

YÜKSEK RİSKLİ YENİDOĞANDA LÖKOSİT FAGOSİTOZ FONKSİYONUNUN NİTROBLUE TETRAZOLİUM TESTİ (NBT) İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Serap KARASALİHOĞLU*, Zerrin (Abban) MEDENİ*, Turgut YARDIM**

ÖZET

Yüksek riskli yenidoğanlarda infeksiyonların gelişiminde rol oynayabileceği düşünülen lökosit fagositoz fonksiyonunu araştırma amacı ile yapılan çalışmada, bu fonksiyonun araştırılması için Nitroblue tetrazolium testi (NBT) kullanılmıştır. Olgu grubunun NBT (+) hücre oranı, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. En düşük NBT yüzdesinin en yüksek risk puanı olan grupta bulunduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, yüksek riskli yenidoğanların değerlendirilmesinde NBT testinin de yararlı olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yüksek Riskli Yenidoğan, Nitroblue Tetrazolium testi (NBT), Lökosit Fagositoz Fonksiyonu.

SUMMARY

THE EVALUATION OF LEUCOCYTE PHAGOCYTOSE FUNCTION IN HIGH RISK NEONATE BY NITROBLUE TETRAZOLIUM TEST

This study was undertaken in order to research the leucocyte phagocytose function which takes a great part in development of on infection in high-risk neonates, and nitroblue tetrazolium test (NBT) have been used to examine the leucocyte phagocytose function. The proportion of NBT (+) cells in the study group was significantly lower. The highest risk group had the lowest NBT percentage. These results suggest that NBT test can be useful in the evaluation of high-risk neonates.

Key Words: High-risk neonates, NBT test, Leucocyte phagocytose function.

GİRİŞ

Yenidoğan dönemi doğumdan sonraki ilk 4 haftayı kapsayan dönem olarak tanımlanır. Doğum öncesi veya doğum sırasında oluşabilecek bazı patolojik olaylar nedeniyle, sonraki yaşamında sorunları ortaya çıkabilecek yenidoğan grubuna yüksek riskli veya stresli yenidoğan denilmektedir. Yenidoğan döneminde mortalite oranlarının yüksek olduğu ve yüksek olan bu oranın yüksek riskli yenidoğan grubunda daha da fazla olduğu bilinmek-

* Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD.

** Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD.

tedir. Yüksek riskli yenidoğana ait tanı girişimleri doğumdan önce anne ile ilgili özellikler, doğum sırasında uygulanan tekniğe göre anne veya yenidoğanla ilgili bulgular ve son olarak yenidoğanın ilk günlerinde ayrıntılı muayenesi ile yapılmaktadır.

Yüksek riskli yenidoğanda ağır sonuçlar yaratabilecek önemli sorunlardan biri de infeksiyondur. İnfeksiyon riski fazla olan bu grubun tanısı önceden yapılmış ise doğabilecek bu önemli komplikasyona karşı da klinik olarak hazırlıklı bulunma imkanı olacaktır.

Wright ve ark. (1) yüksek riskli yenidoğanda, enfeksiyon sıklığını açıklamak için yaptıkları bir çalışmada, bu hastalarda azalmış bakterisidal aktivite saptamışlardır. Yüksek riskli yenidoğanda infeksiyonlara yatkınlıkta önemli bir faktör olan lökositlerin fonksiyonel yeterliliğinin ne olduğu sorusu akla gelebilir. Bu konuda, chemiluminescence (2) ve diğer başka tekniklerle kemotaksis özelliklerini (3, 4, 5) araştırmak için çalışmalar yapılmıştır. İnfeksiyonlar sırasında pozitif olduğu bilinen nitroblue tetrazolium testini bu defa infeksiyon bulgusu olmayan yüksek risk grubundaki yenidoğanlarda araştırarak sonuçların normal yenidoğandan farklı olup olmadığını saptamak istedik. Nitroblue tetrazolium boyasını fagosit eden polymorf nüveli lökositlerin oranının normale göre yüksek olduğu infeksiyonda bildirilmiştir (6). İnfeksiyonlu olmayan yüksek riskli yenidoğanlarda bu test ile normal yenidoğanlara göre olası bir farklılığın, fagositoz fonksiyonundaki yetersizliğin ölçütü olabileceği düşüncesi ile bu çalışma yapılmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında izlenen 30 u yüksek riskli 15 i normal olmak üzere toplam 45 yenidoğanda yapıldı. Lökosit fagositoz fonksiyonunu araştırmak üzere kullanılan test materyali olarak seçilen Nitroblue Tetrazolium % 0,2 lik solüsyon hazırlanarak kullanılmıştır. Testte venöz kandan yararlanılmıştır.

Yüksek riskli yenidoğan olgularının seçiminde Hobel ve arkadaşlarının (7) 1973 yılında 738 yenidoğan üzerinde gerçekleştirerek bildirdikleri yüksek riskli yenidoğan sınıflamaları esas alınmıştır. Kontrol grubu olguları ise aynı sınıflamadan puanlandırma yöntemiyle seçilmiştir. Yenidoğanların seçiminde gerek kontrol gerekse olgu gruplarında, gestasyon yaşıının 38 ve 42 hafta arasında olmasına dikkat edilmiştir. Prematüre olgular çalışmaya alınmamışlardır. Gestasyon yaşı tayininde son adet tarihi ve Dubowitz tablosu kullanılmıştır (8). Perinatal patoloji bulgularının en yoğun olduğu, yaşamın ilk 4 günündeki olgular çalışma kapsamına alınmıştır (7). Olgula-

rin hepsine rutin klinik muayene yanında lökosit, lökosit formül, band / nötrofil oranı, C-reaktif protein ve sedimentasyondan oluşan laboratuvar tatkikleri yapılmıştır.

Nitroblue Tetrazolium Testi:

Park ve arkadaşları (9) tarafından, ileri sürülen histokimyasal NBT testi kullanıldı. 1 ml. venöz kar, içinde 100 ünite heparin içeren steril tüplere konuldu ve hafifçe sallayarak karıştırıldı. Bu kanın 0.1 ml'si steril konkav küçük saat camlarına nakledildi. Eşit miktarda (0.1 ml) % 0,2 lik NBT solution ile karıştırıldı. Bu karışım nem temin etmek üzere içinde nemli gaz içeren bir petri kutusuna yerleştirildi. 37°C de 15 dakika inkübe edildi ve takiben 15 dakika oda ısısında bırakıldı. Bu period sonunda kan-NBT karışımı küçük kapiller pipet kullanılarak tekrar karıştırıldı. Bu karışımından bir damla kan alınarak yavaşça lama yayıldı. Lamlar havada kurutularak May-Grunwald-Giemza ile boyandı. 100 polimorf nüveli lökosit sayıldı. Lökosit içi siyah formozan içeren polimorf nüveli lökosit sayısına oranlanarak NBT pozitif hücre sayısı bulundu.

OLGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gruplar arasında özgürlük sağlamak açısından her iki gruptaki olguların tartı, boy ve baş çevresi ölçümleri yapıldı. Gestasyon yaşları saptandı. Kronolojik yaşları belirtildi.

Rutin tatkikler değerlendirilirken sedimentasyonun 15 mm / saatten fazla olmamasına (10, 11) lökosit sayısının $30.000 / \text{mm}^3$ den fazla ve $5000 / \text{mm}^3$ den az olmamasına (12), lökosit formülünde Band / Nötrofil oranının 0,14'ten büyük olmamasına (12, 13) ve CRP nin negatif olmasına dikkat edildi.

NBT değerlendirme yüksek riskli yenidoğanların NBT pozitif hücre oranı ortalaması ile, normal yenidoğanlardan oluşan kontrol grubunun NBT pozitif hücre oranı ortalaması karşılaştırılarak yapıldı.

İstatistik Yöntem: Kontrol grubu ile yüksek riskli yenidoğanların NBT değerlerinin ortalama ve standart sapmaları bulundu. Normal ve yüksek riskli grubun birbirleri ile karşılaştırılarak elde edilmesi amaçlanan anlamlılık oranı t-testi ile hesaplanarak t-tablosundan değerlendirildi.

BULGULAR

Araştırmamızın kapsamına giren 30 yüksek riskli yenidoğan olgusunun 12 si erkek 18 i kızdır. Kontrol grubuna alınan 15 normal yenidoğanın 6 si

erkek 9'u kızdır. Olgu grubunun risk faktörleri ve puanları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Olgu Grubunun Risk Faktörleri ve Puanları

Olgı No	Risk Faktörleri	Puan
1	Hipokalsemi Hiperbilirubinemi	20
2	Hiperbilirubinemi, Miadında SGA	20
3	Erken membran rüptürü, Hiperbilirubinemi	15
4	Konjenital anomali, Sezaryan, Genel anestezi	20
5	Mekonyumlu amnios sıvısı, Mekonyum aspirasyonu	15
6	Miadında SGA	10
7	Baş-pelvis uyumsuzluğu, Sezaryan, Genel anestezi, Hiperbilirubinemi, Hipokalsemi	40
8	Makat geliş, Sezaryan, Genel anestezi, Hiperbilirubinemi	30
9	Eski sezaryan hikayesi, Sezaryan, Anestezi	15
10	Hiperbilirubinemi	10
11	Anne kalp hastalığı, Miadında SGA	15
12	Rh uyuşmazlığı, Hiperbilirubinemi	15
13	Küçük pelvis, Sezaryan, Genel anestezi, Hiperbilirubinemi, SGA	35
14	Makat geliş, Genel anestezi, Sezaryan, Rh uyuşmazlığı	25
15	Makat geliş, Eski sezaryan hikayesi, Sezaryan, Genel anestezi, Hipokalsemi Hiperbilirubinemi	40
16	Erken membran rüptürü, Miadında SGA	15
17	Diabetik anne çocuğu, Polihidroamnios, Erken membran rüptürü, Genel anestezi, Sezaryan	35
18	İlerlemeyen travay, Fetal distress, Sezaryan, Genel anestezi	20
19	Solunum güçlüğü sendromu, SGA, Sezaryan, Genel anestezi	30
20	Sezaryan, Hiperbilirubinemi, Genel anestezi	20
21	İndüksiyona cevapsız, Sezaryan, Hiperbilirubinemi, Genel anestezi	30
22	Mekonyum ile boyalı amnios sıvısı, Mekonyum aspirasyonu	15
23	Sezaryan, Genel anestezi, Mekonyum ile boyalı amnios sıvısı, Mekonyum aspirasyonu	25
24	Postmatür, Fetal distress, Genel anestezi, Sezaryan	30
25	Makat geliş, Erken membran rüptürü, Genel anestezi, Hiperbilirubinemi, Sezaryan	35
26	Yüz geliş, Sezaryan, Genel anestezi	20
27	Hiperbilirubinemi, Erken membran rüptürü	15
28	Hiperbilirubinemi	10
29	Baş-pelvis uyumsuzluğu, Sezaryan, Genel anestezi	20
30	Hiperbilirubinemi, Rh uyuşmazlığı	15

Olgu ve kontrol grubuna ait lökosit sayısı, B / N oranı, sedimentasyon ve CRP sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Olgu grubunun NBT pozitif hücre oranı ortalaması % 25.73 ± 0.74 (dağılımı % 27-40) dir. Normal ve yüksek riskli yenidoğanların NBT değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

NBT pozitif hücre oranının olgu ve kontrol grubundaki özellikleri Tablo 2 ve 3 'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Olgu Grubunun NBT (+) Hücre Oranı Değerleri.

Olgu No	NBT (+) Hücre Oranı %
1	24
2	25
3	27
4	22
5	30
6	31
7	23
8	26
9	29
10	30
11	27
12	29
13	21
14	23
15	20
16	27
17	20
18	24
19	19
20	29
21	24
22	30
23	28
24	18
25	21
26	26
27	29
28	30
29	27
30	33
Ortalama	25.73
S.D.	0.741

Tablo 3. Kontrol Grubunun NBT (+) Hücre Oranı Değerleri

Olgı No	NBT (+) Hücre Oranı %
1	35
2	37
3	32
4	31
5	36
6	30
7	29
8	33
9	35
10	38
11	27
12	40
13	34
14	32
15	39
Ortalama	33.866
S.D.	± 1.009

Risk puanına göre olgular üç gruba ayrıldığında, en düşük NBT yüzde- si en yüksek risk puanına sahip grupta bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu üç grubun değerleri ve karşılaştırmaları Tablo 4'te gösterilmiştir. Her üç grubunda yüzde değerleri normalle ayrı ayrı karşılaştırıldığında farklılık istatistik ola- rak anlamlı olmakla beraber puan yükseldikçe, puan yükselmesi ile orantılı olarak anlamlı farklılık bulunması da o oranda artmaktadır.

TARTIŞMA

Yüksek riskli yenidogoğnlarda infeksiyonların sık olduğu, bunun morta- liteyi önemli ölçüde etkileyebilecegi bilinmektedir (7). Ölümlerin azaltıla- bilmesi için sebeplerin önceden saptanması yanında, ortaya çıkabilecek komplikasyonlara karşı hazırlı bulunmak da düşünülebilir (14). Yüksek riskli yeni-

Tablo 4. Risk Puanlamasına Göre NBT (+) Hücre Oranı Değerleri

Risk Puanı 10-19 (n=12)	Risk Puanı 20-29 (n=9)	Risk Puanı > 30 (n=9)
27	24	23
30	23	26
31	22	21
29	23	20
30	24	20
27	29	19
29	28	24
27	26	18
30	27	21
29	—	—
30	—	—
33	—	—
Ort. 29,33	Ort. = 25,33	Ort. = 21,33
SD = ± 0,53	SD = ± 0,82	SD = ± 0,90
t = 3,822	t = 6,080	t = 8,787
P < 0,01	P < 0,01	P < 0,01

doğanlarda lökosit fonksiyonları ile ilgili yetersizlik bulguları olduğu (3, 4) ve bakterisidal aktivitenin yetersiz bulunduğu (1) bildirilmiştir. Nitroblue tetrazolium testi ana maddesini oluşturan boyanın ortaya çıkan ajanlarla redüksiyona uğrayarak maviye (formazon) dönüşmesi ile değerlendirilerek fagositer hücrelerin metabolik aktivitelerini saptamada kullanıldı (1, 3, 6, 15).

Bu çalışmanın ana bulgusu, yüksek riskli yenidoğanlarda NBT testi ile saptanan fagositoz fonksiyonunda bir azalma ortaya çıktıgı şeklindedir (Yüksek riskli grupta ort. % 25.73 ± 0.74, normal grupta ort: % 33.86 ± 1.00). Risk puanına göre 10-19, 20-29, 30 ve yukarısı olarak üç ayrı grupta sınıflandırılmış olgulardan, üçüncü grupta en düşük NBT değerleri bulunmuştur. Yani risk faktörü fazlalığı oranında, NBT değerindeki düşüşte fazla olmaktadır. NBT testi ile elde edilen bu sonuçlar, yüksek riskli yenidoğan-

da polimorf nüveli lökositlerdeki bakterisidal aktivitedeki klinik olarak gözlenen anormallikleri (sık infeksiyon) doğrular ve açıklar niteliktedir. Çalışmanın kontrol grubunda sağlıklı ve zamanında doğmuş yenidoğandaki NBT testi ile elde ettiğimiz sonuçlar, normal fagositozu belirleyen diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Sağlıklı yenidoğanlarda % 33.86 ± 1.00 oranında NBT (+) hücre bulunmuş bu sonuç yüksek riskli yenidoğanlarla karşılaşıldığında, riskli grupta düşük sonuçlar elde edilmiştir.

Chandler'e (16) göre NBT değeri normal yenidoğanda % 33 ün üstünde olup, erişkinde ise % 5 in altındadır. Kalpaksoglou'ya (17) göre ise tarıtı düşük yenidoğanlarda NBT pozitif hücre sayısı 1300 ün altında (oran % 20 nin altında) bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda sağlıklı ve zamanında doğmuş yenidoğanlardaki NBT sonuçları ortalama % 33.86 ± 1.00 olarak bulunmuştur. Bu bulgular Chandlerin (16) bulguları ile paralellik göstermektedir.

Kalpaksoglou ve ark. (17) in sepsisli ve solunum güçlüğü semdromlu düşük doğum şartlı yenidoğanlarda spontan NBT indirgemesinin aktivasyonunu bildirmeleri ilginçtir. Daha yaşlı deneklerde lökosit fonksiyonunu etkileyebilen, Down sendromu, lenfoproliferatif hastalıklar, kriyoglobulinemi, diabetes mellitus, yanıklar ve lösemi için baş bölgesine yapılan radyoterapidir (2, 19, 20, 21). Özellikle diğer vücut savunmaları daha az geliştiğinden ve vücut direncini artırmada yetersiz olduğundan olgunlaşmamış yenidoğan lökositinin stres altında daha kalıcı bir labilite oluşturup gelişmesi şaşırtıcı değildir (1). Yüksek riskli yenidoğanlarda antibakterial fonksiyonda içe alma ve intraselüler öldürme eksikliği türünde değişimler mevcuttur. Bu defektif mekanizmalar intakt reseptör yerlerinde, hücre membranına yapışmada, fagositik vakuollerin oluşumunda, lizozimleri degranülasyonunda, oksidatif mekanizmanın aktivasyonunda ve fagositik vakuollerin içindeki bakterinin yok edilmesinde kendini gösterir (5, 22, 23, 24). Çeşitli ilaçlar (25) ve spesifik primer granülositik bozukluklar (22) bu mekanizmayı değişik olarak etkilediğinden anoksi, asidoz, hiperbilirubinemi, hipo veya hiperglisemi gibi durumların olgunlaşmamış lökosit fonksiyonunda çeşitli defektlere yol açabileceği olasıdır.

Bu bilgilerin ve sonuçların ışığında, yüksek riskli grubuna giren yenidoğanlar değerlendirilirken öykü, prenatal tanı yöntemleri, doğumda apgar skorlaması, kordon ve plasentanın muayenesi, yenidoğanın detaylı fizik muayenesi yanında NBT ile fagositoz fonksiyonunun araştırmasının yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Wright W.C., Ank B.J., Herbst J., Stiem R.E.: *Decreased bactericidal activity of leucocytes, of stressed newborn infants.* Pediatrics 56 (4):579-584, 1975.
2. Shigeoka A.D., Santos J.I., Hill N.: *Functional analysis of neutrophil granulocytes from healthy, infected and stressed neonate.* J. Pediat 95 (3): 454-460, 1979.
3. Bellenti J.A., Boner A.L., Yalletta T.: *Immunology of the fetus and newborn.* In *Neonatology* (Ed. E.B. Avery) Philadelphia Lippincott Company pp. 836-873, 1987.
4. Poncet E., Tran-Ba-Huy P.: *Immunologie et ORL.* Infantile Ann d'Oto-Laryng 90(9):489-510, 1972.
5. Roit I.M., *Essential immunology* pp: 2-13, Black Well Scien. Publ. London 1988.
6. Abban Z.: *Yenidoğan sepsisinin erken tanısında lökosit trombosit sayısı, Band / nötrofil oranı, sedimentasyon, NBT, SNBT ve Buffy-Coat yöntemlerinin önemi.* Uzmanlık Tezi İstanbul Tıp Fakültesi Pediatri, İstanbul 1982.
7. Mobel C.J., Hyvarien M.A., Okada D.M., Oh W.: *Prenatal and intrapartum high risk screening.* Am. J. of Obstet Gynecol 117 (1): 1-9, 1973.
8. Neyzi O., Ertuğrul T., Demirkol M.: *Fizik muayene (Yenidoğan)* Pediatri I (Ed. O. Neyzi, T. Ertuğrul) İstanbul Nobel Tıp Kitabevi 1989, s: 25-48.
9. Park L.H., Fikrig S.M., Smithwick E.M.: *Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils a diagnostic aid.* Lancet 2 (5): 32, 1986.
10. Rodwell R.L., Leslie A.L., Tudehope D.I.: *Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system.* J Pediat 112 (5): 761-767, 1988.
11. Saul M.A., Ronald L.D.: *The erythrocyte sedimentation rate in the newborn period.* J Pediat. 86 (6): 942-948, 1975.
12. Cloherty J.P., Stark A.N.: *Manual of neonatal care, Appendix D.*, Boston Little Brown and Company 1984, pp: 435-444.
13. Ağaoğlu L.: *Yenidoğanın hematolojik adaptasyonu, yenidoğan ve prematürenin temel sorunları* (Editör G. Can, F. Darendeliler) İstanbul MSUE Yayınları 1986, s:96-101.
14. Kerim G.: *Yüksek riskli gebelikler.* Katkı 4 (10): 955-960 1983.
15. Pitt J., Barlow B., Heird W.C.: *Protection against experimental necrotizing enterocolitis by maternal milk.* Pediatr. Res. 11: 906, 1977.
16. Chandler B.D., Kapoor N., Barker B.E., Boyle R.T., Oh W.: *Nitroblue tetrazolium test in neonates.* J. Pediatr 92 (4): 638-640 1978.
17. Kalpaktoglou P.K. Pediatrellis CP, Sotatzis A, Metaxas CB.: *Evaluation of nitroblue tetrazolium test in Low-Birth-Weight infants.* J. Pediat 84 (3): 441-443 1974.
18. Boyle R.J., Chandler B.D., Stonestreet B.S., Oh W.: *Early identification of sepsis in infants with respiratory distress.* Pediatrics 62 (5): 744-750, 1978.
19. Bağdede J.D., Nielson K.L., Bulger R.J.: *Reversible abnormalities in phagocytic function in poorly controlled diabetic patients.* Am J Med Scien 263 (6): 451-456, 1972.
20. Sbarra A.J., Shirley N., Selveraj R.J. et al.: *The role of phagocyte in host parasite interaction.* Cancer Res 24:1958, 1969.

21. Seth V., Chandera R.K.: *Opsonic activity, phagocytosis and bacterial capacity of polymorphs in under nutrition.* Arch Dis Child 47: 282, 1982.
22. Axtell R.A.: *Evaluation of the patient with a possible phagocytic disorder.* Hematol. Oncol Clin. North Am 2 (1): 1-12, 1988.
23. Bachner R.L.: *Molecular basis for functional disorders of phagocytes.* J Pediatr 83:317, 1974.
24. Cooper M.R., De Chatelet L.R., La Via M.F. et al.: *Complete deficiency of leucocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase (G 6PD) with bactericidal activity* J Clin Invest 51:769, 1972.
25. Miller D.R., Kaplan H.G.: *Decreased nitroblue tetrazolium.* Dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. Pediatrics 45: 861-865, 1970.