

# Yenidoğan Döneminde Hiperbilirubinemi ve Eritrosit Zarı Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPaz İlişkisi

THE RELATIONSHIP BETWEEN HYPERBILIRUBINEMIA AND ERYTHROCYTE MEMBRANE Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>ATPase IN NEONATES

Dr.Türkân PATIROĞLU\*, Dr.Hatıce PAŞAOĞLU", Dr.Suzan HANGÜL\*

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi \*Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, "Biyokimya ABD, KAYSERİ

## ÖZET

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yenidoğan Servisi'nde takip ve tedavi edilen 43 hiperbilirubinemili (19'u hemolitik, 24'ü nonhemolitik) bebek ile Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisi'nde doğan ve takipte sarılık oluşmayan 22 sağlıklı yenidoğanda eritrosit zarı Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPaz aktivitesi çalışıldı. Hem hemolitik hem de nonhemolitik hiperbilirubinemili grubun ATPaz aktivitesi kontrol grubunun ortalama değerinden daha düşük bulundu ve aradaki fark önemli idi (P<0.01) (P<0.05). >

Enzim aktivitesinin nonhemolitik grupta, hemolitik gruptan daha düşük olduğu, ancak aradaki farkın anlamlı olmadığı belirlendi (P<0.05). Bilirubinün Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPaz aktivitesinlazalttığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Bilirubin, Eritrosit Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPaz aktivitesi  
T Klin Pediatri 1993, 2:162-165

Bilirubinün temel kaynağı hemoglobindir. Eritrositlerin yıkımı ile bilirubin seviyesinde yükselme meydana gelir. Eritrositlerin plazma gibi sıvı bir ortamda bütünlüklerini koruyabilmeleri yapılarındaki enzimlere ve fonksiyonlarının devamlılığına bağlıdır (11). Eritrosit zarının normal yapısını koruması enerji bağımlı aktif transportla sağlanır. Bu yolun en önemli enzimi olan Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPaz ile hücre içindeki fazla Na<sup>+</sup> dışarıya, hücre dışındaki K<sup>+</sup> hücre içine alınarak belli bir konsantrasyon gradientine karşı hücrenin bütünlüğü korunur(5).

Geliş Tarihi: 16.10.1992

Kabul Tarihi: 05.08.1993

Yazışma Adresi: Dr.Türkân PATIROĞLU  
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ve  
Biyokimya ABD, KAYSERİ

## SUMMARY

This study was performed on 65 newborns that 45 newborns with hyperbilirubinemia (19 hemolytic, 24 non-hemolytic). Who had been admitted to the Neonatology Unit of Erciyes University Medical Faculty and 22 control newborns who had been born in the Gynecological and Obstetrical Unit. It was measured the erythrocyte membrane Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPase activities of hemolytic and nonhemolytic with hyperbilirubinemia in comparison with control group (P<0.01) (P<0.05).

Enzyme activities of nonhemolytic with hyperbilirubinemia have been observed to be lower than that of hemolytic group, but the difference between them was not important (P>0.05).

Finally we thought that bilirubin had reduced erythrocyte Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPase activity.

Key Words: Bilirubin, Erythrocyte Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPase activity  
Anatolian J Pediatr 1993, 2:162-165

Yenidoğanlarda eritrosit ömrünün erişkinlere göre daha kısa olduğu bilinmektedir (5,11,15). Bu nedenle biz çalışmamızda, eritrositin bütünlüğünü korumakta birinci derecede rolü olan eritrosit zarı Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPaz ile bilirubin ilişkisini araştırmaya çalıştık.

## MATERYEL VE METOD

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yenidoğan Servisi'nde hiperbilirubinemi tanısı ile takip edilen 43 term yenidoğan ile, Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisi'nde doğan ve takipte sarılığı olmayan 22 sağlıklı term bebek üzerinde yapıldı. Hiperbilirubinemili bebekler hemolitik ve nonhemolitik olmak üzere iki gruba ayrıldı. ABO ve Rh uygunsuzluğu olanlar hemolitik gruba oluşturdu ve bunlarda Hb değerleri düşük, retikülosit değerleri yüksek ve periferik kan yaymasında hemoliz bulguları vardı. Tüm bebeklerde hemoglobin,

lökosit sayım, periferik kan yayması, retikulosit, anne ve çocuk kan grupları, direkt Coombs testi, total ve direkt bilirubin düzeyleri çalışıldı. Ayrıca nonhemolitik gruptaki bebeklerde intrauterin enfeksiyonlar açısından ELISA yöntemi ile serolojik testler çalışıldı.

Eritrosit zarı Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz ölçümü için hiperbilirubinemili bebeklerden exchange transfüzyon öncesi 10cc (100 Ü/ml heparin) kan örneği polietilen tüplere alındı. Kontrol grubunu oluşturan bebeklerden ise kan örneği aynı şekilde kordondan alındı. Eritrosit zarının hazırlanması için Dick ve arkadaşlarının yöntemi ile serolojik testler çalışıldı.

Eritrosit zarı Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz ölçümü için hiperbilirubinemili bebeklerden exchange transfüzyon öncesi 10cc (100 Ü/ml heparin) kan örneği polietilen tüplere alındı. Kontrol grubunu oluşturan bebeklerden ise kan örneği aynı şekilde kordondan alındı. Eritrosit zarının hazırlanması için Dick ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı (2). Bu yöntemde alınan heparinli kan oda sıcaklığında 1000xg'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan eritrosit kısmı 6-10 ml yıkama solüsyonu ile üç kez santrifüj edildi, buffy coat kısmı tamamen ayrıldı. 10mM Tris HCl tamponu eklenerek hematokrit değeri %40 olan bir eritrosit süspansiyonu elde edildi. 6ml eritrosit süspansiyonu 34ml tampon ile karıştırılıp 0-4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 9-10°C'de 28000xg'de 105 dakika santrifüj edildi. Elde edilen beyaz-pembe eritrosit zarına 10mM Tris-HCl tamponu eklenip bir gece bekletildikten sonra ATPaz enzim aktiviteleri ölçüldü. ATPaz enziminin spesifik aktivitesi eritrosit zarının 3mM Na<sub>2</sub> ATP ile işlemiyle açığa çıkardığı inorganik fosfatın ölçülmesine dayanmaktadır. İnkubasyon ortamı için İspir tarafından önerilen ortam kullanıldı (7). Örneğin içerdiği proteinler ise Lovvry ve arkadaşlarının yöntemine göre ölçüldü. Standart bovin albumini kullanılarak çizilen protein eğrisine göre hesaplanarak enzim aktiviteleri nmol P<sub>i</sub>/mgP protein/saat olarak gösterildi (10). İstatistik analiz, ortalamalar arası farkın önemlilik testine göre yapıldı (14).

## BULGULAR

Bu çalışmada 43 hiperbilirubinemili bebeğin 19'u hemolitik, 24'ü ise nonhemolitik grupta idi. Hemolitik grubu oluşturan bebeklerin periferik kan yaymalarında belirgin polikromazi, anizositoz ve normoblastemi vardı. Retikulosit değerleri %3-10 arasında değişmekte idi. Bir hastada direkt Coombs (+) idi. Ortalama Hb değeri 13.5±0.02gr/dl idi. Nonhemolitik gruptaki bebeklerin periferik kan yaymalarında hemoliz bulguları yoktu. Hepsinde direkt Coombs testi (—) ve retikulosit değerleri %1-5 arasında değişmekte idi. Bu gruptaki bebeklerin hiçbirinde intrauterin enfeksiyon açısından uygulanan serolojik testlerde aktif enfeksiyon bulgularına rastlanmadı. Ancak vakaların üçünde rubella IgG (+), altısında toksoplazma IgG (+), birinde CMV IgG (+) ve birinde de herpes IgG (+) idi. Bu gruptaki bebeklerin ortalama Hb değeri 16.75±0.88gr/dl idi.

Kontrol grubunu oluşturan bebeklerin takibinde gözle farkedilebilen sarılığa rastlanmadı, periferik kan yaymasında hemoliz yoktu ve direkt Coombs testi (—) idi. Ortalama Hb değerleri 18.8±0.35gr/dl idi. Hemolitik, nonhemolitik ve kontrol grubunun ortalama Hb değerleri ayrı ayrı karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiki açıdan önemli idi (P<0.01) (Tablo 1).

Hemolitik gruptaki bebeklerin ortalama bilirubin düzeyi 26.44±1.88mg/dl, nonhemolitik grupta ise 21.31±0.94mg/dl idi ve ortalamalar arasındaki fark önemli idi (P<0.01) (Tablo 2).

Hemolitik grubun ortalama Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz değeri 268.21±20.85nmol/pi/mg protein/saat, nonhemolitik grupta ise 234.42±14.06nmol/mg protein/saat bulundu ve ortalamalar arasındaki fark önemli değildi. Kontrol grubun ortalama Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz değeri 337.23±21.38nmol/pi/mg protein/saat idi ve her iki grubun ortalama değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki farkın anlamlı olduğu bulundu (P<0.05) (P<0.01) (Tablo 3).

Tablo 1. Araştırma gruplarının hemoglobin değerlerinin kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırılması (g/dl)

Gruplar	N	X±Sx	SD	t		
Hemolitik	19	13.51±0.82	3.57	4.57	<0.01	
Nonhemolitik	24	16.75±0.88	1.36	2.59	<0.05	6.65 <0.01
Kontrol	22	18.80±0.35	1.66			

Tablo 2. Hemolitik ve nonhemolitik hiperbilirubinemili bebeklerin serum bilirubin değerlerinin karşılaştırılması (mg/dl)

Gruplar	n	X±Sx	SD	t	P
Hemolitik	19	26.44±1.88	8.19	2.44	<0.01
Nonhemolitik	24	21.31±0.94	4.67		

Tablo 3. Hemolitik ve nonhemolitik hiperbilirubinemi grupları ile kontrol grubunda  $Na^+-K^+$  ATPaz aktivitesinin karşılaştırılması (nmol/pl/mg protein/saat)

Gruplar	n	X±Sx	SD	t	P	t*	P*
Hemolitik	19	268.20±20.85	90.90	1.34	>0.05		
Nonhemolitik	24	234.42±14.06	68.90	2.74	<0.01	2.31	<0.05
Kontrol	22	337.30±21.38	100.27				

\* Hemolitik ve kontrol grubunun karşılaştırılması

## TARTIŞMA

Sarılığın görünür hale gelmesi için ya aşırı derecede hemoliz, ya eritrosit dışı kaynaklardan bilirubin oluşumu (karaciğerde sentez veya enzimlerden) ya da karaciğerde safra akımının staza uğraması gereklidir (4). Çalışmamızda hiperbilirubinemi her iki grupta kolestaz bulgusunun olmaması ve eritrosit dışı kaynakların katkısının ihmal edilebilir seviyede olması nedeniyle bilirubin yüksekliği eritrositlerin hemolizine bağlanabilir. Nitekim, hemolitik ve nonhemolitik grupların Hb ortalamaları ile kontrol grubunun ortalaması arasında anlamlı bir farkın oluşu da bunu desteklemektedir.

Dolaşımdaki eritrositlerin hemolizine engel olmaya çalışan en önemli faktör hücre içi ve dışı arasında haberleşme zincirinin temel birimi olan  $Na^+-K^+$  ATPaz sistemidir (5).  $Na^+-K^+$  ATPaz enziminin yaşla birlikte aktivitesi azalmaktadır. Brewer ve arkadaşları (1) yeni doğmuş dana eritrositlerinde enzim aktivitesinin erişkinlere oranla daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. İnsanlarda yaş ilerledikçe enzim aktivitesi azalır, bu özellikle kadınlarda daha belirgindir (12,13). Hepsi yenidoğan döneminde olan hiperbilirubinemi ve kontrol grubundaki bebeklerde enzim aktivitesinin farklı bulunması yaştan başka diğer faktörlerin de dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Hiperbilirubinemi gruplarında oldukça yüksek düzeyde bulunan bilirubin eritrosit zarına, dolayısıyla ömrüne etkili olabilir mi?

Bilirubinün biyolojik zarlara bağlandıktan sonra zar da fosforilasyonun yanı sıra elektron transport sistemine de inhibitör etkisi olduğu bilinmektedir (5). İn vitro çalışmalarda  $Na^+-K^+$  ATPaz pompasının bilirubinle etkileşmesinin doz ve ısıya bağımlı olduğu gösterilmiştir. Yaklaşık 150  $\mu$ mol gibi yüksek konsantrasyonlarda bilirubinün sistem üzerine inhibisyon yaptığı bilinmektedir. Isı ile ise ters bir ilişki vardır, düşük ısılarda daha güçlü inhibisyon olmaktadır (9,11). Bizim çalışmamızın in vivo şartlarda yapılması ve ilave hastalığı olmayan bebeklerin araştırmaya alınmasından dolayı, ısıdan ziyade bilirubin düzeylerinin enzim inhibisyonuna yol açtığını düşündük. Ancak bilirubin düzeyi daha yüksek olan hemolitik gruptaki ATPaz aktivitesinin bilirubin düzeyi daha düşük olan nonhemolitik grubun ATPaz aktivitesinden daha yüksek olduğunu, fakat aradaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığını saptadık. ATP'nin aktif

hale gelmesi ve yıkılabilmesi için mutlaka Mg elementine ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (3,8). Bir grup araştırmacı nedeni belirlenemeyen hiperbilirubinemilerde eser elementlerin eksikliğine işaret etmektedir (16). Belki de biz nonhemolitik grupta Mg eksikliğinden dolayı ATPaz aktivitesini hemolitik gruba oranla daha düşük bulduk, daha sonraki bir çalışmada aynı gruplarda Mg ve eritrosit  $Na^+-K^+$  ATPaz ilişkisi ortaya konabilir. Sanıyoruz ki, herhangi bir nedenle başlayan hiperbilirubinemi ATPaz enzim aktivitesinde azalma ile daha yüksek seviyelere çıkmakta, artan bilirubin düzeyi daha çok enzim inhibisyonuna yol açmakta ve olay bir kısır döngü halini almaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Brewer GJ, Eaton WJ, Beck CC, et al. Sodium-potassium stimulated ATPase activity of mammalian hemolysates: Clinical observations and dominance of ATPase deficiency in the potassium polymorphism of sheep. *J Lab Clin Med* 1968; 71:744.
2. Dick DAT, Dick EG, Tosteson DC. Inhibition of ATP in sheep red cell membranes by oxidized glutathione. *J Gen Physiol*, 1969; 54:123-33.
3. Flatman PW, Lev YL. The magnesium dependence of sodium-pump mediated sodium-potassium and sodium exchange in intact human red cells. *J Physiol* 1981; 315:421-46.
4. Gartner LM, Whittington PF. Disorders of bilirubin metabolism. In: Nathan D, Oski F, eds. *WB Saunders Company, Philadelphia*: 1987: pp443-45.
5. Guyton AC. Hücre membranında taşınma. In: Çeviren Gökhan N, Çavuşoğlu H, 7<sup>th</sup> ed. *Textbook of Medical Physiology, İstanbul*: Cilt 1, Merck Yayıncılık 1987:133-49.
6. Hansen R, Brottd D. Bilirubin and brain toxicity. *Acta PaediatrScand* 1986; 75:513-22.
7. İspir T. Lityumun insan eritrosit zarında ATPaz enzim sistemine olan etkisi. *Doğa Bilim Dergisi* 1984; 8:180-86.
8. Kashiwamata S, Geto S, Sembo KR, et al. Inhibition by bilirubin of ( $Na^+-K^+$ ) activated adenosine triphosphatase and K-activated P-nitro phenyl phosphatase activities of Na-treated microsomes from young rat cerebrum. *J Biol Chem* 1979; 254:4577-84.

9. Kawai K, Cowger LM. Effect of bilirubin on ATPase activity of human erythrocyte membranes. Res Commun Pathol Pharmacol 1981; 32:123-35.
10. Lowry OH, Roseburgh NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagents. J Biol Chem 1951; 193:265-75.
11. Meiseis JM. Neonatal jaundice. In: Avery BG, ed. Neonatology pathophysiology and management of the newborn (third ed). Philadelphia: JB Lippincott Company 1987; pp534-630.
12. Naylor JG, Dick DAT, Warrall EP, et al. Changes in erythrocyte sodium pump with age. Gerontology 1977; 23:256-61.
13. Sivas A, Uysal M, Aykaç G, et al. Age dependent changes in erythrocyte lipid composition and sodium content. Med Bubb İstanbul: 1984; 17:120-25.
14. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu Y. Biostatistik. Çağ Matbaası, Ankara: 1987; ss58-9.
15. Torunoğlu M. Kan hastalıkları fizyopatolojisi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını, Ankara: 1981; ss225-325
16. Tunoer M, Demirsoy S, Özsoylu Ş, ve ark. Yenidoğan bebeklerin nedeni bilinmeyen hiperbilirubinemisinde anne ve kordon kanı serumunda çinko, bakır ve magnezyum düzeyleri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları dergisi 1983; 26:19-26.