İnkübasyon sırasında hem konjüge hem de ankonjüge bilirubin azobilirubin oluşturmak üzere diazo reaktifi ile reaksiyona girer. Diazo reaktifinin eklenmesinden 10 dk sonra askorbik asit, alkali tartarat ve seyreltik hidroklorik asit çözeltileri reaksiyon karşısına eklenir. Oluşan mavi-yeşil azobilirubin çözeltilisinin absorbansı 600 nm'de ölçülür. Konjüge bilirubini ölçmek için serum veya plazma seyreltik HCl ile seyreltilir ve daha sonra azobilirubin oluşturmak üzere diazolu sulfanilik asitle karıştırılır. Kafein-benzoat hızlandırıcısının yokluğunda sadece konjüge bilirubin reaksiyona girer. Reaksiyon bir askorbik asit çözeltilisi eklenerek durdurulur; sonra reaksiyon ortamına sırası ile alkali tartarat çözeltilisi ve kafein reaktifi eklenir. Kafein çözeltilisi azobilirubinin absorpsiyon pikini 585 nm'den 600 nm'ye kaydırır ve ölçüm 600 nm dalga boyunda yapılır. Tartarat reaktifi alkali pH oluşturarak mavi renkli azobilirubin meydana getirir (18).

Konjüge bilirubin yönteminde numune serum veya plazmadır. Lipemiyi önlemek için sabah açlık kanı tercih edilir. Diazo yöntemlerinde yalancı düşük sonuçlara neden olduğu için hemolizden kaçınılmalıdır. Konjüge ve ankonjüge

bilirubin her ikisi de, beyaz veya ultraviyole ışığa maruz kaldıklarında yükseltgendiklerinden, numuneler güneş ışığı ve diğer ışıklardan korunmalıdır. Işığa duyarlılık sıcaklığa bağlıdır. Optimal kararlılık sağlamak için numuneler düşük sıcaklıklarda ve karanlıkta saklanmalıdır. Buzdolabında saklandığında numuneler üç gün dayanıklıdır. Karanlıkta -70°C 'de saklanan örnekler 3 ay kadar dayanabilir (17, 18).

DPD metodu

Bilirubin, 0.1 mol/L HCl içinde hazırlanmış 2,5-diklorobenzendiazonyum ile reaksiyonu sonucu oluşan kompleks 540-560 nm'de absorbans verir. Absorbans bilirubin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bir deterjan (örn. Triton X-100) varlığında unkojuge bilirubin de reaksiyona girmesi ile ölçülen bilirubin, total bilirubindir. Deterjan yokluğunda sadece konjuge bilirubin reaksiyona girer.

Bilirubin direkt spektrofotometrik ölçümü

Bilirubin bebeklerde direkt olarak spektrofotometre ile ölçülebilir. Serum bilirubini, 454 nm'de yüksek absorbans verir ve bu absorbans bilirubin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Numunede oksihemoglobin varsa 454 nm'deki absorbanstan 540 nm'deki absorbans çıkarılarak düzeltme yapılır. Yenidoğan serumunda 454 nm'de absorbans artışına yol açan karoten ve diğer pigmentler bulunmaz. Diğer taraftan bu pigmentler daha büyük çocukların ve erişkinlerin serumlarında bulunabileceğinden bu yöntem, sadece yenidoğan numunelerine sınırlı kalmaktadır (18).

Karbon monoksit üretiminin ölçümü

Aşırı bilirubin üretiminde erken tanı önemlidir. Hemoliz bilirubin üretimini artırır. Hem yıkımı sonucu oluşan bilirubin ve CO belirli ekimolar miktarlarda olduğundan, ekspiryum havasındaki CO miktarının ölçümü bilirubin üretiminin göstergesi olarak kullanılabilir. Hemolitik hastalığı olan infantlarda end-tidal CO ölçümü tanıya yardımcı olur (22).

2.2. NEONATAL SARILIK VE FİZYOPATOLOJİSİ

Serum bilirubin düzeyinin 5 mg/dL'nin ($86 \mu\text{mol/L}$) üzerinde olması şeklinde tanımlanan neonatal sarılık, term bebeklerin yaklaşık %60'ında yaşamlarının ilk haftasında gözlenmektedir (37,38). Yenidoğan döneminde sarılık başlıca üç grupta incelenebilir: Fizyolojik sarılık, anne sütü sarılığı, patolojik sarılık.

2.2.1. Fizyolojik Sarılık

Fizyolojik sarılık, yenidoğan karaciğerinin bilirubini tutma, transport etme ve konjugasyonundaki olgunlaşma eksikliğinden kaynaklanır. Bu durum yaşamın ilk haftasında serum indirekt bilirubin düzeylerinde artışa yol açar. Ortaya çıkan bu geçici hiperbilirubinemi fizyolojik sarılık olarak adlandırılır (39-41).

İntrauterin yaşamda indirek bilirubin plasenta tarafından temizlendiğinden, kord kanındaki bilirubin düzeyi sadece 2 mg/dL (35 µmol/L) veya daha azdır. Doğumdan sonra bilirubin yavaş yavaş yükselmeye başlar ve en yüksek düzeye 60-72. saatlerde ulaşır. Maksimum bilirubin düzeyi 12 mg/dL yi geçmez. Genellikle yaşamın 3. gününde 12 mg/dL'den (210 µmol/L) az bilirubin varlığı fizyolojik sarılık kabul edilmelidir (42). Bilirubin düzeyi daha sonraki 2-3 gün içinde giderek azalır, izleyen günlerde yavaş yavaş düşmeye devam ederek 1-2 haftada erişkin düzeye iner (36,37). Prematürelde ise bilirubin 5-6. günlerde pik yapar ve term bebeklere kıyasla bu değer daha yüksektir; 2-4 hafta kadar sürebilir. Prematüreldeki pikin daha geç olması, glukuronil transferaz aktivitesinin daha yavaş artmasından dolayıdır (38-42).

Ancak son çalışmalar bu değerlerin normal total bilirubin değerlerini yansıtmadığını göstermektedir. Artık klinikte daha fazla sarılıklı bebekle karşılaşmakta ve normal populasyondaki total serum bilirubin değerleri eskisine göre belirgin şekilde daha yüksek saptanmaktadır. Bhutani ve arkadaşları 2840 bebeğin total serum bilirubin düzeyini değerlendirmiş ve 95. persantil değerini 17,5 mg/dl olarak bulmuşlardır (43). Bu bebeklerin %41'i siyah, %43'ü beyaz ve Asyalı olup, %59'u anne sütü alıyordu.

Bu bilgiler ışığında değişik populasyonlarda total serum bilirubin için normalin üst sınırı 17-18 mg/dl olarak kabul edilebilir. 15-16 mg/dl'lik değerler bebeğin ileri tetkikini gerektirmez, bu olgularda izlemin yeterli olabileceği düşünülmektedir (43).

Sonuç olarak Amerikan Pediatri Akademisi, tedavinin zarardan çok yarar getireceğinin düşünüldüğü yüksek bilirubin düzeylerine müdahaleyi önermekte, bu değerlendirmeyi yaparken bebeğin yaşı ve klinik durumunu da göz önüne almaktadır (44).

Normal şartlarda indirek bilirubinin %99.9'u plazmada albümine bağlıdır. Serbest bilirubin çok az miktarlarda bulunur (45). Serum bilirubin düzeyi;

karaciğerdeki bilirubin yükü, hepatik ekskresyon hızı ve bilirubin bağlama kapasitesinin göstergesidir.

Yenidoğanda UDPGT aktivitesinin azlığı ve ligandin düzeylerinin düşüklüğü, konjügasyon yetersizliğine neden olur. Bunların dışında, yenidoğanlardaki bilirubin yapım hızı da artmıştır. Sağlıklı bir yenidoğanda bilirubin yapım hızı 8-10 mg/kg/gün kadardır ki bu değer, erişkindekenden 2 kat fazladır (46). Eritrosit kütesinin fazla oluşu, enterohepatik dolaşımın artmış olması, mekonyum içindeki bilirubin miktarının önemli düzeylere ulaşması ve bağırsak bakterilerinin yokluğu da hiperbilirubinemiye zemin hazırlar.

Yenidoğanda bilirubin düzeyini arttıran risk faktörleri (42)

1-Bilirubin yükünde artış: Eritrosit hacminin fazla oluşu, eritrosit yaşam süresinin kısa oluşu, erken bilirubin artışı, enterohepatik dolaşımın artışı

2-Bilirubin karaciğere alınmasında defekt: Ligandin (Y proteini) azlığı, Y ve Z proteinlerinin diğer anyonlarla bağlanması, karaciğere alınmasında defekt

3-Bilirubin yetersiz konjügasyonu: UDP glukuronil transferaz aktivitelerinde azalma, UDP glukoz dehidrogenaz aktivitesinde azalma.

4-Bilirubin atılımında defekt

5-Karaciğer dolaşımı: Göbek kordonunun kesilmesiyle karaciğere gelen oksijen miktarında azalma, duktus venosus açıksa portal akımın karaciğere uğramadan geçmesi

2.2.2. Anne Sütü Sarılığı

Anne sütüne bağlı sarılık uzun yıllardan beri bilinmektedir. Anne sütüyle beslenen bebeklerde mamayla beslenenlere göre sarılık 3-6 kat daha sık gözlenmektedir. Bu tip sarılık, herhangi başka bir sarılık etyolojisi bulunmayan, anne sütüyle beslenen bebeklerde fototerapinin en sık uygulandığı sarılık tipi gibi görünmektedir (47). Anne sütü sarılığı erken ve geç olmak üzere iki dönem halinde incelenirse de, ikisi arasında net bir ayırım yapmak güçtür.

Erken anne sütü sarılığı ilk birkaç gün içinde görülür ve anne sütünün özelliklerinden ziyade emzirmedeki teknik yanlışlıklara bağlıdır. Beslenme hacim ve sıklığında azalma sonucu bebek dehidratasyona girer ve mekonyum pasajı da gecikir (48). Normal ağırlıkta bir bebeğin mekonyumunda toplam 100-200 mg bilirubin

bulunabileceği tahmin edilmektedir. Artmış enterohepatik dolaşım, hiperbilirubinemiye neden olur (48,49).

Geç anne sütü sarılığı ise üçüncü günden itibaren yavaş yavaş artan hiperbilirubinemi ile karakterizedir ve anne sütü içindeki bazı maddeler ile ilişkilidir. Bilirubin yüksekliği ikinci haftaya kadar devam eder ve daha sonra yavaş yavaş azalarak birkaç ay içinde normale döner. Bilirubin düzeyleri 12-20 mg/dL'ye kadar yükselebilir ancak patolojik değildir (50). Bebeklerde hemoliz bulgusuna veya herhangi bir hastalık belirtisine rastlanmaz. Tartı alımı ve bağırsak fonksiyonları normaldir. Tanı ancak diğer patolojik nedenleri ekarte ederek konur.

Geç anne sütü sarılığı etyolojisinde, anne sütü içinde bulunabilen pregnan-3alfa-20betadiol, β -glukuronidazlar, non-esterifiye yağ asitleri sorumlu tutulmuştur. Bu maddeler, *in vitro* olarak UDPGT'i inhibe eder (24,51-53). Bağırsak florası gelişiminin, anne sütü alanlarda ve mama ile beslenenlerde farklı olması ve böylece bilirubinün ürobilinojene dönüşmesindeki farklılıklar da, enterohepatik dolaşımı etkileyerek anne sütü sarılığı gelişmesine katkıda bulunabilir.

Tanı konduktan sonra anne sütü 24-72 saat kesilir ve bebek mama ile beslenirse sarılık hızlı bir şekilde azalır. Anne sütü tekrar verilmeye başlansa bile sarılık artmaz veya 1-3 mg/dL gibi çok küçük miktarlarda artar. Ancak bu yöntem, tüm anne sütü sarılıklarında uygulanması gereken rutin bir yöntem olarak değerlendirilmemeli, bilirubin düzeyleri kernikterus açısından tehlikeli sınıra yaklaşan bebeklerde uygulanmalıdır. Anne sütünün kesilmesi ile sarılıkta düzelme olmuyorsa başka bir patoloji düşünmek gerekir.

2.2.3. Patolojik Sarılık

Fizyolojik ve anne sütü sarılığı dışındaki sarılık nedenleri, patolojik sarılık kabul edilir. Maisels'in 1981 yılında ilk tariflendiği şekliyle patolojik sarılık tanımında; sarılığın ilk 24 saatte ortaya çıkması, bilirubin artış hızının günde 5 mg/dL'yi geçmesi, serum direkt bilirubin düzeyinin 1,5-2 mg/dL'nin üstünde olması ve sarılığın term bebeklerde bir, preterm bebeklerde ise iki haftadan daha uzun sürmesi kuralları yer almaktaydı (54). Ancak daha sonra bu tanımlara uyan tüm durumların patolojik sarılık olmayabileceği görüldü. Anne sütü sarılığı nedeniyle term bebeklerde indirekt bilirubin düzeyinin ve sarılık süresinin bu sınırları aşması, bunun en güzel örneği olmuş ve daha sonraki yıllarda anne sütü ile beslenenlerde patolojik serum bilirubin düzeyi 15 mg/dl'ye yükseltilmiştir. Ancak anne sütü ile

beslenen pek çok sağlıklı bebekte bu sınır da aşıldığından günümüzde term bebeklerde serum bilirubin konsantrasyonlarının 17 mg/dl'den daha yüksek olduğu durumlarda fizyolojik olmadığı düşünülmesi ve sarılık süresinin iki haftadan daha uzun sürdüğü durumlarda uzamış olarak kabul edilmesi giderek kabul görmüştür (55).

Yenidoğan bebeklerdeki patolojik sarılıkların büyük çoğunluğundan bilirubin metabolizma basamaklarında normal fizyolojinin dışında gelişen patolojik süreçler (artmış bilirubin üretimi, hepatik alım eksikliği, yetersiz bilirubin konjugasyonu ve artmış bilirubin enterohepatik dolaşımı) sorumludur.

Eritrosit yıkımına bağlı hiperbilirubinemi nedenleri (42)

- 1. İzimmünizasyon:** Rh uyumsuzluğu, ABO uyumsuzluğu
- 2. Eritrosit içi biyokimyasal defektler:** G6PD eksikliği, piruvat kinaz eksikliği, heksokinaz eksikliği, konjenital eritropoetik porfiri
- 3. Eritrosit yapı bozuklukları:** Herediter sferostoz, herediter eliptositoz
- 4. Enfeksiyon:** Bakteriyal, viral, protozoal
- 5. Sekestrasyon:** Subdural hematoma veya sefal hematoma, ekimozlar, hemanjiomlar
- 6. Diğer:** Akciğer, beyin, karın içi kanamalar, dissemine intravasküler koagülasyon, alfa talasemi

2.3. İNDİREKT HİPERBİLİRUBİNEMİ TEDAVİSİ

Bilirubin toksisitesinin geçici ve kalıcı etkilerini ortadan kaldırılması için hiperbilirubineminin zamanında tedavisi büyük önem taşır. Ancak hangi bilirubin düzeylerinde hangi tedavilerin uygulanması gerektiği konusu, son yıllarda büyük tartışmalara neden olmuştur. Klasik olarak, kernikterus bulguları hemoliz varlığında 20 mg/dL üzerindeki düzeylerde ortaya çıkar (56-57). Bu infantlarda kan değişimini de içeren agresif tedaviler uygulanmıştır. Fakat son zamanlarda hemolizi bulunmayan sağlıklı term bebeklerin çok daha yüksek bilirubin düzeylerini tolere edebilecekleri bulunmuş ve primer tedavi fototerapiye odaklanmıştır (58).

Hiperbilirubinemi tedavisinde kullanılan üç yöntem vardır: Fototerapi, kan değişimi ve farmakolojik ajanlar.

2.3.1.Fototerapi

İlk kez 1956 yılında İngiltere’de Rochford General Hospital’da, Prematüre Servisi’nin sorumlu hemşiresi Miss J.Ward fototerapinin etkinliğini keşfetmiştir. Miss Ward’ın en önemli özelliği baktığı premature bebekleri küvözden çıkararak hastanenin bahçesinde temiz hava ve bol güneş almalarını sağlamaktır. Bir ziyaret sırasında servisin doktoru, Dr Dobbs karnı tamamen açılarak güneş görmüş bir bebeğin sırtında, etrafındaki deriye göre daha sarı renkte sınırları keskin üçgen şeklindeki bir alanı görerek sebebini sorar. Miss Ward ise bu bebeğin önceden sarılığının olduğunu, şimdi derisinin beyazlaştığını, ancak örtü altında kalan yerin sarı renkte kalmış olabileceğini söyler (59).

Daha sonra tesadüfen cam önünde unutulmuş bir tüp kanda, bilirubin düzeyinin 10 mg/dL daha düşük olduğu görülür. 1958 yılında Cremer ve ark. (60) bu konuyu test etmek için prematür infantları hem güneş ışığı, hem floresan ışık altında bıraktıklarında, bilirubin düzeyinin her iki durumda da önemli derecede azaldığını görünce, ışığın bilirubin üzerine etkisi olabileceğini düşünerek, hiperbilirubinemi tedavisinde ilk olarak fototerapi kullandılar. O günden bu yana fototerapinin etki mekanizması ve uygulama teknikleri hakkında çok şey öğrenildi ve standart bir fototerapi yöntemi oluşturulmaya çalışıldı.

2.3.1.1. Etki Mekanizması

Fototerapi yenidoğanda indirekt hiperbilirubineminin tedavisinde en sık kullanılan yöntemdir. Hemen hemen tüm yenidoğanlarda serum bilirubin konsantrasyonunun yükselmesini durdurur veya azaltır. Bunu hemoliz varlığından, matüriteden veya derinin pigmentasyon derecesinden bağımsız olarak yapar (55). Daha önemlisi fototerapi kan değişimi gibi invazif bir tedavi yöntemine olan ihtiyacı da azaltmaktadır (61).

Vücuttaki herhangi bir fotoreseptör molekül, ışığın bir kuantumunu ya da fotonunu absorbe ettiği zaman daha yüksek bir enerji düzeyine itilir. Buna uyarılmış molekül denir. Uyarılmış molekülden birkaç yolla bazı foto ürünler oluşur ve kendileri daha ileri bir takım reaksiyonlara girerler. Bu mantığa dayanarak uygulanan fototerapi, bilirubin atılımını artırır ve ek olarak bilirubini hızlı bir biçimde daha az toksik olan bileşiklere dönüştürür (62).

Fototerapide esas meydana gelen olay, bilirubinin bir foton absorbe etmesidir. En fazla absorbe edilen fotonlar 450 nm dalga boyundaki mavi fotonlardır.

Daha sonra, 510 nm dalga boyundaki yeşil fotonlar gelir. Kırmızı fotonlar hiç absorbe edilmez. Absorbe edilen foton ile bilirubin uyarılmış hale gelir ancak, bu durumda fazla kalmaz ve tekrar eski haline dönebilmek için enerji kaybeder. Bu enerji kaybı üç şekilde olabilir:

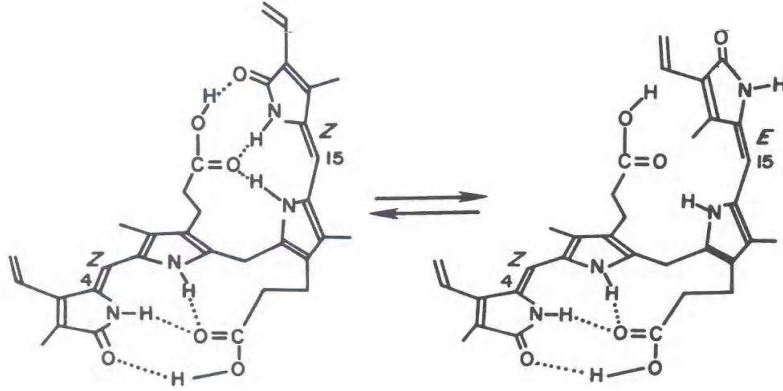
- Foton emisyonu (fluoresans): Çok nadir olur.
- Isı üretimi: En sık olan olaydır.
- Fotokimyasal reaksiyon.

İlk iki olay sonucunda bilirubin molekülünde herhangi bir değişiklik olmazken, fotokimyasal reaksiyonlar sonucu bilirubin molekülü değişir. Bu değişiklik de üç şekilde meydana gelebilir:

- Geometrik (konfigrasyonel) izomerizasyon,
- Yapısal izomerizasyon,
- Foto oksidasyon.

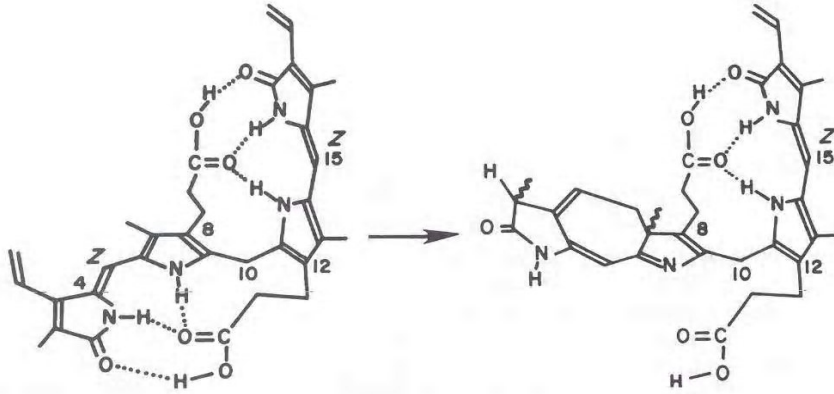
Geometrik izomerizasyon sırasında, dış pirol halkalarını ortadaki halkalara bağlayan çift bağlardan biri çözülür, dıştaki halka 180° döner ve yeniden çift bağ oluşur (**Şekil 4**). Bu şekilde oluşan izomere E izomeri denir. İzomerize olabilecek 2 çift bağ bulunduğu ve her biri de Z ve E konumunda olabileceği için 4 değişik izomer oluşabilir: 4Z 15Z tabii bulunan esas formdur. Diğerleri 4Z 15E, 4E 15Z ve 4E 15E olarak adlandırılır. Bu izomerler fotokimyasal olarak geri dönüşümlüdür ve birbirlerine dönüşebilirler (63). İzomerlerin hemen hemen hepsi deri, derialtı dokusu ve kapillerler içinde oluşurlar (64). E konumundaki çift bağ taşıyan izomerlerin suda çözünürlükleri fazladır. Bilirubin, albumine bağlı olduğu dahi bile izomerizasyon devam eder. Suda erir hale gelen bu izomerler plazma ile karaciğere, oradan safraya taşınır. Safra asitleri ile tekrar eski formuna dönerler ve bağırsaklara ZZ şeklinde atılırlar. Serumdaki 4Z 15E izomerin miktarı, kullanılan ışığın rengi ile ilişkili olup, yoğunluğuyla ilişkili değildir. Diğer bir deyişle ışığın rengini değiştirmeden, yoğunluğunu arttırarak dangedeki serum 4Z 15E izomer miktarı değiştirilemez. Bilirubin eliminasyonu %80 geometrik izomerizasyon yolu ile olur (55,63).

Bilirubin ve insan albümini kapsayan bir solüsyonda 4Z, 15E izomerinin yanı sıra Z-Z izomerinin de oluştuğu görülmüştür. Bu iki izomer birbirine ışığın etkisi ile dönüşebilmektedir. Fototerapi kesildiği zaman 4Z, 15E izomeri dolaşımda saatlerce kalmaktadır. Çünkü atılım hızı yavaştır. 4Z, 15E izomerinin doğal yolla ve fototerapi ile oluşan olmak üzere iki türlü olduğu düşünülmektedir. Fototerapi ile oluşan 4Z, 15E izomeri diğerine göre daha az lipofilik ve daha az toksiktir.



Şekil 4. Bilirubinün Z-E karbon çift bağı geometrik izomerizasyonu.

Yapısal izomerizasyonda pirol halkası üzerindeki $\text{CH}=\text{CH}_2$ (vinil) grubu, komşu diğer pirol halkası ile birleşerek 7 karbonlu yeni bir halka oluşturur. Bu yapıya lumirubin, siklobilirubin veya fotobilirubin 2 denir (Şekil 5).



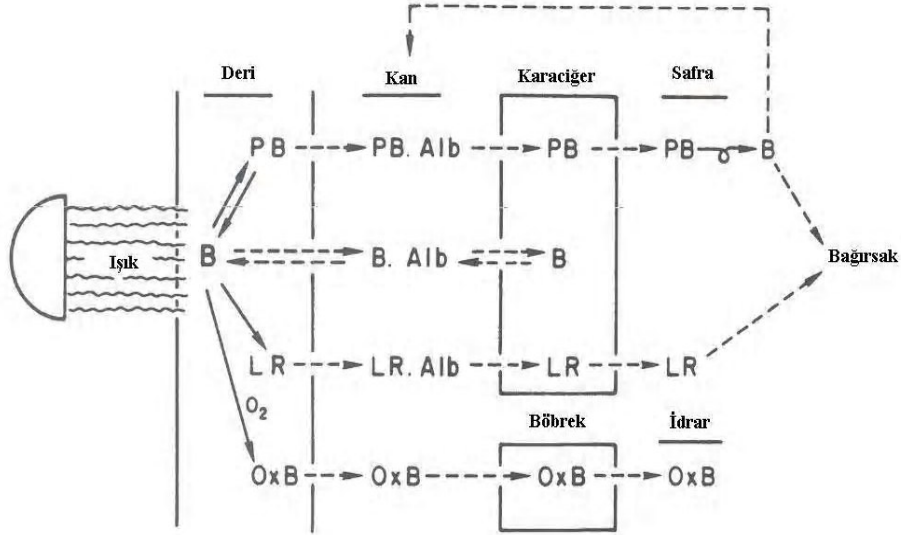
Şekil 5. Bilirubinün lumirubine dönüştüğü intramoleküler siklizasyonu (yapısal izomerizasyon).

Daha polar olan bu izomerin de suda çözünürlüğü fazladır. Lumirubinün önemli bir özelliği geri dönüşümsüz olması, yani esas bilirubine geri dönmemesidir. Bu özelliği nedeni ile fototerapinin yoğunluğu arttıkça oluşan lumirubin miktarı da artar. Dolayısıyla uzun süreli fototerapi sırasında bilirubinün esas atılma yolu lumirubin olur. Lumirubin oluşumu, bilirubin eliminasyonunda hız kısıtlayıcı basamaktır (55,63).

Fotooksidasyon, *in vitro* ortamda oldukça etkili olmasına rağmen sarılıklı bir yenidoğanda etkisi oldukça sınırlıdır. Tek bir oksijen atomunu içeren bir reaksiyon sonucunda biliverdin, dipirol ve monopirol gibi renksiz ürünler açığa çıkar. Bu ürünler oldukça az olup, idrarla atılabilecek kadar polardır (62).

2.3.1.2. Fototerapinin Etkinliğini Belirleyen Faktörler

Fototerapinin etki mekanizmaları Şekil 6’da özetlenmiştir (55). Neonatal hiperbilirubineminin tedavisinde en çok kullanılan yöntem olan fototerapinin etkinliğini belirleyen değişkenler ve yan etkileri iyi bilinmeli ve bu cihazların doğru kullanıldığından emin olunmalıdır.



B = Bilirubin (Z,Z İzomer) PB = Fotobilirubin (E,E ve E,Z İzomerler) LR = Lumirubin (E ve Z İzomerler) OxB = Bilirubin oksidasyon ürünleri Alb = Albumin

Şekil 7. Yenidoğan sarılığında fototerapinin etki mekanizmaları.

Şekil 6. Yenidoğan sarılığı tedavisinde kullanılan fototerapinin etki mekanizmaları

Işık dalga boyu: Bilirubin 400-520 nm dalga boyları arasındaki mavi ışığı maksimum düzeyde absorblar (5). Albumine bağlı bilirubin 460 nm’de pik absorpsiyon yaparken, bağlı olmayan bilirubin 440 nm’de pik absorpsiyon yapar (55). Gün ışığı 550-600 nm dalga boyları arasında olduğundan, etkisi daha azdır. Mavi ışık kaynağı olarak, 420-480 nm arasında ışık yayan, özel mavi lambalar kullanılır. F20T12/BB olarak adlandırılan bu lambalar, F20T12/B olarak tanınan normal mavi lambalardan daha etkilidir. Mavi ışık altındaki yenidoğanların cilt rengini değerlendirmenin zor olabileceği ve bazen mavi ışığın sağlık personeline baş dönmesi ve bulantı gibi yan etkilere yol açabileceği göz önüne alınarak, fototerapi ünitelerine beyaz ışık da eklenmiştir. Böylece bir fototerapi ünitesi 2 mavi, 2 beyaz veya 4 mavi, 4 beyaz lambadan oluşmuş olur. Yapılan çalışmalarda 525nm dalga boyuna sahip yeşil ışığın da, en az mavi ışık kadar etkili olduğu, hatta beyaz ışıktan daha fazla etkili olduğu gösterilmiştir (63). Ebbesen ve ark. (65) yaptıkları bir çalışmada pretermelerde turkuaz renkli floresan lambaların bilirubin miktarını

düşürmede mavi renkteki fluoressan lambalara göre daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

Fototerapinin enerji yoğunluğu veya irradyasyon miktarı (m/cm²/nm):

Etkili fototerapi için enerji yoğunluğu, bilirubin yıkımı için minimal etkili düzeyin üzerinde olmalı. Aynı zamanda potansiyel yan etkiler oluşturabilecek düzeye de ulaşmamalıdır. Sekiz beyaz ışık lambası içeren optimal durumdaki fototerapi ünitesi klinik olarak anlamlı fakat fototerapi için minimal etkili düzeyi sağlarlar (5 mW/cm²/nm). Şu anki bilgilere göre bilirubin yıkımındaki saturasyon noktası, standart fototerapi ünitelerinde bulunan 4 beyaz ve 4 mavi lamba ile sağlanır (11 mW/cm²/nm). Optimal tedavi için lamba enerji çıkışını ölçen fotometreler kullanılmalıdır. %20'den fazla enerji kaybı olan lambalar değiştirilmelidir (60). Fototerapi lambalarının yenidoğana uzaklığı 30-40 cm olmalıdır. Tüm lambalar emniyet açısından mutlaka pleksiglas bir koruyucu içine alınmalıdır. Halojen fototerapi lambalarının ısı yanıklarına yol açma riski daha fazla olduğu için hastaya olan uzaklığına dikkat etmek gerekir (63). Son 10 yılda optimal fototerapi için önemi en fazla vurgulanan faktörler, ışığın dalga boyu ve irradyasyon miktarıdır (66).

Yenidoğanın yüzey alanı ve başlangıç bilirubin düzeyi: Başlangıç bilirubin düzeyi fototerapi etkinliğini negatif yönde etkiler (5,67). Tedavinin tam olarak etkili olabilmesi için bebeğin tamamen çıplak olması gerekir. Derinin rengi çok fazla pigmente olmadıkça fototerapinin etkinliğini değiştirmez (5).

Yatağa beyaz örtü serilmesi bebeğin ışık almayan bölgelerine ışığı yansıtma da yardımcı olabilir (55). Son yıllarda geliştirilen fiberoptik fototerapi, bebeğe sarılan battaniye benzeri bir örtü yardımıyla, küvöze gerek kalmaksızın, yatakta fototerapi verilmesini sağlamıştır (63). Bu fototerapi modunda ışık halojen lambadan geçirilerek, içinde hastanın da bulunduğu fiberoptik bir demet bulunan battaniyeye yayılır. Pezzati ve ark. (68) yaptıkları bir çalışmada term yenidoğanlarda fiberoptik fototerapi alanların vücut ısısında, konvansiyonel fototerapi alanlara göre daha az artış tesbit edildi. Ancak periferik dolaşımı bozuk olan hidropslu veya prematüre bebeklerde termal yanık olabilir (60). Fiberoptik fototerapi ile konvansiyonel fototerapi karşılaştırıldığında, fiberoptik fototerapi alan düşük doğum ağırlıklı bebeklerde daha az sıvı kaybı olduğu ve renal kan akımında fazla azalma olmadığından, bu bebeklerin daha fazla idrar çıkardığı saptandı (69). Dani ve ark. (70)'nın yaptığı bir çalışmada ise pretermelerde konvansiyonel fototerapi ile fiberoptik fototerapinin serebral kan akımı üzerine etkileri arasında fark

bulunamamış ve ikisinde de fototerapi sonlandırıldığında serebral kan akımında artma saptanmıştır.

Aralıklı ve sürekli fototerapinin karşılaştırıldığı çalışmalar farklı sonuçlar doğurmuştur. Bazı çalışmalarda aralıklı tedavinin etkinliği gösterilememiştir, ancak bunun, ışığın kapatıldığı intervallerin süresinden kaynaklanabildiği düşünülmektedir. Bilirubinun fotoizomerizasyonu primer olarak deride olur ve deriden uzaklaştırılan bilirubinun yerine yeni bilirubin oturması için bir-üç saat gerekir, bu nedenle bir saatten fazla fototerapiye ara vermek çok fazla anlamlı değildir. Beslenme ve ziyaret saatlerinde bebeğin gözlerinin açılarak fototerapiye bir saatten az bir süre ara verilmesi, fototerapinin etkinliğini düşürmez (60-64).

2.3.1.3. Fototerapinin Komplikasyonları

Kırk yılı aşkın bir süreden beri çok yaygın olarak kullanılan fototerapi genel olarak etkili ve güvenilir bir tedavi olarak kabul görmeye beraber bazı yan etkilere de sahiptir. Bunlar:

Retinal dejenerasyon: Yüksek yoğunlukta ışığın yenidoğanların gözündeki etkileri halen tam olarak bilinmemekle beraber, hayvan deneyleri devamlı ışıkla retinal dejenerasyonun oluşabileceğini göstermektedir. Bu yüzden fototerapi uygulanan tüm yenidoğanların gözleri, opak materyalle, hasara karşı kapatılmalıdır. Fiberoptik fototerapi de bu korumayı gerektirir (55).

Dehidratasyon ve ishal: Gerek buharlaşma yoluyla, gerekse dışkı miktar ve kıvamının artması nedeniyle, bebeklerde sıvı kaybının artması sık görülen bir komplikasyondur. Dışkıda meydana gelen değişikliklerin nedeninin, vazoaaktif intestinal peptid (VİP) sekresyonundaki artış olduğu öne sürülmüştür. Bebek sulu, hafif yeşil dışkı (fototerapi dışkısı) yapabilir. Bunda, bebeğin besinlerindeki laktoz ve sükrozun önemi yoktur (63,64). Hidrasyonun direkt olarak serum bilirubin seviyesini azalttığı yolunda delil yoktur, ancak dehidratasyon önlenmelidir. İdeal olarak sıvı, gastrointestinal motiliteyi uyarmak için enteral yoldan verilerek, bilirubinun enterohepatik reabsorpsiyonu engellenir (55).

Boo ve ark. (71) yaptıkları çalışmada sağlıklı term ve ciddi hiperbilirubinemi olan yenidoğanlarda, yoğun fototerapi ile ilk dört saat sonunda meydana gelen bilirubin seviyesindeki azalmanın, oral sıvı tedavisi alan grupla intravenöz sıvı tedavisi alan grup arasında farklı olmadığını göstermişlerdir.

Bronz bebek sendromu: Bu sendromda serum, idrar ve cilt birkaç saat içinde kahverengi siyah bir görünüm alır. Kolestaz nedeniyle biliyer ekskresyonun yetersiz kaldığı ve safra pigmentinin fotoürünlerle birlikte retansiyonu sebebiyle olduğu sanılmaktadır. Lumirubinin yıkılmasıyla ortaya çıkan kahverengi pigmentler, tipik deri döküntüsünün rengini verir. Ayrıca serumda artan koproporfirin ve foto yıkım ürünlerinin bu tabloya neden oldukları ileri sürülmüştür (60). Bu sendromun geliştiği tüm yenidoğanlar sekelsiz iyileşirler, yalnız literatürde bir term yenidoğan ölmüş, otopsisinde kernikterus saptanmıştır. Kolestazlı veya konjuge hiperbilirubimemili hastalarda fototerapi kullanılmaması tavsiye edilir (55,63,64).

Deri döküntüsü: Fototerapi alan bebeklerde deride iğne başı büyüklüğünde geçici eritamatoz döküntüler (fototerapi döküntüsü) olabilir.

Trombositopeni: Fototerapi alan bebeklerde hemoliz artabilir. Ayrıca fototerapi sırasında trombositlerin yıkımı da biraz hızlandığından, kemik iliği kompensasyonu yetersiz kalırsa trombositopeni gelişebilir (64).

Hipokalsemi: Fototerapi ile özellikle prematürelde hipokalsemi gelişebilir. Bunun nedeninin pineal bezin doğrudan ışık ile uyarılması sonucu melatonin sekresyonunun azalması olabileceği öne sürülmüştür.

PDA: Fototerapi alan 1000 g'ın altındaki bebeklerde PDA riski artmıştır. Bu bebeklerde PDA'nın cerrahi olarak kapatılması da, almayanlara kıyasla 2 kat daha fazla gözlenir. Tam olarak belli olmamakla beraber, duktus düz kaslarının içindeki kontraktıl proteinlerin oksidasyonu, direkt nitrik oksit benzeri etki ve oksijene bağlı kontraksiyonun önlenmesi gibi mekanizmalar neden olabilir (57).

DNA hasarı: Çeşitli in vitro ve hayvan kültürü çalışmalarında, fototerapiye bağlı gelişen DNA hasarı gösterilmiştir (20).

Riboflavin eksikliği: Riboflavin insan vücudundaki enzim sistemlerinin kullandığı bir koenzim olup, mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlarda çeşitli fotokimyasal reaksiyonlarda fotoreseptör olarak kullanılır. Bilirubin ile aynı dalga boyundaki ışıktan etkilenir. İn vitro olarak indirekt bilirubinin fotooksidasyonunu artırır (72). Knobloch ve ark. (73) çalışmalarında, fototerapi alan yenidoğanlarda kan riboflavin seviyesinin hipovitaminoza yol açacak kadar düştüğünü ve oral riboflavin uygulaması ile fototerapi süresinin kısaldığını göstermişlerdir. Riboflavin seviyesindeki düşme, eritrositlerin NADPH sentez yeteneğini, G-6-PD ve glutatyon redüktaz aktivitelerini azaltarak, hücreyi oksidatif strese duyarlı hale getirir. Ancak

oksidatif hasarı engelleyecek olan riboflavin düzeyi bilinmemektedir. Yenidoğanlarda riboflavin konsantrasyonu fototerapiye başladıktan 18 ile 24 saat içinde üçte bir oranında azalır. Günlük 0.3 mg riboflavin suplementasyonu ile bu azalmanın engellenebileceği düşünülmektedir (72).

2.3.1.4.Fotokimyasal Genotoksisite

Bir bileşiğin UV veya görünür ışıkla maruziyeti sonrası genotoksik etkileri artırmasına fotokimyasal genotoksisite (fotogenoksisite) denir. Bu etki bileşiğin ışığı absorbe etmesine bağlıdır (5,74,75).

Solar radyasyon genotoksik etkilerini esas olarak iki tip mekanizma ile gösterir: (i) DNA'nın direk eksitasyonu (ii) DNA'nın porfirin ve flavin gibi endojen selüler kromoforlar olarak adlandırılan diğer moleküller tarafından indirek eksitasyonu. DNA'nın fotoeksitasyonu, UV absorpsiyonu ile paraleldir ve 260 nm'de (UVC) maksimumken, 280-320 nm aralığı (UVB) ve 320-400 nm aralığında (UVA) giderek azalmaktadır (5).

Çeşitli endojen veya eksojen maddeler, UV veya görünür ışığı absorblama yoluyla flavin ve porfirinler gibi fotoeksitasyon ürünleri oluştururlar. Bu ürünler direkt veya indirekt mekanizmalarla DNA hasarı oluştururlar. Görünür bölge dalga boylarında uygulanan fototerapiye bağlı genotoksik etkiler de, çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (76).

Fotonlar NAD koenzimleri, riboflavin veya melanin gibi selüler kromoforlar tarafından hemen absorblanır. Ardından oluşan reaktif okijen metabolitleri (ROS) ile lipid, protein ve DNA gibi selüler makromoleküllerin oksidatif hasarı meydana gelir (77).

Stabil bir molekül olan DNA; lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 103 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür (78). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Reaktif oksijen metabolitleri oluşumundaki artma, antioksidant enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması, oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır (77,79).

2.4. COMET (TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ) TEKNİĞİ

Sitogenetik yöntemler, mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişen 'comet tekniği' de çeşitli tipte DNA hasarlarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle yaygın kullanım görmektedir.

2.4.1. Tarihçe

İlk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasarını tespit etmek üzere "Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği" (SCGE) geliştirilmiştir (80). Ostling ve Johanson mikroskop lamı üzerinde, bir ince tabaka agar jeline süspanse ettikleri az sayıda hücreyi, tuz ve deterjanlarla lize ettikten sonra, nötral şartlarda elektroforeze tabi tutmuşlardır. Elektroforez sırasında uygulanan elektrik akımı, kırılmış ve hafif DNA parçalarının çekirdekten hızlı göçünü sağlamaktadır. Comet tekniği, hasar görmüş DNA'nın elektroforez ile çekirdekten salınması prensibine dayanır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, hasarlı DNA, çekirdekten anoda doğru göç etmekte ve etidyum bromid gibi fluoresan bağlayıcı bir boya ile boyandıklarında bu hasarlı hücreler, kuyruklu yıldız (comet) benzeri görünüm almaktadır (80).

DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa ki, DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır.

Bu nedenlerden dolayı 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından alkali şartlar altında (pH>13), DNA tek sarmal kırılmalarının tespitine izin veren comet tekniği oluşturulmuştur (81). Kullanılan daha güçlü lizis koşulları, proteinlerin %95'inden fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile alkali oynak bölgelerin ve tek zincir kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde tanınması sağlanmıştır. Pek çok genotoksik ajanın çift zincir kırıklarından çok tek zincir kırıkları ve/veya alkali oynak bölgeler oluşturması nedeniyle metodun bu versiyonu daha çok önerilir hale gelmiştir (81, 82).

Böylelikle comet tekniğinin yeni dizaynı, birey hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasarı büyüklüğünün direk olarak tespitini sağlamaktadır. Bunun yanında,

DNA hasar/onarım tespiti ve mekanizması çalışmalarında kullanılabilir (83, 84).

2.4.2.Kullanım Alanları

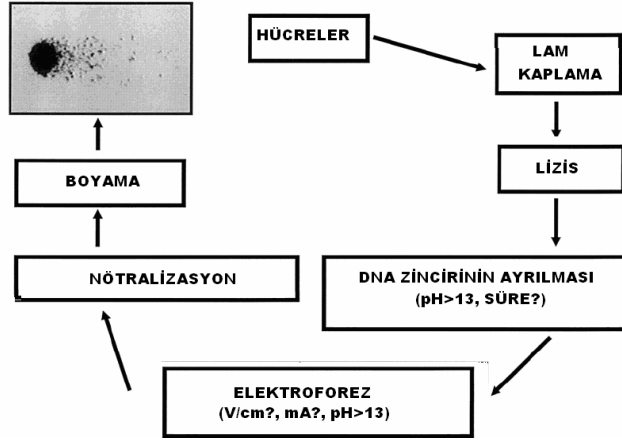
SCGE tekniği tek bir hücrede DNA hasarının direk tayininin yanı sıra, bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitine, dolayısıyla da bir tedavi sırasında hücrelerin cevabının özellikle radyoterapi ve kemoterapi rejimlerinde tümör cevabının saptanmasına yardımcı olabilmekte, dirençli hücre popülasyonunun tanımlanmasını sağlamaktadır. SCGE tekniği pek çok deneysel şartlarda DNA hasar ve onarımını incelediğinden, son yıllarda genotoksisite ve DNA onarım mekanizmalarının incelemesinde kullanımı artan bir yöntemdir (85, 86). Yöntem tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen hemen hemen her ökaryot hücrede DNA hasar ve onarımını tespit etmektedir. Oldukça küçük hacimde örneklerle çalışılabilir, sonuçlar bir günde elde edilebilir. Yöntem alkali elüsyon gibi diğer uzun DNA analizleri kadar duyarlıdır (87).

Günümüzde comet tekniği insan popülasyonlarından alınan lenfosit örneklerinde oksidatif hasar, UV ve iyonizan radyasyona duyarlıkların incelenmesi yönünden başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Özellikle izleme (human biomonitoring) çalışmalarında, meslekleri nedeniyle veya çevresel ya da kazayla çeşitli kimyasal maddelere maruz kalan kişilerde, DNA hasarının incelemesinde son yıllarda rağbet gören bir tekniktir (85-87).

Comet ölçümü insan çalışmalarında kullanılabilir en uygun testlerdendir. Çünkü radyoaktif maddelerle işaretleme gibi zararlı işlemleri içermez ve kolaylıkla görünebilir hücrelere uygulanabilir. Normalde sıklıkla kullanılan beyaz kan hücreleridir. Bu hücreler relatif olarak invaziv olmayan yollarla, kolaylıkla ayrılabilir ve metoda iyi uyum sağlar. Ancak kanser için hedef doku olmamaları ve beyaz kan hücrelerindeki hasarın gerçek hedef dokudaki hasarı yeterince yansıtmadığının net olmaması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bazen cerrahi sonrası çıkarılan dokular kullanılabilirle birlikte sağlıklı kontrol dokusu elde etmek oldukça güçtür. Bukkal ve ürotelyal epitel hücreler de denenmiştir ancak bu hücreler yapıları nedeniyle ek proteaz kullanımı ve uzun bir lizis süresi gerektirirler (85).

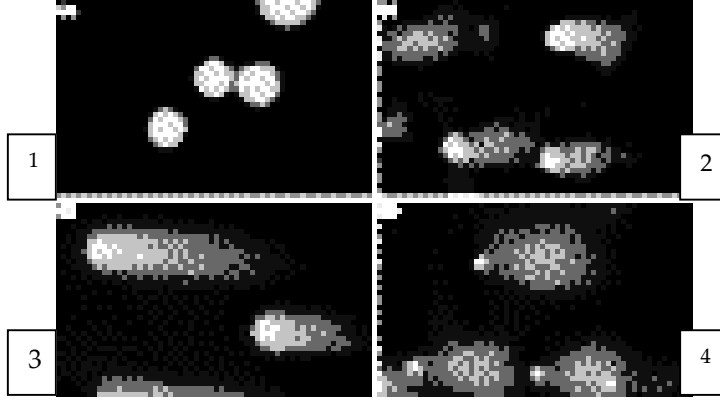
2.4.3.Uygulama Protokolü

Tekniğin uygulanmasında iki tip jel modeli vardır. Tek tabakalı jel ve sandviç jeller. Daha yaygın olarak kullanılan, sandviç modelidir. Gömülen bu hücreler, lysing solüsyonunda bekletilir. En çok tercih edilen yöntem, en az bir saat süreyle, pH>10-12'de, deterjanla ve yüksek tuz konsantrasyonunda hücrelerin bekletilmesi şeklindedir. Elektroforezden önce lamlar, alkali elektroforez solüsyonunda DNA sarmalının ayrılması için bekletilir. Bu solüsyon pH>12 ve düşük tuz konsantrasyonunda olmalıdır. Uygulanacak olan elektroforez süresi ve voltajı hücrelerdeki DNA göçünü etkilediği için, her denemede standart seçilen bir tanesi kullanılmalıdır. Elektroforezi takiben lamların yıkanması için en çok tris tamponu tercih edilir. En son olarak DNA bağlayıcı boyalarla (akridin oranj, etidium bromid, propidyum iyodit, DAPI gibi) floresan renk oluşturulur (88) (Şekil 7).



Şekil 7. Alkali comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi (83)

Comet oluşum şekillerini değerlendirmek ve tayini yapmak için pek çok farklı çalışmalar yapılmaktadır. Değerlendirme tekniklerinin en basiti hasar derecelerine göre kategorilendirerek (genelde 4 veya 5 sınıfta) cometleri göz ile ampirik olarak kaydetmektir (84, 89). Gözle görüntü analizinde göç etmiş hücreler, sıklıkla kuyruk uzunluklarına göre, sınıflandırılarak ayırt edilebilmektedir (Şekil 8).



Şekil 8. Comet kuyruklarının gözle amprik değerlendirilmesi (1: Hasarsız, 2: Az hasarlı, 3: Orta derecede hasarlı, 4: Çok hasarlı)

Belli bir bölgedeki DNA miktarı, o bölgedeki fluoresans yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu özellikten yararlanarak dijital görüntü sistemlerinde ve analiz yazılım programlarındaki ilerlemeye paralel olarak daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. Hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk moment gibi çeşitli comet parametreleri ölçülebilmektedir. Bunlar arasında kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu en sık kullanılanlar olmasına rağmen, önerilen ve kullanımı gittikçe artan ölçüm parametresi kuyruk DNA yüzdesidir. Çünkü bu parametre cometlerin görünür kısmıdır ve DNA kırık frekansı ile doğru orantılıdır. Kuyruk momenti; kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranının çarpımı olarak tanımlanmaktadır. Araştırmacı hangi ölçüm parametresini kullanırsa kullansın, parametreler çalışmalarda açıkça not edilmelidir (83, 90).

Gelişmiş laboratuvarlarda ise genellikle *'image analyzer'*dan yararlanılmaktadır. Son yıllarda ise ölçümler LSM (Laser-scanning microscopy) teknolojisiyle geliştirilmiştir. Böylece sarmal kırılmalarındaki farklılıklar kolaylıkla belirlenebilmektedir (91).

2.4.4.Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler

SCGE tekniğinin farklı uygulanması sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), lysing solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre ve pH), metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle deneylerde şartlar standart tutulmalıdır. Ayrıca insana yönelik çalışmalarda

genotoksik etkiyi potansiyelize ettiği tartişılan faktörler SCGE tekniği de etkileyebilir.

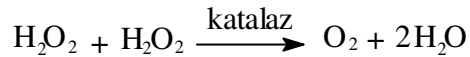
2.4.5.Comet Tekniğinin Avantajları

- Az sayıda hücre gerektirir.
- Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
- Kolay uygulanabilir.
- Hassastır.
- Hızlıdır.
- Ekonomiktir.
- Güvenilirdir.
- Çeşitli türlerde DNA hasarlarını tespit edebilir.
- Tek hücre seviyesinde bilgi edinilebilir.
- Endüstriyel toksikoloji, çevresel toksikoloji, genetik toksikoloji, insan biyoizlemleri, DNA onarım ve hasarının temel mekanizması gibi çalışmalarda geniş olarak kullanılabilir (85, 90).

Yöntem in vivo modellerde herhangi bir dokuya da uyarlanabildiğinden, sadece hızlı proliferasyon olan hücrelerde uygulanabilir olan diğer genotoksikite testlerinden daha üstündür. Aynı zamanda tek bir doku hasarını belirlemek de mümkündür (90).

2.5.KATALAZ

Katalaz (EC 1.11.1.6) aerobik canlılarda yaygın bulunan ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve moleküler oksijene yıkan antioksidant bir enzimdir (92).



Esas olarak peroksizomlarda lokalizedir ve yapısında 4 adet *hem* molekülü bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositler katalazın en yüksek aktiviteye sahip olduğu organlardır. Katalaz hücreyi respiratuvar patlamalara karşı da koruyucu olarak hizmet eder. Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksitin yanı sıra metil-, etil- hidroksiperoksitler gibi küçük moleküllü lipit hidroperoksitleri de içine alır. Katalaz aktivitesi selüler H_2O_2 üretimi arttıkça artmaktadır (92).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alınarak uygulandı. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Proje kodu: TT-05-03; etik kurul onay tarihi: 04.01.2005; onay kodu: 05/48.

Bu çalışma Mayıs 2005 - Eylül 2005 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı. Numune toplama işlemleri Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Yenidoğan Servisi'nde gerçekleştirildi. Hücrelerin immünofluoresan mikroskobik incelemeleri Genetik Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.1.HASTA VE KONTROL GRUPLARININ TANIMI

Bu çalışmada hasta grubu, patolojik düzeyde indirekt hiperbilirubinemisi olan ve fototerapi alan 20 term yenidoğandan, kontrol grubu ise fizyolojik sarılıklı 20 term yenidoğandan oluşturuldu. Bebeklerin ailelerine çalışma hakkında bilgi verilerek onamları alındı.

Hasta grubunda bulunanların tamamı, normal hemogram bulgularıyla non-hemolitik hiperbilirubinemisi olan ve fototerapi uygulanan, klinik olarak stabil sarılıklı infantlardan oluşturuldu. Kan değişimi ihtiyacı olan hastalar çalışmadan çıkarıldı. Prematürel, kan grubu uygunsuzluğu bulunanlar, direkt Coombs testi

pozitif olanlar; asfiksi, sepsis, majör konjenital malformasyonu bulunanlar, direkt hiperbilirubinemi olanlar, maternal hastalığı veya antenatal ilaç kullanımı hikayesi bulunanlar çalışmaya alınmadı.

Kontrol grubu, rutin kontroller amacıyla Sosyal Pediatri Ünitesi'ne başvuran 20 sağlıklı term yenidoğandan seçildi. Hasta ve kontrol grubundaki her bir yenidoğan için cinsiyet, yaş, doğum ağırlığı, doğum şekli, 5. dakika Apgar skorları ve tam kan sayımı değerleri kaydedildi.

Numune alımı: Hastaların ilk muayeneleri sırasında ölçülen total ve direkt bilirubin düzeyleri ve tam kan sayımı değerleri bu çalışma için de kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarında bulunan yenidoğanlara, bu çalışma için ek herhangi bir invaziv girişimde bulunulmadı. Tam kan sayımı için EDTA'lı tüplere alınan kanlardan comet parametreleri ve katalaz aktiviteleri çalışıldı. Kontrol grubundaki yenidoğanların bir kez, hasta grubundakilerin ise fototerapi öncesinde ve sonrasında olmak üzere iki kez comet skorları değerlendirildi.

3.2.COMET TEKNİĞİ İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER VE KİMYASAL MADDELER

- **Fosfat tamponu:** NaCl, Art.6400, Merck; KCl, Art.4935, Merck; Na₂HPO₄, Art. 6586, Merck; KH₂PO₄, Art.4871, Merck
- **Lizis çözeltisi:** NaCl, Art.6400, Merck; EDTA, 131026, Panreac
- **Elektroforez tamponu:** EDTA, 131026, Panreac; NaOH, Art.6462, Merck; 8-hidroksikinolin, H-6878, Sigma
- **Nötralizasyon tamponu:** Tris base T3253, Trizma-Sigma
- **Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA):** Low Melting Agarose, % 0.75, 25 g, Amresco
- **Normal kaynama dereceli agaroz (NMA):** Normal Melting Agarose % 0.5, Agarose Standart, A 9539, Sigma
- **Temizleme çözeltisi:** NaOH, Art.6462, Merck; %95 Etanol, Merck
- **Polilizin çözeltisi:** Poly-L-Lysine, P-8920, Sigma
- Etidyum bromür, 46067, Fluca
- Histopaque-1077, 109H6043, Sigma
- pH 4, 7, 10 kalibratörleri

3.3 COMET TEKNİĞİ İÇİN KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

- Digital block heater, Thermolyne BK 165x12A
- Elektroforez güç kaynağı, Gelman Instrument CoA, Model:38207, Seri No: 361
- Elektroforez tankı
- Digital pH metre, Beckman, Seri No: 1050717
- Benmari, Memmet, ML 0080
- Mikrodalga fırın, Arçelik, MD 554, Seri no. 0300472807
- Elektronik terazi, AND GR-200, Seri no: 14200578
- Orbital karıştırıcı, Electro Mag, M 1201
- Soğutmalı santrifüj, Sigma 3K30
- Santrifüj, Hettich EBA 12
- Mikropipetler; Socorex 20- 200, 100-1000, Genex Beta 10-100, 2-20
- Cam şale
- Fotoğraf makinesi (Sensys) ataşmanlı floresans mikroskop (Nikon Eclips)

3.4. COMET TEKNİĞİ ÇÖZELTİLERİNİN HAZIRLANIŞI

Fosfat tamponu (10 mM, pH 7.4, 1000 mL)

Bir behere ayrı ayrı tartılarak, 136 mM (7.937 g) NaCl, 2.7 mM (0.201 g) KCl; 10 mM (1.4196 g) Na₂HPO₄ ve 10 mM (1.3606 g) KH₂PO₄ kondu. Üzerlerine 600 mL distile su eklendikten sonra, karıştırılarak ve ısıtılarak çözünmeleri sağlandı. pH metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra çözelti pH'sı 7.4'e ayarlandı. Karışım balon jøjeye aktarılarak son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı. Kullanılincaya dek 2-8°C'de saklandı. Ayda bir yeni çözelti hazırlandı.

Lizis çözeltisi (pH 10, 500 mL)

Bir behere 2.5 M (73.05 g) NaCl, 100 mM (18.6 g) EDTA ve 10 mM (0.6 g) Tris tartılarak kondu. Üzerlerine 350 mL distile su eklenerek karıştırıcı yardımı ile çözünmeleri sağlandı. Çözelti pH'sı 10'a ayarlandıktan sonra karışım balon jøjeye aktarılarak son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Kullanılincaya dek 2-

8°C'de saklandı. Ayda bir yeni çözelti hazırlandı. Kullanılmadan önce çözeltiye son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde, Triton-X-100 eklendi.

Elektroforez tamponu (pH 13.1, 500 mL)

Elektroforez tamponunu hazırlamak için, 10 mM (1.86g) EDTA, 300 mM (6g) NaOH tartılarak behere kondu. 400 mL distile su eklendi, karıştırılarak eritildi. Kalibrasyonu ayarlanmış pH metre ile pH'sı 13.1'e ayarlandı. Balon jöjeye aktarılarak son hacim 500 mL'ye tamamlandı. Kullanılıncaya dek 2-8°C'de saklandı. Ayda bir yeni çözelti hazırlandı.

Kullanılmadan önce çözeltiye final konsantrasyonu % 0.1 (w/v) olacak şekilde, 8-hidroksikinolin eklendi.

Nötralizasyon tamponu (pH 7.5, 250 mL)

Nötralizasyon tamponu hazırlamak için, 0.4 M (15.76 g) Tris tartılarak bir behere aktarıldı. Üzerine 150 mL distile su eklendi. Karıştırıcı yardımıyla eritilerek, pH'sı kalibre edilmiş pH metre ile 7.5'e ayarlandı. Balon jöjeye aktarılarak üzeri distile su ile tamamlandı. Kullanılıncaya dek 2-8°C'de saklandı. Ayda bir yeni çözelti hazırlandı.

Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA)

Düşük kaynama dereceli agarozdan 0.75 g tartıldı; üzerine 10 mL PBS (10 mM, pH 7.5) eklenerek 400 Watt mikrodalga fırında bir taşım kaynatıldı. Birer mL'lik alikotlara ayrılarak, 2-8°C'de saklandı.

Normal kaynama dereceli agaroz (NMA)

Normal kaynama dereceli agarozdan 0.05 g tartılıp üzerine 10 mL PBS (10 mM, pH 7.5) eklendi. Mikrodalga fırında 400 Watt'da bir taşım kaynatıldı. Birer mL'lik alikotlara ayrılarak, 2-8°C'de saklandı.

Temizleme çözeltisi (100 mL)

Temizleme çözeltisi hazırlamak için 10 g NaOH, 40 mL distile suda çözdürüldükten sonra üzerine 60 mL % 95 etanol eklendi. Karışım, lamları tamamen kapatacak şekilde şaleye eklendi. Orbital karıştırıcıda 10 dakika süreyle çalkalanarak lamlar temizlendi.

Polilizin çözeltisi (70 mL)

Polilizin çözeltisi hazırlamak için, 7 mL poli-L-lizin, 7 mL PBS ve 56 mL distile su ile karıştırıldı. Karışım kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Stok boyama çözeltisi

Stok boyama çözeltisi hazırlanırken, 25 mg etidyum bromür tartılarak 5 mL distile suda çözüldü. Çözelti şişesi karanlıkta saklandı.

3.5.COMET TEKNİĞİ PROTOKOLÜ

Comet tekniği, Singh ve ark. (81) tarafından geliştirilen metoda göre modifiye edilerek uygulandı.

3.5.1.Lam Kaplama

Agaroz jelin lama yapışmasını sağlamak amacıyla lamalar polilizin çözeltisi ile kaplandı:

1-Şaleye yerleştirilen lamaların üzerlerine temizleme çözeltisi eklendi. Orbital karıştırıcı üzerinde 2 saat süreyle çalkalanarak yıkamaya bırakıldı.

2-Lamlar, içinde distile su bulunan yeni bir şaleye alınarak, orbital karıştırıcı üzerinde 10'ar dakika arayla en az dört kez yıkandı, temizleme solüsyonundan arındırıldı.

3-Yıkanan lamalar polilizin çözeltisi içeren şaleye dizilerek, orbital karıştırıcı üzerinde bir saat süreyle karıştırıldı.

4-Lizinlenmiş lamalar distile sudan geçirilerek 45°C sıcaklıktaki etüvde kurutuldu. Kullanılmaya dek 2-8°C'ye saklandı.

3.5.2.Lenfosit İzolasyonu

Periferik beyaz kan hücrelerinden kolay elde edilebilmesi ve vücuttaki oksidatif stres düzeyini iyi yansıtabilmesi nedeniyle, genotoksisite çalışmalarında en çok lenfositler kullanılmaktadır (87). Bu çalışmada da EDTA'lı tüplere alınan tam kan numunelerinden izole edilen lenfositler kullanıldı. Lenfosit izolasyonu numunelerin alınmasından sonra en geç bir saat içinde gerçekleştirildi.

Hasta ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüplere alınan yaklaşık 1 mL'lik kan numuneleri 1500xg'de, 4°C'de, 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Üzerlerindeki

plazma uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL Histopaque 1077 (fikol) eklendi ve tekrar 1500xg'de 4°C'de, 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Üstte kalan buffy coat kısmı alınıp alikotlara aktarıldı. Ardından CBC laboratuvarında sayım yapılarak, hücre sayısı 2000/μl olacak şekilde PBS (10 mM, pH 7.4) ile dilüsyon uygulandı.

3.5.3. Lamların Jelle Kaplanması

Hücrelerin gömülmesi ve elektroforetik göçe hazırlık amacıyla lamlar jelle kaplandı:

1-Tüm numuneler çift çalışıldı. Lizinli lamların her iki uç kısmına 110'ar μL NMA döküldü. Üzerleri hemen birer lamelle kapatılarak agarozların katılaşmadan önce düzgün bir şekilde dağılımları sağlandı. 10-15 dakika süreyle 4°C'de katılaşmaya bırakıldı.

2-Farklı bir eppendorf tüpte 180 μL LMA (% 0.5, 37°C) içine 30 μL hücre eklendi. Pipetasyon yapılarak homojen karışımları sağlandı. Agarozun katılaşmasını engellemek ve yüksek ısılarda hücresel harabiyete sebep vermemek için bu aşamadaki işlemler 37°C sabit ısıdaki heater block içinde gerçekleştirildi.

3-İlk katı dökülen lam dolaptan çıkarıldıktan sonra üzerindeki lamel, alttaki jel tabakayı bozmadan dikkatlice kaldırıldı.

4-Daha önce hazırlanan jel-hücre karışımından 75'er μL alınarak ikinci katlar döküldü. Lameller hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılarak, dökülen agarozların düzgün dağılımları sağlandı. 10-15 dakika süreyle 4°C'de katılaşmaya bırakıldı.

5-Dolaptan çıkarılan lamların üzerinden lameller tekrar yavaşça kaldırılarak 75'er μL NMA döküldü ve üçüncü tabakalar oluşturuldu.

6-Stok lizis çözeltisinden 30 mL alınarak, içine 30 μL Triton-X-100 eklendi. Hazırlanan taze karışım, 15 dakika süreyle dolapta bekletildi. Lameller dikkatlice jellerin üzerinden kaldırıldı. Lamlar lizis çözeltisi içinde, jelle kaplı yüzeyleri üste bakacak şekilde, en az bir saat süreyle bekletildi.

3.5.4. Elektroforez

DNA kırıklarını görünür hale getirmek için elektroforetik yürütme işlemi uygulandı:

1-Kullanımdan hemen önce elektroforez tamponu içine final konsantrasyonu % 0.1 (w/v) olacak şekilde (40 mL elektroforez tampon için 0.04 g) 8-hidroksikinolin eklendi. Bir radikal yakalayıcı olan 8-hidroksikinolin karanlıkta ve ısıtılmadan çözüldü.

2-Lamlar artı kutba ve birbirlerine mümkün olduğunca yakın olacak şekilde elektroforez tankına yerleştirildi. Aynı anda en fazla 3 lam çalışıldı.

3-Taze hazırlanmış elektroforez tamponu, elektroforez tankına aktarıldı. Tampon içinde lamlar DNA unwinding (çift sarmal DNA'nın tek sarmala dönüşmesi) için 30 dakika süreyle bekletildi. Bu esnada direk ışıktan kaçınmak amacıyla tankın kapağı kapalı tutuldu. Bekletme ve elektroforetik yürütme işlemleri süresince tank, içerisinde buz parçacıkları bulunduran bir kaptaki bekletildi.

4-Güç kaynağı 200 mA, 25 volta ayarlanarak 30 dakika süreyle elektroforetik yürütme işlemi gerçekleştirildi.

5-Bir penset yardımıyla tanktan çıkarılan lamlar, pH'sı 7.5 olan 4°C'deki nötralizasyon tamponu içine 15 dakika süreyle bırakılarak nötralizasyon sağlandı.

3.5.5. Boyama

Stok etidyum bromürden (5 mg/mL, distile su) 3 µL alınarak 30 mL PBS'le dilüsyon yapıldı. Lamlar boya çözeltisi içinde 5-10 dakika süreyle bekletildi. Ardından, boya fazlalığının giderilmesi için birkaç kez distile su içeren kaptaki lamlar yıkandı. Jellerin üzerine yeni lamellerle kapatılarak immünfluoresan mikroskopik incelemeye geçildi.

3.5.6. İmmünofluoresan Mikroskopik İnceleme

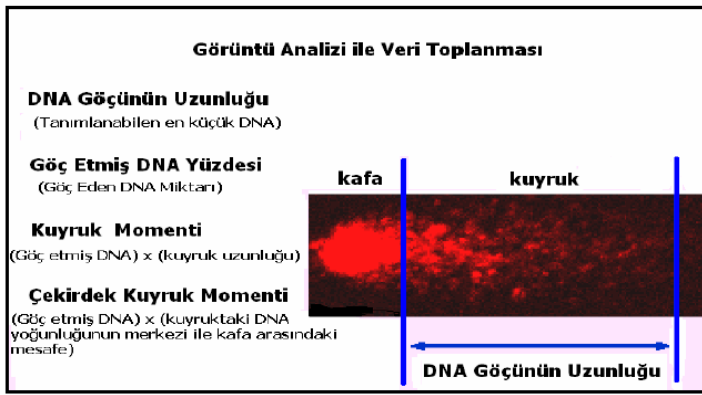
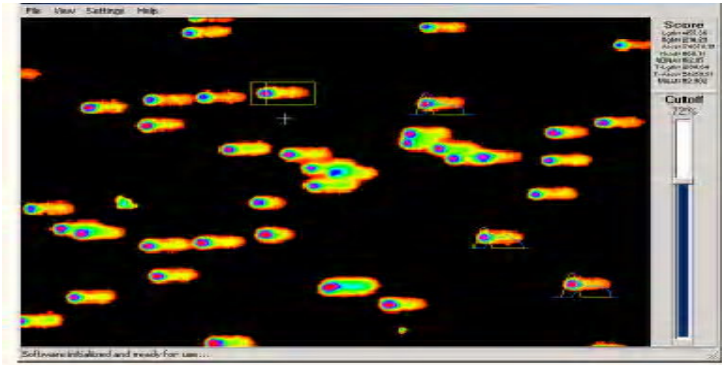
Kamera ataşmanlı bir immünofluoresan mikroskopta (Nikon Eclips, 565 nm eksitasyon filtreli, 590 nm bariyer filtreli), x20 büyütmede her bir numune için rastgele seçilen ortalama 10 farklı sahadan, 10 ayrı fotoğraf çekilerek hücrelerin DNA'ları analiz edildi. Her bir yenidoğan için toplam 100 hücre sayıldı.

3.5.7. Görüntü Analiz Programı ile Cometleri Değerlendirme

Hücrelerin comet skorlamalarını yapmak için, bir bilgisayar destekli görüntü analiz programı (Comet Score, Tritex, USA) kullanıldı (**Şekil 9**).

Ölçümler esnasında her bir hücre için, DNA merkez noktasından kuyruk sonuna kadar işaretlemeler yapılarak, göç etmiş (kuyruk) DNA %'si, kuyruk

momenti ve kuyruk uzunluğu (DNA göçünün uzunluğu) gibi comet parametrelerinin ölçümü yapıldı.



Şekil 9. Görüntü analiz programı ile DNA hasarı miktarının hesaplanması

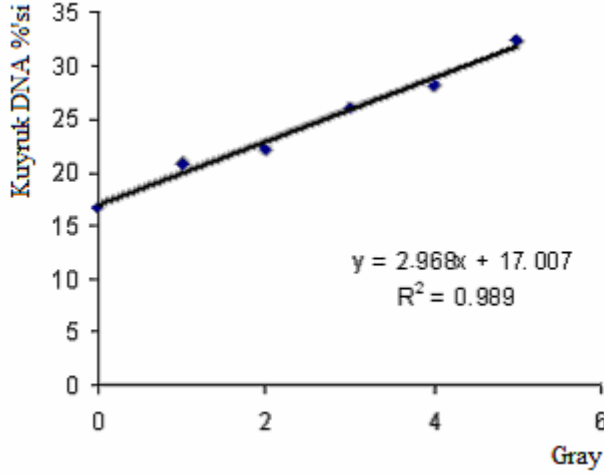
3.5.8. Pozitif-Negatif Kontrol Çalışmaları ve CV Değerleri

Pozitif ve negatif kontrol çalışmaları için sağlıklı üç kişiden alınan kan numuneleri, 100 μM H_2O_2 ile 5 dakika buz kalıbı içerisinde inkübasyona bırakıldıktan sonra lenfositler izole edildi. Ardından lenfositler, LMA'a gömülerek rutin comet basamaklarına geçildi. H_2O_2 ile muamele edilen (pozitif kontrol) ve edilmeyen (negatif kontrol) numuneler eş zamanlı olarak elektroforezde yürütülerek comet parametreleri değerlendirildi.

Ayrıca deney şartlarının ve elektroforetik sürecin doğruluğunu kontrol amacıyla, iyonize radyasyonun DNA hasarı yapıcı etkisinden faydalandı. Bu amaçla sağlıklı üç kişiden lenfosit izolasyonu yapılarak, lenfosit karışımı elde edildi. Hücrelere sırasıyla 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 gray (Gy) dozlarında gamma ışını verildikten sonra, kuyruk DNA %'leri değerlendirildi. Doz artış oranı ile kuyruk DNA %'leri arasında pozitif bir korelasyon bulundu ($r^2=0.989$) (**Tablo 1**).

Tablo 1. Lenfositlerin farklı dozlarda irradyasyon sonrası ölçülen kuyruk DNA %'leri

Doz	0 Gy	1 Gy	2 Gy	3 Gy	4 Gy	5 Gy
Kuyruk DNA %'si (ort)	16.8	20.75	22.31	26.14	28.25	32.31



Şekil 10. Radyasyon dozu ile kuyruk DNA %'si arasındaki ilişki

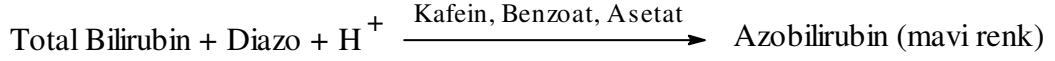
Ayrıca sağlıklı bir kişiden beş ayrı günde alınan kan numuneleri 5 dk süreyle 200 μM H_2O_2 ile inkübasyona bırakıldı. Lenfositlerin DNA kırıkları comet tekniği ile ölçüldü. CV değerleri sırasıyla kuyruk uzunluğu için % 11.15, kuyruk DNA %'si için % 17.43, kuyruk momenti için % 16.91 bulundu.

3.6.BİLİRUBİN ÖLÇÜMÜ

Serum total ve direkt bilirubin ölçümleri Synchron LX-C (Beckman) sistem otomatik analizörlerde gerçekleştirildi. Total ve direkt bilirubin ölçümlerinde serum kullanıldı. Hemolizli numune ölçümünden kaçınıldı.

3.6.1.Prensip

Total bilirubin reaktifi ile, serum total bilirubin konsantrasyonu *end point diazo metodu* ile değerlendirilir. Serum veya plazmadaki total bilirubin düzeyi, numuneye kafein, benzoat ve asetat gibi akseleratör reaktiflerin varlığında diazotize sülfanilik asit eklenmesiyle ölçülür. İnkübasyon periyodu boyunca direkt ve indirekt bilirubin diazo reaktifi ile reaksiyona girerek azobilirubin oluşturur:



Sincron LX System uygun numune ve reaktif volümlerini otomatik olarak küvete pipetler. 520 nm'deki absorbans değişikliği kaydedilir. Absorbanstaki değişiklik, numunedeki total bilirubin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Direkt bilirubin konsantrasyonu, direkt bilirubin reaktifi ile *end point diazo metodu* ile ölçülür. Direkt bilirubin diazo reaktifi ile akseleratör olmaksızın azobilirubin meydana getirir:



Sistem uygun numune ve reaktif volümlerini küvete pipetler. 560 nm'deki absorbans değişimi serum direkt bilirubin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Total bilirubin değerlerinden, direkt bilirubin çıkarılarak indirekt bilirubin değerleri hesaplanır.

3.6.2.Reaktifler

Total bilirubin ölçüm reaktifleri

- Sodyum benzoat (347 mmol/L)
- Kafein (173.9 mmol/L)
- Sülfanilik asit (27 mmol/L)
- Hidroklorik asit (50 mmol/L)
- Sodyum nitrit (0.36 mmol/L)
- Sodyum asetat (609 mmol/L)

Direkt bilirubin ölçüm reaktifleri

- Sülfanilik asit (27 mmol/L)
- Hidroklorik asit (51 mmol/L)
- Sodyum nitrit (0.12 mmol/L)

3.6.3.Referans İntervalleri

Erişkinler ve bir aydan büyük infantlarda total serum bilirubin değerleri 0.3-1.2 mg/dL (4.1-20.4 µmol/L), konjuge bilirubin değerleri ise tüm yaş grupları için 0-

0.2 mg/dL (0-3.4 µmol/L)'dir. Prematür ve matür yenidoğanlarda bilirubin değerleri, yaş grupları arasında farklılık göstermektedir ve referans intervalleri **Tablo 2**'te belirtilmektedir.

Tablo 2. Prematür ve matür yenidoğanlarda total bilirubin referans intervalleri

	PREMATÜR	MATÜR
İlk 24 saat	<6 mg/dL	<6 mg/dL
İlk 48 saat	<8 mg/dL	<7 mg/dL
3-5. gün	<15 mg/dL	<12 mg/dL

3.7.KATALAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ

Plazma katalaz aktivitesi ölçümünde Aebi ve ark. (93) tarafından tanımlanan tekniğin bir modifikasyonu kullanıldı (94). Aşağıda katalaz aktivitesi ölçümü prensibi ve çalışma metodu özetlenmiştir:

3.7.1.Prensip

Ölçüm, H₂O₂'nin katalaz tarafından O₂ ve H₂O'ya parçalanması esnasında reaksiyon karışımındaki absorbans değişiminin, 240 nm'de zamana bağlı OD düşüşü şeklinde hesaplanması esasına dayanmaktadır:



3.7.2.Reaktifler

- H₂O₂ (38 mmol/L): Çalışmadan hemen önce % 35'lik H₂O₂'den 3.27 mL alınarak, 0.05 M, pH 7.0 fosfat tamponu ile 1L'ye tamamlandı.
- Fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.0)

3.7.3.Çalışma

Çalışma esnasında, 5 µL plazma ve 395 µL fosfat tamponundan oluşan (pH 7.0) 30°C'deki karışım, 1 cm'lik ışık yolu olan spektrofotometrede, 1 mL'lik kuartz küvete pipetlendi. Sıfıncı dakikada, reaksiyon karışımına 200 µL 38 mmol/L H₂O₂ eklenerek 240 nm'deki absorbans değişimi 4 dakika süreyle takip edildi.

Serum katalaz aktivitesi aşağıdaki gibi hesaplandı:

$$\text{Aktivite (kU/L)} = \Delta A/\text{dk} \times (600/5) \times 1/0.04$$

$\Delta A/dk$ dakikalık absorbans farkı, 600/5 serum dilüsyon faktörü, 0.04 H_2O_2 'nin milimolar absorbtivitesini ifade etmektedir (94). Laszio'nun yapmış olduğu çalışmada serum katalaz aktivitesi referans değeri ortalaması 50.5 (14.3-104.8) kU/L bulunmuştur (95). Çalışmanın CV'si 3.55 (ort.=95.43, SS=3.39) bulundu.

3.8.FOTOTERAPİ ÜNİTESİ

Fototerapi ünitesinde kombine (beyaz/mavi) floresan tüpler kullanıldı. Sistem, gözler dışında tüm vücudu çıplak olarak inkübatöre yerleştirilmiş yenidoğanın, 40 cm üzerinden uygulandı. Tüm hastalara beslenme, temizlenme ve numune toplama zamanları dışında sürekli fototerapi verildi. Lambaların periyodik kontrolleri yetkili firmalarca takip edildi.

3.9.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tüm istatistiksel analizler SPSS® 13.0 paket programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizlerde grupların normal dağılımlara uygunlukları Kolmogorov Smirnov analizi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyan durumlarda parametrik testler, uymayan durumlarda non-parametrik testler kullanıldı. Fototerapi öncesi, fototerapi sonrası ve kontrol gruplarında ölçülebilen parametrik test verileri, ortalama \pm standart sapma (ort \pm SS), non-parametrik test verileri ise median (min-max) ile ifade edildi. Parametrik değişkenler Student's *t*-test ile karşılaştırıldı. Nonparametrik test verileri için iki grup arasındaki değerlerin farkına Mann-Whitney U, fototerapi öncesi ve sonrası değerlerin farkına ise Wilcoxon Rank testi kullanılarak bakıldı. Kalitatif değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. İndirekt hiperbilirubinemi olan yenidoğanların, fototerapi öncesi ve sonrası bilirubin değerleri ile diğer parametreler arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla Pearson korelasyon analizleri kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmanın hasta grubuna sarılık nedeni ile Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yenidoğan servisinde yatırılan ve non-hemolitik indirekt hiperbilirubinemi tanısı nedeniyle fototerapi başlanan 20 yenidoğan alındı. Kontrol grubuna ise aynı yaş grubunda yer alan, fizyolojik sarılık tanısı almış 20 yenidoğan dahil edildi.

Hastaların fototerapi öncesi ve sonrası tam kan sayımı değerleri, serum bilirubin düzeyleri, plazma katalaz aktiviteleri ve oksidatif DNA hasarını gösteren çeşitli comet parametreleri (*kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti, kuyruk DNA %'si*), kontrol grubu ile karşılaştırılarak incelendi.

Hasta grubundaki yenidoğanların 11'i erkek (%55), 9'u kız (%45) idi. Kontrol grubunda 12 erkek (%60), 8 kız (%40) yenidoğan mevcuttu (**Tablo 3**).

Tablo 3: Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımı

Gruplar	Kız		Erkek		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Hasta Grubu	9	45	11	55	20	100
Kontrol Grubu	8	40	12	60	20	100
Toplam	17	42.5	23	57.5	40	100

Çalışmaya alındıkları ortalama postnatal yaş hasta grubunda 5.20 ± 3.15 gün, doğum ağırlıkları 3023.0 ± 422.3 g, kontrol grubunda ise ortalama yaş 5.97 ± 1.86 gün, doğum ağırlıkları 3248.5 ± 381.2 g bulundu. Her iki grupta da bebeklerin yaş ve doğum ağırlıkları arasında farklılık görülmedi ($p < 0.05$) (**Tablo 4**).

Tablo 4: Hasta ve kontrol gruplarının yaş ve doğum ağırlıkları dağılımı

Değişkenler Ort±SS	n	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p
Yaş (gün)	20	5.20 ± 3.15	5.97 ± 1.86	>0.05
Doğum ağırlığı (g)	20	3023.0 ± 422.3	3248.5 ± 381.2	>0.05

Hasta ve kontrol grubundaki bebekler arasında doğum şekilleri açısından farklılık izlenmedi ($p > 0.05$) (**Tablo 5**).

Tablo 5: Hasta ve kontrol gruplarının doğum şekli dağılımı

Gruplar	Hasta Grubu		Kontrol Grubu		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Normal doğum	10	50	9	45	19	47.5
Sezeryan	10	50	11	55	21	52.5
Toplam	20	100	20	100	40	100

Kontrol ve hasta grubunda yer alan tüm bebekler matür, Apgar skorları 8 ve üzeri idi. Gruplar arasında Apgar skorları ve gebelik süreleri açısından istatistiksel açıdan farklılık gözlenmedi (**Tablo 6**). Hasta grubundaki yenidoğanlar, non-hemolitik hiperbilirubinemisi olanlar arasından seçildi. Bu nedenle hasta ve kontrol grubunda yer alan yenidoğanlarda tam kan sayımı değerlendirmeleri yapıldı. Hemoglobün değerleri açısından gruplar arasında farklılık izlenmedi (**Tablo 6**).

Hasta grubunda yer alan tüm sarılıklı bebeklere 2004 yılında *American Academy of Pediatrics (AAP)* (44) tarafından bildirilen tedavi protokolüne göre, yaş ve bilirubin düzeylerine uygun şekilde (doz ve süre açısından), temizlenme ve numune toplama zamanları dışında bebeklere *sürekli fototerapi* uygulandı.

Uygulanan *ortalama fototerapi süresi* 55.7±21.7 (min 24 - max 96) saat bulundu (Tablo 6).

Tablo 6: Hasta ve kontrol gruplarının hemoglobin değerleri, Apgar skorları ve fototerapi süreleri açısından karşılaştırılması

Değişkenler Ort±SS	n	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p
Hemoglobin (g/dL)	20	18.2±1.8	17.2±1.3	>0.05
Apgar (5. dakika)	20	9±0.2	9±0.2	>0.05
Fototerapi süresi (saat)	20	55.7±21.7	-	

Fototerapi öncesi, fototerapi sonrası ve kontrol grupları bilirubin düzeyleri açısından karşılaştırıldığında (Tablo 7a, 7b, 7c);

- *Fototerapi öncesi grupta* indirekt bilirubin düzeyleri, *fototerapi sonrasına* ve *kontrol gruplarına* göre belirgin şekilde yüksek bulundu ($p<0.001$) (Tablo 7a, 7b).

Tablo 7a: Fototerapi öncesi ve sonrası direkt ve indirekt bilirubin değerlerinin karşılaştırılması

	Gruplar		t	p
	Fototerapi Öncesi n =20 (ort.± SS)	Fototerapi Sonrası n =20 (ort.± SS)		
Direkt bilirubin	1.23±0.27	1.11±0.35	1.3	>0.05
İndirekt bilirubin	19.3±3.2	12.6±2.1	7.6	<0.001

Tablo 7b: Fototerapi öncesi hasta ve kontrol grupları arasında direkt ve indirekt bilirubin değerlerinin karşılaştırılması

Değişkenler	Gruplar		t	p
	Fototerapi Öncesi	Kontrol		
	n =20 (ort.± SS)	n =20 (ort.± SS)		
Direkt bilirubin	1.11±0.35	1.10±0.17	0.1	>0.05
İndirekt bilirubin	19.3±3.2	12.4±1.7	8.5	<0.001

- *Fototerapi sonrasında*, yenidoğanlardaki indirekt bilirubin düzeylerinin, yaş grupları için fizyolojik sınırlar olan kontrol grubu düzeylerine indiği gözlemlendi. *Fototerapi sonrası* indirekt bilirubin düzeyleri ile, *kontrol grubu* indirekt bilirubin düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık izlenmedi (p=0.764) (**Tablo 10c**).

Tablo 7c: Fototerapi sonrası hasta ve kontrol grupları arasında direkt ve indirekt bilirubin değerlerinin karşılaştırılması

Değişkenler	Gruplar		t	p
	Fototerapi Sonrası	Kontrol		
	n =20 (ort.± SS)	n =20 (ort.± SS)		
Direkt bilirubin	1.23±0.27	1.10±0.17	1.8	>0.05
İndirekt bilirubin	12.6±2.1	12.4±1.7	0.3	>0.05

- Direkt bilirubin düzeyleri; *fototerapi öncesi*, *fototerapi sonrası* ve *kontrol grupları* arasında farklılık göstermedi (p>0.05) (**Tablo 7a, 7b, 7c**).

Fototerapi öncesi, fototerapi sonrası ve kontrol grupları comet parametreleri açısından karşılaştırıldığında (Tablo 8a, 8b, 8c);

- Hastaların *fototerapi öncesi* DNA hasar düzeylerinin, her üç comet parametresiyle de gösterildiği gibi *kontrol grubuna* kıyasla oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. Bu yükseklikler bakılan tüm parametreler

için (kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA %'si) belirgin istatistiksel anlamlılık göstermekteydi ($p<0.001$) (**Tablo 8a**).

Tablo 8a: Fototerapi öncesi comet parametrelerinin, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırılması

Parametreler	Gruplar		P
	Fototerapi Öncesi n =20	Kontrol n =20	
Kuyruk uzunluğu (ort.± SS)	23.5±16.3	3.0±2.9	<0.001
Kuyruk momenti median (min-max)	7.41 (0.97-40.7)	0.25 (0.03-3.22)	<0.001
Kuyruk DNA %'si (ort.± SS)	33.0±12.1	10.9±4.5	<0.001

- İndirekt hiperbilirubinemi tanısı nedeni ile fototerapi uygulanan yenidoğanlarda *fototerapi sonrasında*, hücrelerin kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA %'lerinin *fototerapi öncesine* göre belirgin şekilde azaldığı ($p<0.001$) (**Tablo 8b**), hatta *kontrol grubu* değerlerine ulaşmış olduğu saptandı.

Tablo 8b: Fototerapi öncesi ve sonrası comet parametrelerinin karşılaştırılması

Parametreler	Gruplar		p
	Fototerapi Öncesi n =20	Fototerapi Sonrası n =20	
Kuyruk uzunluğu (ort.± SS)	23.5±16.3	3.2±1.8	<0.001
Kuyruk momenti (ort.± SS)	9.6±9.6	0.6 ±0.5	<0.001
Kuyruk DNA %'si (ort.± SS)	33.0±12.1	10.7±3.7	<0.001

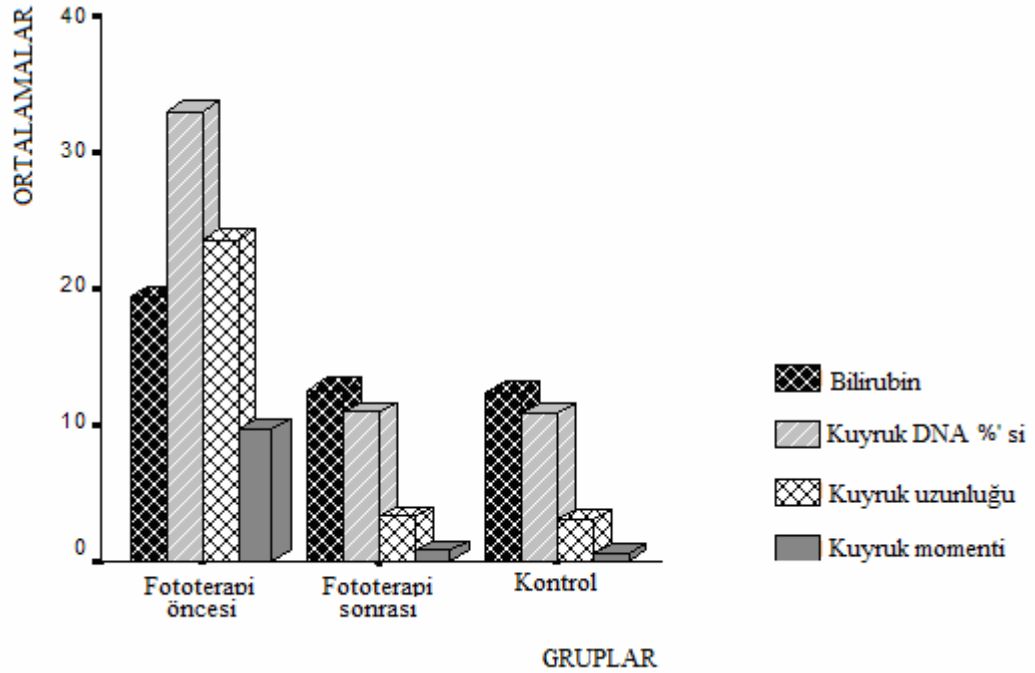
- Hastalarda *fototerapi sonrası* kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA %'leri *kontrol grubu* ile karşılaştırıldığında, kontrol grubu comet skorlarının *fototerapi sonrasına* göre hafifçe daha düşük olduğu bulundu. Ancak bu düşüklükler istatistiksel açıdan anlamlı

değildi. Kuyruk uzunluğu için $p=0.24$; kuyruk momenti için $p=0.15$; kuyruk DNA %'si için $p=0.38$ bulundu.

Tablo 8c: Fototerapi sonrası comet parametrelerinin, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırılması

Parametreler	Gruplar		p
	Fototerapi Sonrası n =20	Kontrol n =20	
Kuyruk uzunluğu (ort.± SS)	3.2±1.84	3.0±2.9	>0.05
Kuyruk momenti median (min-max)	0.38 (0.09-1.98)	0.25 (0.03-3.22)	>0.05
Kuyruk DNA %'si (ort.± SS)	10.7±3.7	10.9±4.5	>0.05

Şekil 11'de fototerapi öncesi, fototerapi sonrası ve kontrol gruplarına ait serum bilirubin değerleri ile comet skorları arasındaki ilişki gösterilmektedir.



Şekil 11:Gruplara ait serum indirekt bilirubin değerleri ve comet parametreleri skorları

Bazı sarılıklı hastalara ait comet tekniği ile yürütülmüş DNA'ların fototerapi öncesi ve sonrası çekilmiş fotoğrafları ve comet skorları Şekil 12'de gösterilmektedir.



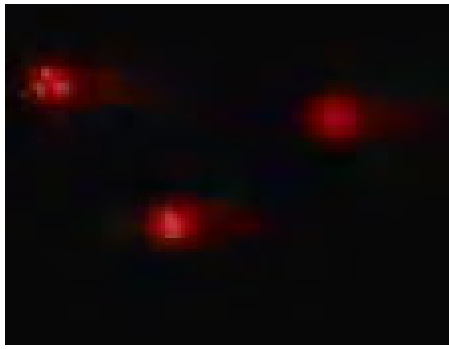
6a. Fototerapi öncesi

Kuyruk uzunluğu:45
Kuyruk momenti:27.61
Kuyruk DNA %'si:55.12



6b. Fototerapi sonrası

Kuyruk uzunluğu:3.36
Kuyruk momenti:0.26
Kuyruk DNA %'si:6.47



20a. Fototerapi öncesi

kuyruk uzunluğu:20.76
Kuyruk momenti:6.01
Kuyruk DNA %'si:28.93

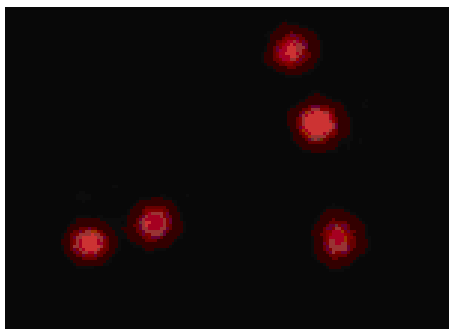


20b. Fototerapi sonrası

Kuyruk uzunluğu:1.65
Kuyruk momenti:0.19
Kuyruk DNA %'si:11.69

Şekil 12. Sarılıklı yenidoğanların comet tekniği ile yürütülmüş lenfosit DNA'larına ait fototerapi öncesi ve sonrası görüntüleri ve comet skorları

Kontrol grubunda yer alan yenidoğanlara ait, comet tekniği ile yürütülmüş lenfosit DNA'larının görüntüleri **Şekil 13'**de gösterilmektedir.



Kontrol 4

Kuyruk uzunluğu:3.28
Kuyruk momenti:0.68
Kuyruk DNA %'si:12.44



Kontrol 5

Kuyruk uzunluğu:2.64
Kuyruk momenti:0.23
Kuyruk DNA %'si:8.68

Şekil 13. Kontrol grubundan iki yenidoğana ait comet tekniği ile yürütülmüş lenfosit DNA'larının görüntüleri ve comet skorları

Fototerapi öncesi, fototerapi sonrası ve kontrol grupları plazma katalaz aktiviteleri açısından karşılaştırıldığında (Tablo 9a, 9b, 9c);

- Hastaların *fototerapi öncesi* plazma katalaz aktiviteleri, *fototerapi sonrasına* göre istatistiksel açıdan oldukça yüksek bulundu ($p<0.001$) (Tablo 9a).

Tablo 9a: Fototerapi öncesi ve sonrası plazma katalaz aktivitelerinin karşılaştırılması

Değişken	Gruplar		t	p
	Fototerapi Öncesi	Fototerapi Sonrası		
	n =20 (ort.± SS)	n =20 (ort.± SS)		
Katalaz aktivitesi (kU/L)	150.3±47.5	64.9±18.5	5.1	<0.001

- Hastalar *fototerapi öncesi* plazma katalaz aktiviteleri açısından *kontrol grubu ile karşılaştırıldığında*, kontrol grubu plazma katalaz aktivitelerinin belirgin miktarda daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu düşüklük istatistiksel açıdan da anlamlıydı ($p<0.001$).

Tablo 9b: Fototerapi öncesi ve kontrol grupları arasında plazma katalaz aktivitelerinin karşılaştırılması

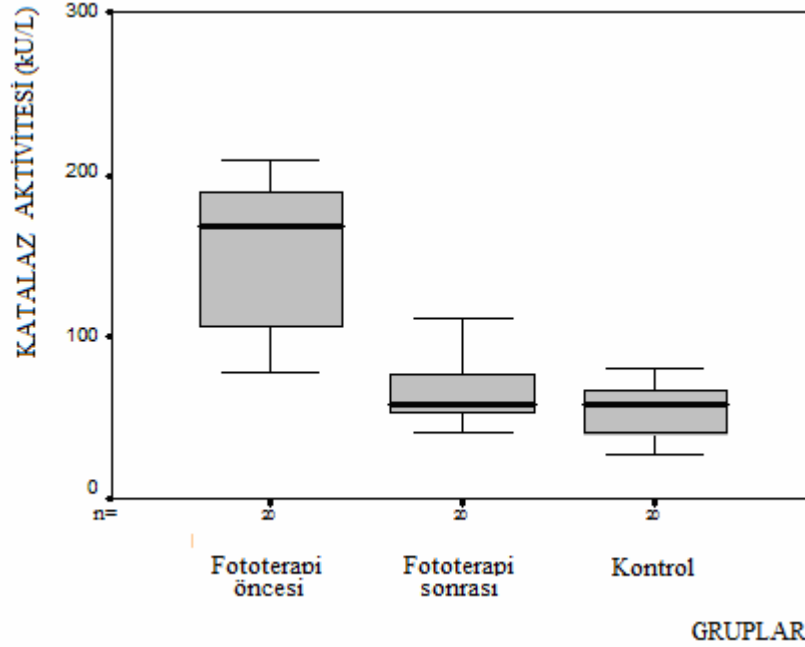
Parametre	Gruplar		t	p
	Fototerapi Öncesi	Kontrol		
	n =20 (ort.± SS)	n =20 (ort.± SS)		
Katalaz aktivitesi (kU/L)	150.3±47.5	55.0±16.3	8.5	<0.001

- Hastalar *fototerapi sonrası* plazma katalaz aktiviteleri açısından *kontrol grubu ile karşılaştırıldığında* ise, kontrol grubu plazma katalaz aktivitelerinin *fototerapi sonrasına* göre hafifçe daha düşük olduğu bulundu. Ancak bu düşüklük istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p=0.6$).

Tablo 9c: Fototerapi sonrası ve kontrol grupları arasında plazma katalaz aktivitelerinin karşılaştırılması

Parametre	Gruplar		t	p
	Fototerapi Sonrası n =20	Kontrol n =20		
	(ort.± SS)	(ort.± SS)		
Katalaz aktivitesi (kU/L)	64.9±18.5	55.0±16.3	1.8	>0.05

Şekil 14'te fototerapi öncesi, sonrası ve kontrol gruplarına ait plazma katalaz aktivitesi düzeyleri arasındaki ilişki gösterilmektedir.



Şekil 14: Fototerapi öncesi, sonrası ve kontrol gruplarına ait plazma katalaz aktivitesi düzeyleri.

İndirekt hiperbilirubinemi olan yenidoğanların, fototerapi öncesi ve sonrası bilirubin değerleri ile diğer değişkenler arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılan korelasyon analizlerinde (Tablo 10);

- Fototerapi öncesi ve sonrası bilirubin değerleri ile, fototerapi öncesi ve sonrası comet skorları ve plazma katalaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 10. Hiperbilirubinemisi olan bebeklerin fototerapi öncesi ve sonrası bilirubin değerleri ile diğer değişkenler arasındaki ilişki

Değişkenler	Fototerapi Öncesi		Fototerapi Sonrası	
	Bilirubin (n=20)		Bilirubin (n=20)	
	r	p	r	p
Kuyruk uzunluğu	0.19	0.41	0.26	0.26
Kuyruk momenti	0.18	0.42	0.30	0.19
Kuyruk DNA %'si	0.23	0.31	0.25	0.28
Katalaz	0.07	0.75	0.24	0.29

5. TARTIŞMA

Oksidatif stres, prooksidant/antioksidant dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen ve çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllerde hasar oluşumuna neden olan bir süreçtir. Bu dengedeki bozulma sonucu ROM oluşumunda artma, antioksidant enzim düzeylerinde azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması, oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır (6,7). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, düşük düzeylerdeki hasar sağlıklı bireylerde tamir edilebilebilirken, düzeltilemeyen hasarlar sonucunda çeşitli mutasyonlar, maligniteler veya apoptozis gelişebilir (8).

DNA hasarı sonucu canlılarda meydana gelen genetik değişikliklere genotoksisite denmektedir. 1970'lerden günümüze kadar farklı birçok *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testi geliştirilmiştir. Work-group of European Union (EU), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) ve en son olarak Work-group of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), bir grup standart testleri tanımlamışlardır (82,96). Comet tekniği de son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır ve bu standart genotoksisite testleri arasında yerini almıştır.

Comet tekniği diğer genotoksisite çalışmaları ile karşılaştırıldığında, düşük düzeyde DNA hasarı tespitinde oldukça hassas, az miktarda numune ile çalışılabilen,

düşük maliyetli ve nispeten kolay uygulanabilir bir testtir (82,84,86,87,89). Bu nedenle bu çalışmada DNA hasarını tespit etmek amacıyla comet tekniğini kullanıldı. CV değerleri kuyruk uzunluğu için % 11.15, kuyruk DNA % 'si için % 17.43, kuyruk momenti için % 16.91 bulundu. Bu sonuçlar Smith ve ark.nın (97) bulmuş oldukları % 22'lik CV değerleri ile karşılaştırılabilir değerlerdir.

Çeşitli antioksidant enzim düzeylerinde yaşa bağlı değişimler ve referans aralıkları belirlenmiştir. Örneğin katalaz aktivitesi yaş ilerledikçe artış göstermektedir (98). Sağlıklı kişilerde comet ölçüm parametrelerine ait ise net bir referans aralığı bildirilmemiştir (99).

Neonatal sarılık hayatın ilk haftasında tüm yenidoğanların yaklaşık %65-70'inde görülmektedir. Fizyolojik sarılık sınırlarının aşıldığı indirekt hiperbilirubinemi tedavisinde, tek başına veya diğer tedavilerle birlikte en sık kullanılan tedavi seçeneği fototerapidir. Bu çalışmada, fototerapi ve yüksek indirekt bilirubin düzeylerinin, muhtemel DNA hasarı yapıcı etkileri alkali comet tekniği ile araştırıldı. Fototerapiye bağlı sonraki yıllarda gelişebilecek kanserojenik veya genotoksik etkilerin, hassas bir genotoksisite testi olan comet tekniğiyle incelenmesi amaçlandı. Ayrıca, bir oksidoredüktaz olan ve oksidatif hasara reaktif olarak salınabilen bir enzim olan katalazın, plazma aktivitesi ölçüldü.

Literatür incelemesinde, sarılıklı yenidoğanlarda yüksek bilirubin düzeylerinin ve fototerapinin, oksidatif hasar yapıcı etkilerini comet tekniği ile araştıran başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Aynı zamanda neonatal sarılık tedavisinde günümüzde yaygın şekilde kullanılmakta olan fototerapi tedavisinin, yenidoğanlarda oksidatif DNA hasarı yapıcı etkileri ve ileriki yıllarda gelişebilecek yan etkileri ile ilgili kesin bir bilgiler açık değildir.

Bilirubin DNA hasarındaki rolü

Farklı düzeylerde serum bilirubin konsantrasyonlarının, oksidatif hasar yapıcı etkileri ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Yüksek bilirubin düzeyleri varlığında bilinen kesin toksik etkilere rağmen, orta derecede yüksek bilirubin düzeyleri ile ilgili yararlı ve zararlı etkilere dair bilgiler yetersiz ve çelişkilidir (100).

Son yıllarda hafif ve orta derecede yüksek serum bilirubin düzeylerinin oksidatif stres kaynaklı hastalıklarla birlikteliğinin daha az olduğundan bahsedilmektedir (101). Bilirubin antioksidant özelliklerinden bahseden çalışmaların çoğunluğu erişkinler üzerinde yapılmış çalışmalardır. Yenidoğanlarda

ise hangi düzeylerde serum bilirubinin oksidant/antioksidant özellikler gösterdiği hala araştırma konusudur.

Bu çalışmada, non-hemolitik indirekt hiperbilirubinemi nedeniyle yenidoğan servisine yatırılan term bebeklerin comet skorlarının, fototerapi öncesinde oldukça yüksek olduğu belirlendi. Fototerapi alan sarılıklı yenidoğanlarda her üç comet parametresiyle de gösterildiği gibi DNA hasarı derecesinin, tedavi sonrasında belirgin miktarda azaldığı, hatta kontrol grubu değerlerine ulaştığı görüldü. Ayrıca istatistiksel açıdan anlamlı bir korelasyon bulunmamasına rağmen **Şekil 11**'de de gösterildiği gibi, bilirubin düzeylerindeki azalmayla birlikte DNA hasarı derecesinin de azaldığı gözlemlendi. Bebeklerde fototerapi sonrasında DNA zincir kırık miktarındaki azalmanın, serum bilirubin düzeylerindeki azalmaya bağlı olduğu düşünüldü. Böylece, fizyolojik sınır üzerindeki orta derecede yüksek bilirubin düzeylerinin (kan değişimine ihtiyaç duyulmayan, fototerapi ile tedavi edilebilir) güçlü oksidantlar olduğu söylenebilir. Bu bulgular, bilirubinin oksidatif hasar oluşturmadaki rolünü araştıran daha önceki birkaç çalışmanın sonuçları ile uyum gösterirken (102, 103), bilirubinin antioksidant özelliklerinden bahseden çeşitli hayvan modeli çalışmaları (104) ve *in vitro* çalışmalarla (105-108) uyumsuzdur.

İlk kez Stocker ve ark. (106) mikromolar konsantrasyonda bilirubin düzeylerinin, linoleik asidin ootoksidasyonunu önlemede vitamin E'den daha güçlü olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca indirekt hiperbilirubinemili neonatal Gunn ratların oksidatif hasara daha dirençli oldukları bulunmuştur (104). Heyman ve ark. (109) ile Yeo ve ark. (110) yüksek serum bilirubin düzeyleri olan infantlarda, prematür retinopatisi insidansının daha az olduğunu belirtirken, aynı bulgulara diğer çalışmalarda varılamamıştır (111, 112).

Wiedemann ve ark. (113) *in vitro* şartlarda neonatal kan numunelerinin erişkin plazmasına göre oksidatif strese daha dirençli olduklarını, bu durumun erişkin plazmasına göre daha yüksek olan bilirubin ve daha düşük olan serbest yağ asidi seviyelerinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Dani ve ark. (102), bilirubinin *in vitro* şartlarda antioksidant özellik gösterdiğini, *in vivo* şartlarda böyle bir etkisinin olmadığını belirtmektedirler. İnfantlarda total bilirubin düzeyleri azaldıkça, total hidroperoksit düzeylerinde azalma ve protein -SH gruplarında artış olması, oksidatif stres düzeyinin bilirubin düzeyleri ile aynı yönde değişim gösterdiğinin kanıtıdır (103). Buna göre Dani ve

ark.'nın çalışmasında, bilirubin antioksidant özelliklerinden değil, tam tersine oksidatif hasar yapıcı etkisinden bahsedilmektedir. Bizim çalışmamızda, kontrol grubuyla kıyaslandığında hiperbilirubinemi olan fototerapi almamış yenidoğanlarda comet skorlarının daha yüksek olduğu bulundu. Bu bulgulara göre bilirubin, hasta grubumuza ait yüksek değerlerinde ($19,3 \pm 3,22$ mg/dL) antioksidant özelliğinin olmadığı söylenebilir.

Mireles ve ark. (108) yaptıkları bir *in vitro* çalışmada 30 mg/dL'nin üzerindeki bilirubin konsantrasyonlarında protein ve lipid oksidasyonunun arttığını, eritrosit membranı sağlamlığının değiştiğini gösterdiler. Aynı çalışmada, serum bilirubin/albumin oranının birin üzerinde olduğu durumlarda, protein karbonil içeriğinde artma ve sferosit oluşumu ile gösterildiği gibi oksidatif etkiler meydana geldiği tespit edildi. Ayrıca eritrosit membran hasarını gösteren Na-K ATP'az ve G6PD aktivitelerinin bilirubin/albumin oranındaki artışa zıt olarak azaldığı bulundu. Ancak biz bu çalışmada, sarılıklı yenidoğanlarda fototerapi ile tedavi edilebilir, orta derecede yüksek serum bilirubin düzeylerinin de (hasta grubunun ortalama bilirubin konsantrasyonu $19,3 \pm 3,22$ mg/dL), DNA zincir kırıklarına neden olduğunu ve dolayısıyla oksidatif DNA hasarına neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Membran bağımlı bilirubin ışığa duyarlıdır. Fototerapi ile salınan ışık enerjisini yakalar ve atomları bir üst enerji düzeyine geçer. Böylece fotoeksite olan bilirubin, enerjisini moleküler oksijene aktarır. Enerji kazanan oksijen, dokuları moleküler düzeyde okside edebilen ve oldukça reaktif radikaller oluşturan singlet oksijene dönüşür (2, 114, 115). Özet olarak fototerapi ile, doğrudan uyarılmış molekülün kendisi veya dolaylı yoldan oluşturulan singlet oksijen moleküllere hasar verebilmektedir (15). Bizim çalışmamızda ise, sarılıklı bebeklerdeki fototerapi öncesi yüksek bilirubin düzeylerinin, fototerapi sonrası ve kontrol grubuna göre daha fazla DNA hasarı yaptığı belirlendi. Bu durum, bilirubin fototerapi sonrası meydana gelen fotoeksite formundan ve oluşturduğu ürünlerinden daha fazla oksidatif etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Preterm infantlarda sarılık görülme ihtimali termlere göre daha yüksektir. Bu nedenle de sarılıklı bebeklerde oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmaların çoğu preterm infantlarda gerçekleştirilmiştir. Sarılıklı preterm infantlarda değerlendirilen çeşitli oksidatif ve antioksidatif enzim düzeyleri ile ilgili varılan sonuç, bu infantlarda total nitrit konsantrasyonu gibi oksidatif düzeylerinin

yüksek, GSH-Px, katalaz, süperoksid dismutaz (SOD) gibi çeşitli antioksidantların ise düşük olduğu yönündedir (116, 117). Ancak bu çalışmalarını bizim çalışmamızla karşılaştırmanın doğru olmayacağını düşünmekteyiz. Prematüriteye bağlı antioksidant savunma sisteminin yeterince gelişmemiştir, dolayısıyla da oksidatif hasar ihtimali daha yüksektir. Bu nedenle bize göre term ve preterm bebeklerde yapılan oksidatif stres çalışmalarını ayrı ayrı değerlendirmek gerekir.

Fototerapinin DNA hasarındaki rolü

Fototerapinin uzun süreli ve ileriki yıllarda ortaya çıkabilecek yan etkilerini bildiren yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır (118,119).

Yenidoğan sarılığı tedavisinde görünür ışık dalga boylarında (420-450 nm) uygulanan fototerapiye bağlı yan etkilerin, minör klinik önemi olduğu ileri sürülmektedir (120). Buna rağmen fototerapinin hücre membranı üzerinde oksidatif etkilerinin olabileceği (3) ve buna bağlı lipid peroksidasyonu (2,4,15), DNA oksidasyonu (5,18) gibi, gelişebilecek çeşitli yan etkilerine ilişkin kanıtlar mevcuttur. Sonuç olarak fototerapinin muhtemel yan etkilerinden biri de genetik ile ilgili olanlardır ve çeşitli hücre kültür çalışmalarında DNA zincir kırıkları ve mutasyonlar bildirilmiştir (14,121).

Gathwala ve ark. (2,4) güvenilir bir tedavi şekli olan fototerapinin, bir fotodinamik stres kaynağı olduğunu ve lipid peroksidasyonunu artırabileceğini, yenidoğanlardaki pek çok ciddi hastalığın oksidatif hasar ve lipid peroksidasyonundan kaynaklandığını, dolayısıyla fototerapi endikasyonlarına ve tedavi yoğunluğuna bir miktar daha dikkat çekilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Christensen ve ark. (14) bilirubin varlığında ve yokluğunda, fototerapi uygulamasının insan kültür hücrelerinde oluşturdukları DNA hasarı yapıcı etkilerini araştırmışlardır. TMG-1 hücre kültürü kullanılarak, hücreler farklı dozlarda bilirubin konsantrasyonlarına ve farklı lambaların kullanıldığı fototerapiye maruz bırakıldıktan sonra, alkali elüsyon tekniği ile DNA zincir kırıkları ölçülmüştür. Bu çalışmanın bulgularına göre, bilirubin yokluğunda fototerapinin, hücrelerin DNA'larında kırıklara neden olduğu tespit edilmiştir. Bilirubin varlığında ise fototerapi sonrası uzun ömürlü toksik foto-ürünler oluşmuş ve DNA zincir kırıkları sıklığı daha da artmıştır.

Tozzi ve ark. (15) yaptıkları bir çalışmada, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda fototerapiye bağlı olarak eritrosit membranında görülebilecek fotodinamik etkileri

araştırmışlardır. Bu çalışmada, sarılıklı yenidoğanların eritrosit membranlarının fonksiyonel yapılarındaki değişiklikler hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır. *İn vitro* çalışmalarda bilirubin yokluğunda taze eritrositlerde fototerapiye bağlı lipid peroksidasyonu olmazken, bilirubin varlığında (300 µmol/L) fototerapi miktarı ile orantılı olarak eritrosit membranı ATP'az aktivitesinde azalma, MDA düzeyinde artma bulunmuştur. Membran lipid tabakası dekompozisyonundan ve ATPaz inaktivasyonundan, fototerapi esnasında açığa çıkan serbest radikaller sorumlu tutulmuştur. *İn vitro* deneylerde gösterilen bu korelasyon, yine aynı çalışmaya ait *in vivo* şartlarda ise tespit edilememiştir. Sonuç olarak bu çalışmalar arasındaki fotodinamik etki farklılığının, *in vivo* şartlarda ışığın bir miktarının, deri ve deri altı dokularda kalmasından kaynaklandığı bildirilmektedir.

Farklı *in vitro* çalışmalarda fototerapinin DNA hasarı yapıcı etkileri gösterilmiş olmasına rağmen, fototerapi uygulanan bebeklerde bu etkiye bağlı değişikliklerin ciddi olmadığı kesindir. Rosenstein ve ark. (121) 1958 yılından bu yana kullanılan fototerapiye ilişkin, *in vitro* DNA hasarı yapıcı etkilerini vurgulamakla birlikte, *in vivo* yan etkilerinin ya göz ardı edilebilecek derecede az, ya da uzun bir latent döneme sahip olduğunu belirtmektedirler.

Görünür veya UV ışığın organik bileşikler tarafından absorpsiyonu genellikle kimyasal olarak kısa ömürlü uyarılmış moleküllerin oluşumuna neden olur. Ancak bazı durumlarda, daha stabil uyarılmış moleküller meydana gelir, bunlar direkt veya indirekt mekanizmalarla DNA hasarına neden olurlar (122). Bu çalışmada fototerapi sonrası DNA hasarının fototerapi öncesine göre belirgin miktarda azaldığı tespit edildi. Bu durumun kullanılan dalga boylarında fototerapi sonrası meydana gelen uyarılmış kimyasal moleküllerin kısa ömürlü ürünler olmasından veya bu ürünlere bağlı değişimlerin DNA onarım mekanizmaları ile hızla düzeltilmesinden kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca fototerapi sonrası oluşan toksik fotoürünlere bağlı etkiler, *in vivo* koşullarda yenidoğan dokularındaki antioksidantlar tarafından da baskılanmış olabilir.

Literatürde bilirubin ve fototerapinin DNA kırığı oluşturucu etkisini araştıran çalışma sayısının azlığına rağmen, oksidant/antioksidant enzim düzeylerini araştıran pek çok çalışma mevcuttur. Sarılığın oksidatif stresi artırdığı, azalmış hücrel glutatyon, glutatyon peroksidaz (GPx) ve SOD düzeyleri ile gösterilmiştir (115, 123). Buna rağmen sarılıklı yenidoğanlardaki fototerapi öncesi ve sonrası antioksidant status henüz net değildir. Son yıllarda preterm infantlarda yapılan bir

çalışmada, plazma bilirubin düzeylerinde azalmanın, plazma antioksidant enzim kapasitesinde artış ve oksidatif strese azalma ile birlikte olduğu bulunmuştur (13). Dahiya ve ark. (124) ise hiperbilirubinemik infantlarda kontrol grubuna göre daha yüksek bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve bir antioksidant olan SOD düzeyleri bildirmişlerdir. Aksine, Kumar ve ark. (125) 2006 yılında yayınlanan çalışmalarında, infantlarda bilirubin düzeylerinin serum MDA düzeyleri ile negatif, SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz düzeyleri ile ise pozitif ilişkili olduğunu ve bu durumun bilirubinin güçlü antioksidant özelliğinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Farklı çalışmalarda ise fototerapi sonrası meydana gelen eritrosit membran hasarı, MDA (3,13,15) ve tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) (4) yüksekliğinden dolayı fototerapinin oksidatif stres kaynağı olduğu ileri sürülmüştür. Aksu ve ark. (126) ise fototerapi öncesi ve sonrası, vitamin E ve antioksidant enzim (SOD, GPx, katalaz,) aktiviteleri arasında fark görmemişlerdir. Sonuçta hiperbilirubinemisi olan yenidoğanlara uygulanan fototerapinin, oksidatif hasar yapıcı etkisi ile ilgili bilgiler çelişkilidir.

Bilirubin ve fototerapiye bağlı DNA hasarında katalazın rolü

In vitro şartlar altında fototerapi uygulamaları esnasında bilirubin, potansiyel zararlı etkileri olabilecek fotokimyasal reaksiyonlar oluşturabilir. Bu sitotoksik fotoürünlerin peroksitler olduğu Rosenstein ve ark. (16) tarafından gösterilmiştir. Rosenstein ve ark normal insan fibroblastlarını, eksojen olarak ekledikleri 1-100 µg/mL bilirubin varlığında ve yokluğunda görünür ışığa (420-490 nm) maruz bırakarak, DNA zincir kırık miktarını ölçmüşlerdir. Kırık miktarının bilirubin varlığında veya irradiye bilirubinle hücreleri karanlıkta bekletmekle arttığını gözlemlemişlerdir. Ancak irradiye bilirubin (fototerapi uygulanmış bilirubin) varlığında ortama bir oksidoredüktaz olan katalaz eklendiğinde, DNA zincir kırığının gelişmediğini gösterdiler. İrradiye bilirubin çözeltisine bağlı DNA hasarının, H₂O₂ veya diğer peroksitlerin oluşumundan kaynaklandığını belirttiler (119).

Toksik fotoürünlerin muhtemelen peroksitler olması nedeniyle bu ürünlere bağlı gelişen DNA zincir kırık miktarları da plazma katalaz aktivitesinden etkilenmektedir. *In vivo* yüksek katalaz aktivitesi, bilirubin fotoürünlerinin etkilerini azaltabilir (16).

Bu nedenle bu çalışmada, fototerapi öncesi, sonrası ve kontrol gruplarında plazma katalaz aktiviteleri karşılaştırıldı. Sarılıklı yenidoğanlarda yüksek plazma katalaz aktiviteleri belirlenirken, fototerapi sonrası aktivitelerde anlamlı düşme tespit edildi. Sarılıklı bebeklerde katalaz aktivitesindeki bu yüksekliğin, ortamdaki yüksek H₂O₂ düzeylerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Katalaz aktivitesi sellüler H₂O₂ düzeyi arttıkça, artmaktadır (95). Yüksek katalaz aktivitesi sayesinde, muhtemelen fototerapi sonrasında gerçekleşen fotokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşmuş peroksitler, su ve oksijene yıkılarak DNA oksidasyonu engellenmiştir.

Araştırma amaçlı yenidoğanlara ek invaziv girişimlerde bulunulmadığından ve rutin incelemeler maksadıyla toplanan numune hacimleri yetersiz olduğundan, bu çalışmada diğer antioksidant enzim düzeyleri çalışılmadı. Daha sonraki yıllarda yapılacak olan çalışmalarda, çeşitli antioksidant enzim düzeylerinin ve comet skorlarının birlikte değerlendirilmesi, yenidoğan sarılığında fototerapi kullanım sınırları ile ilgili yeni öngörüler sunabilir.

Sonuç olarak fototerapi ışığı cilt ve dokulardan süzülerek geçtiği için, *in vivo* şartların *in vitro* şartlardan farklı olduğu açıktır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre fototerapi almış infantlardaki DNA hasarı derecesi, kontrol grubu yenidoğanlarından farklı bulunmadı. Böylece, *in vivo* şartlarda fototerapinin DNA oksidasyonuna neden olmadığı söylenebilir.

Ayrıca fototerapinin, daha önce yayınlanan çeşitli çalışmalarda olduğu gibi bilirubinin genotoksik etkilerini artırmadığı, aksine fototerapi ile azalan serum bilirubin düzeyleri sayesinde DNA hasarı derecelerinin de anlamlı biçimde azaldığı görülmüştür. Fototerapinin bilinen toksik etkileri bu çalışmada, hiperbilirubinemik yenidoğanlarda bulunan yüksek katalaz aktivitesi sayesinde engellenmiş olabilir.

Kan değişimine ihtiyaç duyulmadan tedavi edilebilir olan orta derecede yüksek bilirubin düzeyleri, DNA ve dolayısıyla pek çok diğer hücresel bileşen için güçlü prooksidanttır ve fototerapi ile en kısa sürede düzeyleri azaltılmalıdır. Fototerapinin uzun süreli yan etkilerini araştıran, az sayıdaki takip çalışmalarında gözlenen masumiyetini bizim çalışma bulgularımız da desteklemektedir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, sarılıklı yenidoğanlarda yüksek bilirubin düzeylerine ve tedavi amaçlı kullanılan fototerapiye bağlı gelişebilecek muhtemel genotoksik etkiler, alkali comet tekniği ile çalışıldı ve şu sonuçlara varıldı:

- ✓ Metodun hassasiyetini ve elektroforetik doğruluğunu göstermek amacıyla yapılan radyosensitivite çalışmalarında, sağlıklı üç kişinin kanından izole edilen lenfositler sırasıyla 0, 1, 2, 3, 4, 5 gy dozlarında gamma ışını ile irradiye edildikten sonra comet skorlamaları yapıldı. Uygulanan radyasyon dozuyla orantılı olarak lenfosit DNA hasarının arttığı belirlendi ($r^2=0.989$).
- ✓ Fototerapi öncesi, fototerapi sonrası ve kontrol grupları arasında yaş, cinsiyet, Apgar skorları, doğum ağırlığı, doğum şekli, hemoglobin ve direkt bilirubin düzeyleri açısından farklılık gözlenmedi ($p>0.05$).
- ✓ Sarılıklı bebeklerde fototerapi öncesi indirekt bilirubin değerlerinin, fototerapi sonrası ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.001$).

- ✓ İndirekt hiperbilirubinemili tüm yenidoğanlara beslenme ve temizlenme zamanları dışında sürekli fototerapi uygulandı. Ortalama fototerapi süresi 55.7 ± 21.7 (min 24 - max 96) saat bulundu.
- ✓ Fototerapi öncesinde ölçülen comet skorlarının, fototerapi sonrası azaldığı tespit edildi (kuyruk uzunluğu, kuyruk momentleri ve kuyruk DNA %'leri için $p < 0.001$). Fototerapi sonrasında bu değerlerin kontrol grubu düzeylerine yaklaştığı görüldü ($p > 0.05$).
- ✓ Fototerapi öncesi plazma katalaz aktivitesi, fototerapi sonrası ve kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p < 0.001$). Fototerapi sonrası ve kontrol grupları arasında katalaz aktiviteleri açısından farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$).

Bu sonuçlara göre, *in vivo* şartlarda yüksek bilirubin düzeylerinin DNA zincir kırıklarına neden olduğu, fototerapi sonrasında kırık miktarının belirgin derecede azaldığı gözlemlendi; dolayısıyla fototerapinin DNA hasarı yapıcı etkisinin bulunmadığı kararına varıldı. Fototerapi öncesi yüksek katalaz düzeylerinin, fototerapi ile oluşabilecek toksik fotoürünlerin zararlı etkilerinden korumuş olabileceği düşünüldü.

Yüksek bilirubin düzeylerinin neden olduğu oksidatif DNA hasarı onarılamadığı takdirde, maligniteden apoptozise kadar pek çok hastalığa neden olabilecek değişimler meydana gelebileceğinden, bu konuya hassasiyetle yaklaşılmalı ve fototerapi başlama sınırları tekrar gözden geçirilmelidir.

Daha sonraki çalışmalarda, fototerapi süresince günlük comet skorlamalarının yapılmasının ve birlikte DNA onarım enzimlerinin çalışılmasının, etkin bir tedavi protokolü oluşturmada faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Çoban A. Yenidoğanda Sarılık. In: Neyzi O, Ertuğrul T. Pediatri. 2. baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri 2002;418-20.
2. Gathwala G, Sharma S. Oxidative stress, phototherapy and the neonate. *Indian J Pediatr* 2000;67:805-8.
3. Ostrea EM, Cepeda EE, Fleury CA, Balun JE. Red cell membrane lipid peroxidation and hemolysis secondary to phototherapy. *Acta Paediatr Scand* 1985;74:378-81.
4. Gathwala G, Sharma S. Phototherapy induces oxidative stress in premature neonates. *Indian J Gastroenterol* 2002;21:153-4.
5. Vreman HJ, Wong RJ, Stevenson DK. Phototherapy: current methods and future directions. *Semin Perinatol* 2004;28:326-33.
6. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;17:1195-214.
7. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bio Essays* 2004;26:533-42.

8. Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35:159-69.
9. Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alfa-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1994;269:16712-9.
10. Gopinathan V, Miller NJ, Milner AD. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett* 1994;349:197.
11. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;235:1043-6.
12. Mireles LC, Lum MA, Dennery PA. Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes. *Pediatr Res* 1999;45:355-62.
13. Dani C, Martelli E, Bertini G, et al. Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:9-23.
14. Christensen T, Reitan JB, Kinn G. Single-strand breaks in the DNA of human cells exposed to visible light from phototherapy lamps in the presence and absence of bilirubin. *J Photochem Photobiol B* 1990;7:337-46.
15. Tozzi E, Tozzi-Ciancarelli MG, Di Giulio A, et al. *In vitro* and *in vivo* effects of erythrocyte phototherapy on newborns. *Biol Neonate*. 1989;56: 204-9.
16. Rosenstein BS, Ducore JM, Cummings SW. The mechanism of bilirubin-photosensitized DNA strand breakage in human cells exposed to phototherapy light. *Mutat Res* 1983;112:397-406.
17. Tietz, N. W. Specimen Collection and Processing; Sources of Biological Variation, Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Ed, W. B. Saunders, Philadelphia, PA, 1994.
18. Aslan D. Klinik Kimyada Temel İlkeler. Ankara: Palme Yayıncılık, 2005,601-7.
19. Küçüköçük Ş. Yenidoğan ve Hastalıkları. Ankara: Feryal Matbaa, 1994, 400-32.
20. Hansen TW. Treatment of neonatal jaundice. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2005; 3;125:594-8.
21. Burtis C.A, Ashwold E.R. Klinik kimyada temel ilkeler. Palme yayıncılık, 2005, 601-7.

22. Maisels MJ, Pathak A, Nelson NM, Nathan DG, Smith CA. Endogenous production of carbon monoxide in normal and erythroblastotic newborn infants. *J Clin Invest* 1971; 50:1-8.
23. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *Engl J Med* 2001;344:581-90.
24. Melton K, Akinbi HT. Neonatal jaundice. Strategies to reduce bilirubin-induced complications. *Postgrad Med* 1999;106:167-78.
25. Wintrobe MM, Lee GR. Wintrobe's Clinical hematology. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999;267-89.
26. Gartner LM, Herschel M. Jaundice and breastfeeding. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:389-99.
27. Connolly AM, Volpe JJ. Clinical features of bilirubin encephalopathy. *Clin Perinatol* 1990;17:371-9.
28. Ahlfors CE. Criteria for exchange transfusion in jaundiced newborns. *Pediatrics* 1994;93:488-94.
29. Levine RL, Fredericks WR, Rapoport SI. Clearance of bilirubin from rat brain after reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Pediatr Res* 1985;19:1040-3.
30. Amato MM, Kilguss NV, Gelardi NL, Cashore WJ. Dose-effect relationship of bilirubin on striatal synaptosomes in rats. *Biol Neonate* 1994;66:288-93.
31. Chuniaud L, Dessante M, Chantoux F, Blondeau JP, Francon J, Trivin F. Cytotoxicity of bilirubin for human fibroblasts and rat astrocytes in culture: effect of the ratio of bilirubin to serum albumin. *Clin Chim Acta* 1996;256:103-14.
32. Conlee JW, Shapiro SM. Development of cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: a quantitative light microscopic analysis. *Acta Neuropathol* 1997;93:450-60.
33. Gourley et al. Measurement of serum bilirubin in newborn infants: common clinical laboratory methods versus High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Pediatr Res* 1999; 45.
34. Ihara H. *In vitro* effects of light on serum bilirubin subfractions measured by routine methods. *Clin Chem* 1992;38:2124-9.
35. Malloy HT, Evelyn KA. *J Biol Chem* 1937;119: 481.

36. Doumas BT, Perry BW, Sasse EA, Straumfjord JV Jr. Standardization in bilirubin assays: evaluation of selected methods and stability of bilirubin solutions. *Clin Chem* 1973;19:984-93.
37. Practice parameter: management of hyperbilirubinemia in the healthy term newborn. *Pediatrics* 1994;94:558-62.
38. Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 16th ed. Philadelphia: Saunders, 2000:511-28.
39. Cashore WJ. Neonatal hyperbilirubinemia. In: Oski FA, *Principles and practice of pediatrics*. 2nd ed. Philadelphia J. B. Lippincott Company 1994:446-55.
40. Gardner LM. Neonatal Jaundice. *Pediatrics* 1994 ;15:422-31.
41. Maisels JM. Jaundice. In: Avery GB, Fletcher MA, Mac Donald MG, *Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn*. 4th ed, Philadelphia, JB. Lippincott Company. 1994:630-725.
42. Maisels MJ: Jaundice in a Newborn. *Contemp Pediatr* 2005;22:34.
43. Bhutani VK, Johnson L, Sivieri EM. Predictive ability of a pre-discharge hourspecific serum bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in healthy term and near term newborns. *Pediatrics* 1999;103:6.
44. American Academy of Pediatrics, Provisional Committee for Quality Improvement and Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Practice Parameter: Management of Hyperbilirubinemia in the Healthy Term Newborn. *Pediatrics* 1994;94:558-62.
45. Robertson NRC. Neonatal Jaundice. *Pediatrics* 1986;8:160-6.
46. Gartner LM, Herschel M. Jaundice and breastfeeding. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:389-99.
47. Adams JA, Hey DJ, Hall RT. Incidence of hyperbilirubinemia in breast vs formula fed infants. *Clinical Pediatrics* 1985;24:69-73.
48. Osborn LM, Reiff MI, Bolus R. Jaundice in the full-term neonate. *Pediatrics* 1984;73:520-5.
49. Schneider AP II. Breast milk jaundice in the newborn. A real entity. *JAMA* 1986;255:3270-4.
50. Mills JF, Tudehope D. Fiberoptic phototherapy for neonatal jaundice. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;CD002060.

51. Gartner LM, Herschel M. Jaundice and breastfeeding. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:389-99.
52. Poland RL. Breast-milk jaundice. *J Pediatr* 1981;99:86-8.
53. Brodersen R, Herman LS. Intestinal reabsorption of unconjugated bilirubin. *Lancet* 1963;1:1242.
54. Maisels MJ. Neonatal jaundice. In : Avery GB, ed. Neonatology, pathophysiology and Management of the Newborn, 2 th ed. Philadelphia JB Lippincott, 1981, pp 473-544.
55. Halomek LP, Stevenson DK. Neonatal Jaundice and Liver Disease. In Fanaroff AA, Martin RJ. Neonatal-Perinatal Medicine Vol 2. Disease of the fetus and infant 6th ed. St. Louis, USA; Mosby 1997;45:1365-9.
56. Hsai DY, Allen FH, Gellis SS, Diamond LK. Erythroblastosis fetalis. VIII. Studies of serum bilirubin in relation to kernicterus. *N Engl J Med* 1952;247:668-71.
57. Gartner LM, Herrarias CT, Sebring RH. Practice patterns in neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 1998;101:25-31.
58. Practice parameter: management of hyperbilirubinemia in the healthy term newborn. *Pediatrics* 1994;94:558-62.
59. Dobbs RH, Cremer RJ. Phototherapy. *Arch Dis Child* 1975;50:833.
60. Cremer RJ, Perryman PW, Richards DH. Influence of light on the hyperbilirubinemia of infants. *Lancet* 1958;1:1094.
61. Maisels MJ. Neonatal jaundice. In: Sinclair JC, Bracken MB, editor(s). Effective Care of the Newborn Infant. Oxford: Oxford University Press, 1992:507-19.
62. Mc Donagh AF Sunlight induced mutation of bilirubin in a long distance runner. *The New England J Med* 1986;314:121-2.
63. Dağoğlu T, Ovalı F. İndirekt hiperbilirubinemi. Neonatoloji. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd 2000;453-5.
64. Yurdakök M. Hiperbilirubinemide ışık ve ilaç tedavisi. *Katkı Pediatri Dergisi*. Ankara 1995;725-33.
65. Ebbesen F, Agati G, Pratesi R. Phototherapy with turquoise versus blue light. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:430-1.

66. Dicken P, Grant LJ, Jones S. An evaluation of the characteristics and performance of neonatal phototherapy equipment. *Physiol Meas* 2000;21:493-503.
67. Chang YS, Hwang JH, Kwon HN, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of new blue light emitting diode phototherapy compared to conventional halogen quartz phototherapy for neonatal jaundice. *J Korean Med Sci* 2005;20:61-4.
68. Pezatti M, Fusi F, Dani C et al. Changes in skin temperature of hyperbilirubinemic newborns under phototherapy: conventional versus fiberoptic device. *Am J Perinatol* 2002;19:439-44.
69. Lin WH, Chen SJ, Tang RB, Hwang B. Comparison of conventional phototherapy and fiberoptic phototherapy in the very-low-body-weight infants. *Acta Paediatr* 2001;42: 141-4.
70. Dani C, Bertini G, Martelli E et al. Effects of phototherapy on cerebral haemodynamics in preterm infants: is fiber-optic different from conventional phototherapy? *Dev Med Child Neurol* 2004;46:114-8.
71. Boo NY, Lee HT. Randomised controlled trial of oral versus intravenous fluid supplementation on serum bilirubin level during phototherapy of term infants with severe hyperbilirubinaemia. *J Paediatr Child Health* 2002;38:625.
72. Cohen AN, Ostrow JD. New concepts in phototherapy: Photoisomerization of bilirubin IX alfa and potential toxic effects of light. *Pediatrics* 1980;65:740-50.
73. Knobloch E, Hodr R. Metabolism of bilirubin and riboflavin in the course of phototherapy for hyperbilirubinemia in the newborns. *Czech Med* 1989;12:134-44.
74. Weichenthal M, Schwarz T. Phototherapy: how does UV work? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005;21:260-6.
75. Kielbassa C., Roza L., Epe B.. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 1997;18:811-6.
76. Brendler-Schwaab S, Czich A, Epe B, et al. Photochemical genotoxicity: principles and test methods. Report of a GUM task force. *Mutat Res* 2004;566:65-91.
77. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;17:1195-214.

78. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 1991;281:9-19.
79. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* 2004;26:533-42.
80. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291-8.
81. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.
82. Tice RR, Andrews PW, Singh NP. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci* 1990;53:291-301.
83. Tice RR, Agurell E, Anderson D et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206-21.
84. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet" assay. *Radiat Res* 1990;122:86-94
85. Collins A, Dusinska M, Franklin M et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 1997;30:139-46.
86. Lee RF, Steinert S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 2003;544:43-64.
87. Faust F, Kassie F, Knasmuller S et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2004;566:209-29.
88. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59.
89. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA

- damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 1994;307:261-71.
90. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, et al. 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 2003;18:45-51.
 91. O'Neill KL, Fairbairn DW, Standing MD. Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy. *Mutat Res* 1993;319:129-34.
 92. Luck H. Catalase. In: Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis* Verlag Chemie-GMBH, Weinheim, New York 1965, 885-994.
 93. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed. Weinheim, Verlag Chemie, 1983:273-85.
 94. Yasmineh WG, Kaur TP, Blazar BR, Theologides A. Serum catalase as marker of graft-vs-host disease in allogeneic bone marrow transplant recipients: pilot study. *Clin Chem* 1995;41:1574-80.
 95. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press. Inc, London 1999.
 96. 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 2003;18:45-51.
 97. Smith TR, Miller MS, Lohman KK, Case LD, Hu JJ. DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2003; 24:883-9.
 98. Goth L. Serum catalase: reversiblyformed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clin Chem* 1991;37:2043-47.
 99. Sampson MJ, Astley S, Richardson T, et al. Increased DNA oxidative susceptibility without increased plasma LDL oxidizability in type II diabetes: effects of alpha tocopherol supplementation. *Clin Science* 2001;101:235-41.
 100. Ambalavana RN, Carlo WA, Shankaran S, et al. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Predicting outcomes of neonates diagnosed with hypoxemic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2006;118:2084-93.
 101. Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Am Aced Ped* 2004;113:1776-82.

102. Dani C, Martelli E, Bertini G, et al. Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:9-23.
103. Dani C, Masini E, Bertini G, et al. Role of heme oxygenase and bilirubin in oxidative stress in preterm infants. *Pediatr Res* 2004;56:873-7.
104. Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rogers PA, Stevenson DK. Hyperbilirubinemia results reduced oxidative injury in neonatal Gunn rat exposed in hyperoxia. *Free Radic Biol Med* 1995;19:395-40.
105. Wu TW, Wu J, Li RK, Mickle D, Carey D. Albumin-binds bilirubins protect human ventricular myocytes oxyradical damage. *Biochem Cell Biol* 1991;69:683-88.
106. Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:5918-22.
107. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;235:1043-6.
108. Mireles LC, Lum MA, Dennery PA. Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes. *Pediatr Res* 1999;45:355-62.
109. Heyman E, Ohlsson A, Girschek P. Retinopathy of prematurity and bilirubin. *N Engl J Med* 1989;320:256.
110. Yeo KL, Perlman M, Hao Y, Mullaney P. Outcomes of extremely premature infants related to their peak serum bilirubin concentrations and exposure to phototherapy. *Pediatrics* 1998;102:1426-31.
111. Hosono S, Ohno T, Kimoto H, et al. No clinical correlation between bilirubin levels and severity of retinopathy of prematurity. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2002;39:151-6.
112. Milner JD, Aly HZ, Ward LB, El-Mohandes A. Does elevated peak bilirubin protect from retinopathy of prematurity in very low birthweight infants? *J Perinatol* 2003;23:208-11.
113. Wiedemann M, Kontush A, Finckh B, Hellwege HH, Kohlschutter A. Neonatal blood plasma is less susceptible to oxidation than adult plasma owing to its higher content of bilirubin and lower content of oxidizable fatty acids. *Pediatr Res* 2003;53:843-9.

114. Christensen T. Unwanted side effects and optimization of phototherapy. Second Congress of the European Society for Photobiology, Padova, 1987. Elsevier Sequoia, Lausanne.
115. Mc Donagh AF. Molecular basis of phototherapy of neonatal jaundice. Second Congress of the European Society for Photobiology, Padova, 1987. Elsevier Sequoia, Lausanne.
116. Turgut M, Basaran O, Cekmen M, et al. Oxidant and antioxidant levels in preterm newborns with idiopathic hyperbilirubinaemia. *J Paediatr Child Health* 2004;40:633-7.
117. Kilic M, Turgut M, Taskin E, Cekmen M, Aygun AD. Nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities in jaundices of premature infants. *Cell Biochem Funct* 2004;22:339-42.
118. Granati B, Largajolli G, Rubaltelli FF, Pollazzon P, Bottos M, Sartori E. Efficacy and safety of the "integral" phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia. Results of a follow-up at 6 years of age. *Clin Pediatr* 1984;23:483-6.
119. Duman N, Ozkan H, Serbetcioglu B, et al. Long-term follow-up of otherwise healthy term infants with marked hyperbilirubinaemia: should the limits of exchange transfusion be changed in Turkey? *Acta Paediatr* 2004;93:361-7.
120. Tan KL. Phototherapy for neonatal jaundice. *Clin in Perinatol* 1991;18:423-36.
121. Rosenstein BS, Ducore JM. Enhancement by bilirubin of DNA damage induced in human cells exposed to phototherapy light. *Pediatr Res* 1984;18:3-6.
122. Brendler-Schwaab S, Czich A, Epe B, et al. Photochemical genotoxicity: principles and test methods. Report of a GUM task force. *Mutat Res* 2004;566:65-91.
123. Bracci R, Buonocore G, Talluri B, Berni S. Neonatal hyperbilirubinemia. Evidence for a role of the erythrocyte enzyme activities involved in the detoxification of oxygen radicals. *Acta Paediatr* 1988;77:349-56.
124. Dahiya K, Tiwari AD, Shankar V, Kharb S, Dhankhar R. Antioxidant status in neonatal jaundice before and after phototherapy. *Indian J Clin Biochem*, 2006;21:157-60.

- 125.** Kumar A, Pant P, Basu S, Rao GR, Khanna HD. Oxidative stress in neonatal hyperbilirubinemia. *J Trop Pediatr* 2007;53:69-71.
- 126.** Aksu M, Yilmaz D, Tuzun S, Kultursay N. Antioxidant defense systems in newborns undergoing phototherapy. *Indian J Pediatr* 1999;66:651-7.
-

Ek Tablo 1: Hasta grubuna ait fototerapi öncesi değerler

Hasta No	CİNS	DOĞUM ŞEKLİ	VA (gr)	YAŞ(gün)	FOTO SÜRESİ (saat)	FOHB (g/dL)	FOTL	FOTM	DNA %'si	FOTBİL (mg/dL)	FODBİL (mg/dL)	FOKAT (kU/L)
1	Erkek	C/S	3000	4	48.00	16.80	25.58	12.95	48.31	20.20	1.10	180.00
2	Kız	NVY	3550	5	26.00	16.50	26.12	7.37	27.41	17.40	1.20	194.60
3	Erkek	C/S	3900	2	32.00	18.00	7.48	1.84	24.54	15.30	1.20	203.10
4	Erkek	NVY	3000	2	72.00	20.80	8.47	2.59	30.64	14.60	.70	78.20
5	Erkek	NVY	2700	3	96.00	19.00	7.14	2.45	30.80	21.60	.60	175.50
6	Erkek	C/S	2600	3	72.00	20.50	45.00	27.61	55.12	19.30	1.20	146.25
7	Erkek	C/S	3270	8	48.00	16.00	64.54	40.71	63.08	19.90	1.00	158.60
8	Erkek	NVY	3500	12	24.00	15.00	33.50	11.87	42.97	21.60	1.50	78.80
9	Erkek	NVY	2560	3	72.00	20.50	15.09	5.48	36.30	19.90	2.00	145.70
10	Kız	C/S	2500	11	36.00	17.20	23.87	9.64	31.89	16.10	1.80	191.30
11	Erkek	NVY	2700	4	52.00	18.50	7.06	1.74	24.62	24.30	1.00	120.40
12	Erkek	C/S	2800	5	48.00	14.90	5.16	2.41	18.18	18.60	.80	79.30
13	Kız	NVY	3380	5	56.00	19.30	42.91	12.18	28.38	19.30	.90	186.80
14	Kız	C/S	3870	2	96.00	20.50	9.01	0.97	12.12	15.30	.80	79.30
15	Kız	C/S	2600	8	24.00	19.20	11.77	4.36	37.08	22.10	1.30	203.10
16	Kız	C/S	2890	6	48.00	17.20	13.64	7.45	22.78	23.40	1.10	177.80
17	Kız	NVY	2900	4	72.00	18.60	30.51	10.04	32.92	21.60	1.10	209.30
18	Kız	NVY	2790	11	72.00	17.40	45.38	16.15	35.60	25.00	1.00	122.10
19	Kız	C/S	2900	3	48.00	18.90	28.59	8.22	28.75	17.10	1.20	92.30
20	Erkek	NVY	3050	3	72.00	19.10	20.76	6.01	28.93	14.30	.80	182.80

C/S: Sezeryan

NVY: Normal vajinal yol

Ek Tablo 2: Hasta grubuna ait fototerapi sonrası değerler

Hasta No	FSTL	FSTM	KUYRUK DNA % 'si	FSTBİL (mg/dL)	FSDBİL (mg/dL)	FSKAT (kU/L)
1	4.02	1.43	10.98	13.80	1.40	67.50
2	3.63	.15	4.55	16.00	1.40	110.80
3	2.22	.61	11.99	10.60	1.30	65.30
4	.77	.09	7.24	12.50	1.20	76.50
5	1.98	.19	9.12	11.60	1.30	45.00
6	3.36	.26	6.47	9.10	1.10	58.50
7	1.71	.33	8.90	11.80	0.80	55.70
8	1.51	.10	6.51	13.60	1.10	42.80
9	2.08	.43	10.53	11.40	1.10	50.60
10	1.31	.22	10.88	15.10	1.60	56.30
11	3.47	1.26	13.41	13.70	1.10	78.80
12	1.95	.09	4.25	8.10	.80	65.30
13	8.21	1.98	15.06	12.40	1.20	48.90
14	5.57	.65	11.74	13.40	1.70	58.50
15	3.65	.71	19.34	13.00	1.20	90.00
16	5.83	1.76	13.64	12.90	1.20	55.70
17	3.83	.74	15.49	14.90	1.40	93.90
18	2.57	.31	12.05	10.10	1.10	56.30
19	4.86	1.38	11.97	16.00	1.80	40.50
20	1.65	.19	11.69	11.40	.80	81.00

Ek Tablo 3: Kontrol grubuna ait değerler

Hasta No	CİNS.	DOĞUM ŞEKLİ	VA (gr)	YAŞ (gün)	KHB (g/dL)	KTL	KTM	KUYRUK DNA %'si	KTBİL (mg/dL)	KDBİL (mg/dL)	KKAT (kU/L)
1	Kız	C/S	3000	4	16.10	2.31	.31	13.42	11.30	1.40	51.75
2	Erkek	NVY	3600	5	19.00	3.06	.36	11.77	12.30	1.40	60.75
3	Erkek	C/S	3650	9	14.70	3.46	.21	5.96	9.30	1.30	27.00
4	Erkek	C/S	3690	5	16.80	3.28	.68	12.44	8.00	1.20	81.00
5	Erkek	C/S	2700	3	16.70	2.64	.23	8.68	13.70	1.30	76.50
6	Kız	NVY	3000	7	17.60	4.29	.65	15.08	12.10	1.10	52.31
7	Erkek	NVY	4000	5	16.50	1.76	.15	8.41	13.70	.80	41.06
8	Erkek	NVY	3470	6	17.20	3.27	.69	21.16	10.60	1.10	56.25
9	Erkek	NVY	3650	9	20.30	2.48	.39	9.77	12.70	1.10	67.50
10	Erkek	C/S	3220	5	19.10	14.96	3.22	21.15	10.50	1.60	40.50
11	Kız	NVY	3600	6	17.60	1.91	.22	11.38	12.90	1.10	54.00
12	Kız	NVY	3550	3	16.50	3.78	.55	12.65	14.20	.80	69.75
13	Kız	NVY	3100	9	17.80	1.96	.28	14.21	14.60	1.20	72.00
14	Kız	NVY	3200	8	16.30	2.62	.34	8.69	14.10	1.70	60.75
15	Erkek	C/S	2800	4	18.20	1.16	.09	8.17	13.20	1.20	65.25
16	Erkek	NVY	2950	5	17.60	.80	.03	4.74	12.10	1.20	65.25
17	Kız	C/S	2600	7	15.60	2.03	.12	5.81	13.80	1.40	29.25
18	Erkek	C/S	2950	6	17.10	1.27	.16	7.74	13.40	1.10	36.00
19	Kız	NVY	3050	5	16.50	1.42	.19	8.06	13.10	1.80	29.25
20	Erkek	C/S	3190	8	17.60	2.03	.19	5.82	12.10	.80	63.00

C/S: Sezeryan

NVY: Normal vajinal yol

TC.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr Çiğdem KARAKÜKCÜ'ye ait 'Sarılıklı yenidoğanlarda bilirubin ve fototerapiden kaynaklanabilecek genotoksik etkilerin alkali comet tekniği ile değerlendirilmesi' adlı çalışma, jürimiz tarafından **Biyokimya Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih :28.03.2008

İmza

Başkan Prof Dr Muzaffer ÜSTDAL İmza

Üye Prof Dr Ahmet TUTUŞ..... İmza

Üye Doç Dr Cevat YAZICI..... İmza

Üye Doç Dr Eser KILIÇ İmza

Üye Doç Dr Gülden BAŞKOL..... İmza