

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

”CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

***UTILIZAREA FOSFATAZEI ALCALINE DIN CORDONUL OMBILICAL CA
MARKER BIOLOGIC PREDICTIV PENTRU EVOLUȚIA ICTERULUI
NEONATAL***

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. VLĂDĂREANU SIMONA

Student-doctorand:

Dr. DIMA V. VLAD

Generalități

Fosfataza alcalină definește un grup de enzime plasmatică care hidrolizează esterii monofosforici la un pH optim eliberând fosfați anorganici. Enzima a fost izolată pentru prima dată din os și cartilaj de către Robinson în 1923. Fosfataza alcalină prezentă la mamifere conține metaloenzime codificate de o familie multigenică și funcționează ca molecule dimerice. Trei ioni metalici incluzând două molecule de Zn^{2+} și o moleculă de Mg^{2+} în site-ul activ sunt esențiali pentru activitatea enzimatică. Totuși, acești ioni metalici contribuie, și la conformarea monomerului fosfatazei alcaline [1].



Imaginea 1. Mecanismul de acțiune al fosfatazei alcaline

La oameni fosfataza alcalină are o activitate mult mai specifică, acționează la un pH optim alcalin, între 8,2 și 10,7, este legată de membrana celulară și este inhibată de aminoacizi și peptide [1]. Proprietățile specifice diferă la fiecare izoenzima, determinând apariția funcțiilor caracteristice fiecăreia. Fosfataza alcalină poate fi inhibată necompetitiv de către o gamă largă de compuși, care includ aminoacizi, tetramisol, teofilină și NADH.

S-a demonstrat că fosfataza alcalină are rol în reglarea transportului fosfaților la nivelul intestinului, rinichiului, și a transportului de calciu la nivel intestinal și renal. În ultimii ani s-a realizat un număr mare de studii axate pe complexitatea funcțiilor fosfatazei alcaline.

La nivelul organismului uman au fost identificate patru tipuri de izoenzime ale fosfatazei alcaline și anume: (A) placentară, (B) intestinală, (C) nespecifică țesutului și (D) din celulele germinale.

A) Fosfataza alcalină placentară

Este o enzimă termostabilă prezentă în cantități mari în sincitiotrofoblast în trimestrul 3 de sarcină. O parte din activitatea serică provine din neutrofile. Genele care o codifică se află pe cromozomul 2 și conțin 3 alele specifice (1,2, și 3) și pot fi reactivitate de celulele canceroase. Este

enzima cea mai polimorfă, cu până la 18 aleloenzime rezultate din mutații punctuale. S-a demonstrat ca fosfataza alcalina placentara are rol in transferul IgG-urilor materne catre embrion in timpul sarcinii, precum si in sinteza de ADN si profilerarea celulara in asociere cu insulina, zincul si calciul [2]. Fiind sintetizata in placenta, efectele fosfatazei alcaline placentare asupra cresterii si supravietuirii celulelor fetale sugereaza un rol cheie in reglarea cresterii embrionului.

B) Fosfataza alcalină intestinală

Gena care codifica fosfataza alcalina intestinala se afla pe bratul lung al cromozomului 2. Are o structura diferita fata de celelalte izoenzime, lanturile sale laterale nu se termina cu acid salicilic si este mai putin rezistenta la caldura. S-a demonstrat ca izoenzima are rol in absorbtia si transportul lipidelor si nucleotidelor. Au fost izolate forme diferite la adult si in intestinul fetal atat prin continutul proteic cat si de carbohidrati. Forma fetala poate fi reactivata in unele cazuri de cancer.

C) Fosfataza alcalină nespecifică țesutului (os/ficat/rinichi)

Gena care codifica fosfataza alcalina a tesuturilor nonspecifice (os, ficat, rinichi) se afla pe bratul scurt al cromozomului 1. Izoenzima termolabila prezenta in tesuturile nespecifice din ficat, os si rinichi codificate prin gene conexe. S-a demonstrat ca are rol in impiedicarea eliminarii rapide in circulatie a zaharurilor prin legarea carbohidratilor de o sialoglicoproteina hepatica. Izoenzima osoasa s-a demonstrat ca are rol in mineralizarea osoasa si dentara, si legarea calciului si fibrelor de colagen din os. Fosfataza alcalina a tesuturilor nespecifice este strans legata de hipofosfatemie si deficienta de vitamina B6 care determina aparitia convulsiilor si afectari neurologice.

D) Fosfataza alcalină din celulele germinale

Este o izoenzimă termo-stabilă prezentă in niveluri scăzute în celulele germinale embrionare și unele țesuturi neoplazice. Poate fi identificata in testiculi si timus. La fel ca si celelalte forme poate fi reactivata in unele cancer.

Tehnici de dozare a fosfatazei alcaline

Au fost raportate trei metode traditionale de dozare a fosfatazei alcalina si anume: metodele bazate pe fluorescență (citometrie de flux, histochimice și imunohistochimice), metodele bazate pe indentificarea mRNA prin RT-PCR si metodele de imunoreactia prin RIA sau ELISA. Precipitatul probei cu substraturi cum ar fi fluorescence-97 (ELF-97) marcat cu enzimă este cuplat

cu o parte din săruri și coloranți astfel încât să producă produse colorate insolubile detectate prin fluorescență. Aceste metode au o sensibilitate ridicată și permit o detectare rapidă. Cu toate acestea, instrumentele lor scumpe împiedică utilizarea pe scara largă, alături de nevoia de personal cu înaltă calificare [3,4].

În al doilea rând, metode bazate pe mARN; Northern blot și o reacție în lanț a revers transcriptazei-polimerază (RT-PCR) pot detecta nivelul FAL în timp real. Metoda anterioară este o metodă veche și clasică folosită pentru a detecta o izoformă specifică de fosfataza bazată pe nivelul mARN-ului său [4]. Abordarea RT-PCR se bazează, de asemenea, pe expresia ARN, dar se combină cu o singură analiză de extensie a gradului de nucleotide pentru a determina izoenzimele fosfatazei.

În al treilea rând, metoda bazată pe imunoreacție, incluzând Western blot, radioimuno-test (RIA) și testul ELISA au fost realizate pentru a obține mai multă specificitate și sensibilitate [5]. Western blot implică o selecție electroforetică, care permite separarea fosfatazei prin dimensiune și apoi rezultatele transferate pe benzi de membrană. Membrana este incubată cu anticorpi specifici. Această metodă, deși este sensibilă, consumă timp și depinde de experiența examinatorului. În plus, necesită multiple optimizări ale condițiilor experimentale. În RIA, tehnicile sunt optimizate folosind anticorpi monoclonali pentru a elimina reactivitatea încrucișată. RIA necesită izotopi radioactivi de iod ca indicator. Deși RIA este o metodă sensibilă, necesită pregătirea atentă a anticorpilor radioactivi, precum și expunerea la radiații. În plus, este nevoie de mai mulți pași pentru manipularea, depozitarea și eliminarea materialelor radioactive.

În 1971 Peter Perlmann și Eva Engval împreună cu alți cercetători de la Universitatea din Stockholm au publicat primul articol despre tehnica imunoenzimatică ELISA. Articolul prezintă analiza chimică cantitativă a IgG-urilor în serul de iepure folosind ca enzimă de substrat fosfatază alcalină [5]. Principiul de funcționare al metodei se bazează pe reacția imună de tip antigen-anticorp. Antigenul sau anticorpul este fixat pe un substrat solid și ulterior este pus în contact cu o imunoglobulină specifică. O enzimă este legată de imunoglobulina specifică care degradează substratul în colorant determinând apariția unui compus colorat ce poate fi determinat prin spectrofotometrie [6]. Prin această tehnică nu pot fi identificate izoenzimele și pot da rezultate fals-pozitive sau fals-negative [7,8].

Valorile fosfatazei alcaline în neonatologie

Creșterea, modificările metabolismului osos și modificările sistemul hepatobiliar determină o mare variabilitate a valorilor fosfatazei alcaline în funcție de vârsta și sex în special în copilărie și la pubertate. Datorită acestei dinamici crescute este foarte important de prezis atunci când valorile fosfatazei sunt crescute datorită patologiei sau sunt fiziologice adaptate vârstei și sexului. În studiile realizate de-a lungul anilor s-a încercat determinarea unor intervale de referință pentru stabilirea cât mai concretă a apariției patologiei. Clasificarea continuă a rezultatelor testelor cu graficele centilelor de la naștere până la vârsta adultă pot îmbunătăți utilizarea activității fosfatazei alcaline ca marker de screening pentru hipofosfataza și afecțiuni conexe.

În 2017 Jakob Zierk și colaboratorii germani au realizat un studiu pe un esanțion de 124,440 de pacienți și au realizat diagrame cu centilele (între centila 2,5 și 97,5) pentru interpretarea corectă a valorilor fosfatazei alcaline în funcție de vârsta și sex [9].

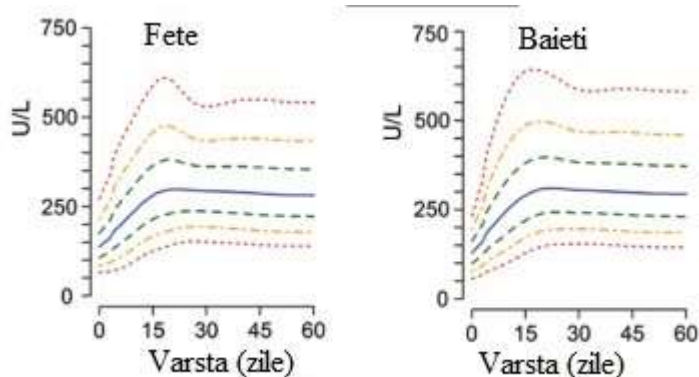


Diagrama 1. Valorile fosfatazei alcaline în funcție de vârsta și sex

Utilizarea intervalelor de referință pe baza centilelor ne ajută în diagnosticarea cât mai precisă a valorilor modificate în contextul apariției unei patologii și urmărirea evoluției pacientului față de intervalele numerice stricte.

Utilizările fosfatazei alcaline în patologia neonatală

Valorile modificate ale fosfatazei alcaline reprezintă un biomarker important în diagnosticul multor patologii precum disfuncții hepatice, boli osoase, insuficiența renală și neoplazii.

Fosfataza alcalina prezinta valori crescute in mod fiziologic la nou-nascut si la femeile insarcinate cand se sociaza cu macrosomia dar cu valori normale ale glicemiei [10]. Valori crescute patologice sunt intalnite in: obstructia cailor biliare, boli cu activitati crescute ale osteoblastelor (precum Boala Paget osoasa), niveluri crescute al calciului (precum hiperparatiroidismul), deficit de vitamina D3, afectare hepatocitara, boala celiaca. Izoenzima placentara a fosfatazei prezinta valori crescute in tumorile maligne precum seminoamele [11,12].

Nivelurile mai scăzute ale fosfatazei sunt mai puțin frecvente decât cele ridicate. Unele afecțiuni sau boli cum ar fi hipofosfatemia, malnutriție, deficit de magneziu, hipotiroidism, anemie severă, copii cu achondroplazie și cretinism, copii după un episod sever de enterită, anemie pernicioasă, anemie aplastică, leucemie mieloida cronică, boala Wilson poate duce la reducerea nivelului de fosfataza alcalină. În plus, unele medicamente, s-a demonstrat că pot reduce valorile fosfatazei [13].

Deficiența izoenzimei a tesuturilor nonspecifice a fosfatazei alcaline (FALTNS) duce la hipofosfatemie (HPP), o eroare înnăscută a metabolismului cauzate de metabolismul anormal al vitaminei B6, caracterizată prin crize epileptice în cazurile cele mai severe, și prin hipomineralizare a scheletului și dinților cu rahitism și pierderea precoce a dinților la copii sau osteomalacie și probleme dentare la adulți cauzate de acumularea de pirofosfat anorganic (PPi) [14]. Subiecții cu hipofosfatemie au deficit izolat al activității FALTNS, iar activitatea izoenzimelor placentare și intestinale este normală. Cele mai grave cazuri sunt letale în copilărie, practic se caracterizeaza prin absența completă a fosfatazei osoase, renale și hepatice în toate țesuturile [15].

Mai multe studii au indicat implicarea fosfatazelor în evenimentele celulare, cum ar fi reglarea fosforilării proteice, creșterea celulelor, apoptoza și migrația celulară în timpul dezvoltării embrionare. Genele izoenzimelor fosfatazei alcaline sunt reglate prin semnale distincte, așa cum se arată prin diferențe clare în expresia actiunilor lor. Expresia ectopică a izoenzimeror a fost asociata cu o mare varietate de cancere umane (cancerul de sân, coriocarcinomul, cancerul de ovar, al testiculelor, plămânului și tract gastrointestinal, osteosarcoamelor, a metastazelor osoase, carcinomul hepatocelular) [16,17].

Utilizarea fosfatazei alcaline a fost demonstrata si ca biomarker pentru ostopenia de prematuritate. Boala are o incidenta crescuta la prematurii sub 1250 de grame, in special cei care asociaza bronhodisplazie, enterocolita ulcero-necrotica si necesita multe zile de spitalizare in

terapie intensiva neonatala. Valorile crescute ale fosfatazei au fost asociate cu osteomalacie severa la prematuri [18].

În studii recente s-a încercat utilizarea fosfatazei alcaline ca tratament în unele boli cu implicații severe. În tratamentul hipofosfatemiei perinatale, infantile și juvenile a fost aprobată utilizarea unei fosfataze alcaline non-specifice umane solubilă recombinată care s-a dovedit cu succes în îmbunătățirea simptomelor și supraviețuirea pe termen lung [19]. De asemenea s-a folosit fosfataza alcalină în tratamentul enterocolitei ulcero-necrotice care și-a dovedit eficacitatea în reducerea inflamației intestinale la nou-născuții cu risc [20].

În ultimii ani au fost realizate mai multe studii în încercarea de a determina o corelație între prezența icterului neonatal și valorile fosfatazei alcaline. În 2017 Assal și colaboratorii au publicat prima documentare între valorile fosfatazei alcaline din cordonul ombilical și predicția icterului. Studiul său a cuprins 200 de nou-născuți normoponderali la termen, iar rezultatele au arătat că toți sugarii cu valori crescute ale fosfatazei alcaline au necesitat tratament pentru hiperbilirubinemie [21]. De asemenea, în 2019 Elmonem și colaboratorii au realizat un studiu pe 100 de nou-născuți cu vârsta de gestație peste 35 de săptămâni în care au demonstrat că valorile fosfatazei alcaline pot fi un bun predictor pentru icterul sever și pot prezice debutul acestuia [22]. În 2020, studiul efectuat de El-Amin și colaboratorii a evidențiat o corelare statistică între nivelurile crescute ale FAL (> 145UI/l) din cordonul ombilical și formele intense de icter neonatal la un număr de 60 nou-născuți la termen și nou-născuți prematuri (grupuri egale ca și număr). (123)

Descrierea studiilor

S-au realizat trei studii observationale pe o perioadă de 6 luni în care au fost incluși 250 nou-născuți înregistrați în SCOG Filantropia București în perioada ianuarie-iunie 2019. S-a alcătuit o bază de date care a fost analizată cu ajutorul IBM SPSS 20. Variabilele au fost categoricale nominale (sex, tipul nașterii) și cantitative continue sau discrete (vârsta gestațională, scorul APGAR la 1 minut și la 5 minute, greutatea la naștere, valorile fosfatazei alcaline, ale bilirubinei transcutanate la 24 și la 48 de ore). Pentru caracterizarea descriptivă a variabilelor cantitative s-au folosit măsurători ale tendinței centrale (medie, mediană) și ale variabilității (deviația standard) iar pentru variabilele calitative s-au folosit frecvențe absolute și procentuale/proporții. În funcție de distribuția valorilor variabilelor cantitative s-a folosit testul t pentru eșantioane independente pentru a realiza comparația între valorile mediilor din cele două populații țintă. Atunci când distribuția

valorilor unei variabile a fost non-parametrică, pentru comparații s-au folosit teste non-parametrice, respective Mann-Whitney. Nivelul de semnificație a fost considerat $p < 0.05$.

Rezultate obținute

În acest studiu ne propunem realizarea de corelații între valorile serice ale fosfatazei alcaline și valorile bilirubinei transcutanate, precum și însuțirea tratamentului cu fototerapie. FAL este raportată în U / l, cu un interval de referință dependent de test. Acest interval variază în funcție de vârstă și sex: acesta este în general de aproximativ 150–300 U / l la nou-născuți, dar la fel de larg de 60–450 U / l la barbatii la bubertate. A fost recoltată o proba de sange într-un tub simplu, ser coagulat sau tub litiu-heparinat. Substanțele anticoagulante complexe Mg^{2+} and Zn^{2+} , ambele necesare în activitatea FAL in vitro ar trebui evitate. Markerii de hemoliza, hiperbilirubinemia sau hiperlipidemia ar putea de asemenea să interfereze cu acuratetea testului.

Fosfataza alcalina a fost frecvent citată în literatura pentru studiile efectuate ca asociere în boala metabolică osoasă de prematuritate. Studiile pe prematuri au arătat asocieri între nivelul ridicat de FAL și nivel scăzut plasmatic de fosfor și crescut de calciu.[15,16]. Ambele sunt utilizate ca marker serici ai 'statusului mineral curent', fosforul fiind important și pentru acumulare de masă musculară. Studiile retrospective au arătat o asociere liniară între nivelul FAL și nivelul seric de fosfor. Variația manipulării calciului și fosforului renal are ca efect reducerea fiabilității lor ca markeri ai statusului mineral actual în ceea ce privește depozitele osoase subiacente. Probleme similare apar și în ceea ce privește utilizarea FAL ca marker al statusului mineral actual. Astfel, chiar dacă starea generală a mineralelor rămâne slabă, fosforul seric, calciul și FAL pot fi foarte normale.

Activitatea fosfatazei alcaline serice (FAL), a fosforului seric și a calciului seric au fost folosite anterior la screeningul osteopeniei la sugarii prematuri. Creșterea FAL și scăderea fosforului și a calciului seric s-a dovedit a fi legat de riscul crescut de MBD de prematuritate. [23] Au fost raportate în literatura corelații între existența osteopeniei scheletice, greutatea scăzută la naștere, scăderea vârstei gestationale, scăderea alimentației enterale și nivel crescut de FAL seric la sugarii cu greutate <1500 g la naștere. Cu toate acestea utilitatea FAL și a fosforului seric ca teste de screening rămâne o provocare.[24]

De asemenea au fost citate studii în care se demonstrat ca fosfataza alcalina intestinala (IAP) este implicata în mecanismele multifactoriale de aparitie a enterocoliteni necrozante (NEC). IAP este o enzima endogena la nivelul maginii in perie a enterocitului, detoxifica LPS prin defosforilarea fragmentului lipidic-A impiedicand astfel legarea acestuia la receptorul 4 (TLR-4). În absența IAP, inflamația intestinală este exacerbată, iar înlocuirea sau suplimentarea IAP previne inflamația intestinală și endotoxemia. [25,26]. Lucrările noastre anterioare au demonstrat că IAP enteral suplimentar a redus severitatea leziunilor intestinale asociate cu NEC histologic [27]. De asemenea, am demonstrat că IAP enteral suplimentar a prevenit pierderea funcției de barieră intestinală asociată cu NEC (în presă). Pe baza rezultatelor anterioare, am emis ipoteza că IAP enteral suplimentar ar atenua inflamația sistemică finală indusă de NEC.

Datele demografice ale nou-nascutii introdusi în studiu au fost sumarizate în tabelul 1. Nou-nascutii au fost grupati în doua grupuri unul care a primit tratament (fototerapie) și un grup fără tratament.

	N	Minimum	Maximum	Average ± SD
Gestational age (weeks)	250	37	41	38.96±1.36
Weight (g)	250	2500	4050	3050.40±302.69
Apgar score 1 minute	250	8	10	9.12+/- 0.53
Apgar score 5 minutes	250	9	10	9.64+/-0.48

Tabel 1. Date demografice ale populației din studii

În urma studiului efectuat rata valorilor fosfatazei alcaline (FAL) au fost cuprinse între 145 U/L și 602 U/L cu o medie+/-SD de 282.69+/-62.15 U/L și o mediană de 298 U/L. Pasul histogramei a fost de 25 U/L cu numărul maxim de subiecți regăsindu-se în intervalul 325-350 U/L.

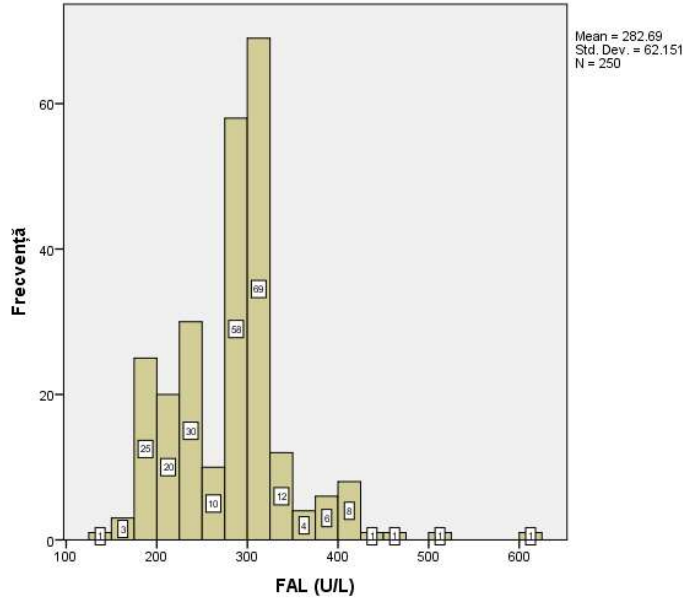


Figura 1. Histograma valorilor fosfatazei alaline (FAL)

La subiecții care nu au necesitat fototerapie, valorile fosfatazei alcaline (U/L) au fost cuprinse între un minim de 145 U/L și 417 U/L, cu o medie \pm -SD de 268.95 \pm -48.61 U/L și o mediană de 288.75 U/L. La subiecții care au necesitat fototerapie, valorile fosfatazei alcaline au fost între 320 U/L și 602 U/L cu o medie \pm -SD de 379.73 \pm -61.52 U/L și o mediană de 356. Un test t a arătat că media valorilor fosfatazei alcaline la subiecții care au necesitat fototerapie a fost semnificativ mai mare comparativ cu cea a subiecților pentru care nu s-a efectuat fototerapie ($t = -11.47$, $p = 0.00$ cu o mărime importantă a efectului Cohen's d de 1.99).

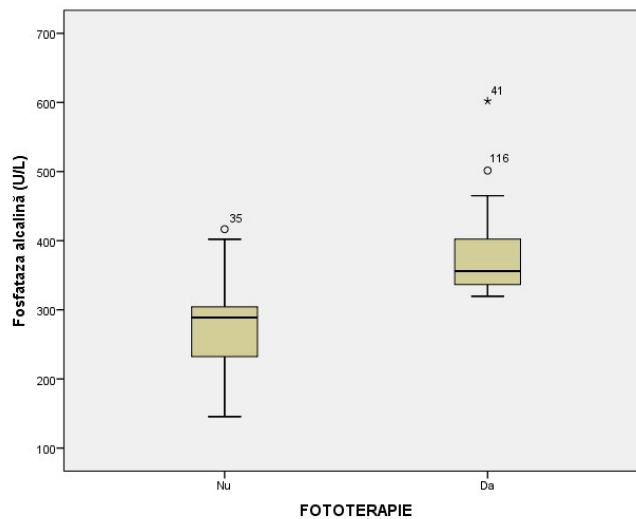


Figura 2. Grafic Box-plot pentru valorile fosfatazei alcaline în funcție de necesitatea tratamentului

Tabel 2. Comparație privind vârsta gestațională, greutatea la naștere și fosfataza alcalină între grupul cu tratament vs. grupul fără tratament

	N	M±SD	p
Vârsta de gestație (săptămâni)			
• Fără tratament	219	38.92±1.36	0.29
• Cu tratament	31	39.19±1.33	
Greutatea la naștere (g)			
• Fără tratament	219	3043.15±303.23	0.31
• Cu tratament	31	3101.61±298.74	
Alkaline phosphatase (U/L)			
• Fără tratament	219	268.95±48.61	0.00
• Cu tratament	31	379.73±61.52	

La subiecții cu un scor APGAR de 8 măsurat la 1 minut, valorile fosfatazei alcaline (FAL) au fost cuprinse între 195,7 U / L și 403 U / L cu o medie ± SD de 281,09 ± 59,23 U / L și o medie de 288,6. La subiecții cu un scor de 9 - valorile FAL au fost cuprinse între 156 U / L și 602,1 U / L cu o medie ± SD de 287,67 ± 62,47 U / L și o mediană de 298,6 U / L. La subiecții cu un scor de 10, valorile FAL au fost cuprinse între 145,39 U / L și 402 U L cu o medie ± SD de 266,35 ± 60,52 și o mediană de 283,3 U / L. Testul Kruskal-Wallis a arătat că nu există o diferență semnificativă statistic între medianele valorilor FA în funcție de scorul APGAR la 1 minut ($X^2 = 2,94$, $p = 0.23$).

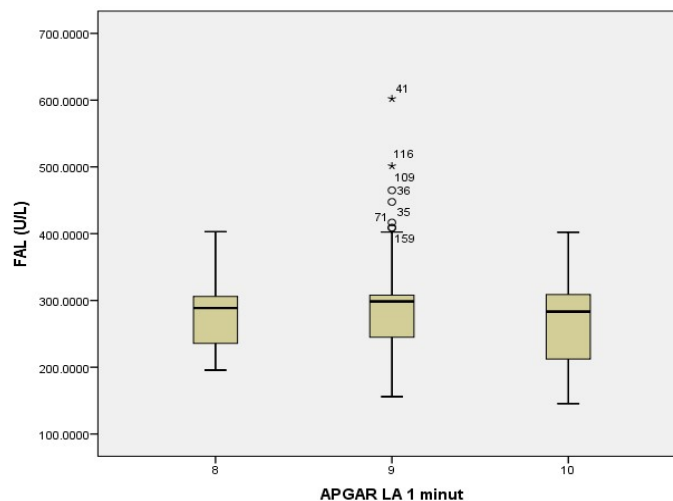


Figure 3 . Distribuția valorilor fosfatazei alcaline conform scorului APGAR la 1 minut

Valorile FAL pentru subiecții cu scor APGAR de 9 la 5 minute au fost cuprinse între 187,6 U / L și 602,1 U / L cu o medie \pm SD de $295,79 \pm 59,62$ U / L și o mediană de 299,8 U / L. Valorile FAL la subiecții cu acest scor de 10 au fost cuprinse între 145,39 U / L și 501,45 U / L cu o medie \pm SD de $275,44 \pm 62,51$ U / L și o mediană de 294 U / L. Testul Mann-Whitney a arătat că a existat o diferență semnificativă statistic între valorile FAL mediane în funcție de scorul APGAR de 5 minute ($U = 5839$, $p = 0,01$).

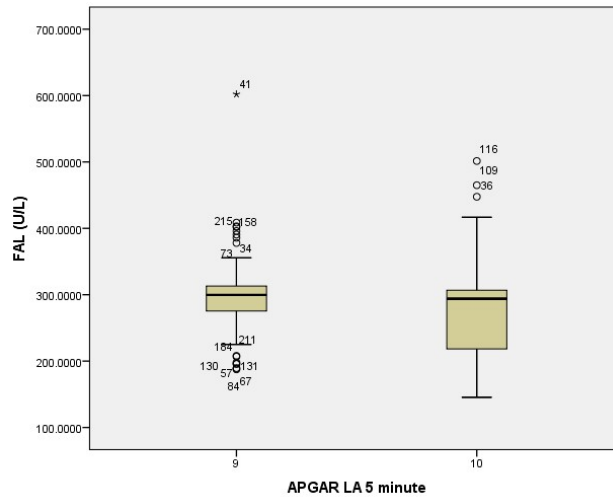


Figura 4 . Distribuția valorilor fosfatazei alcaline conform scorului APGAR la 5 minute

Graficul Scatter arată că nu a existat o relație liniară între greutatea nașterii și valorile FAL.

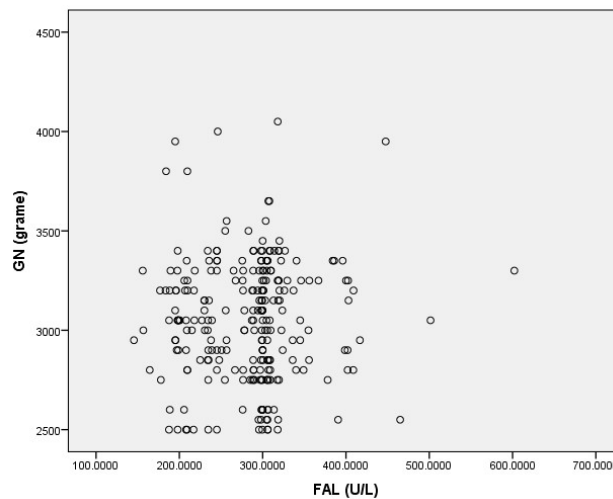


Figura 5. Corelația dintre valorile FAL și greutatea la naștere

La cei a căror naștere a fost spontană, valorile FAL au fost cuprinse între 145,39 U / L și 602,1 U / L cu o medie \pm SD de $285,61 \pm 66,98$ U / L și o mediană de 298 U / L. La cei a căror naștere a fost prin cezariană, valorile FAL au fost cuprinse între 156 U / L și 408,7 U / L cu o medie \pm SD de $278,31 \pm 54,27$ U / L și o mediană de 298 U / L. Testul Mann-Whitney a arătat că

nu a existat o diferență semnificativă statistic între valorile fosfatazei alcaline mediane în funcție de modul de naștere ($U = 7298,5$, $p = 0,69$).

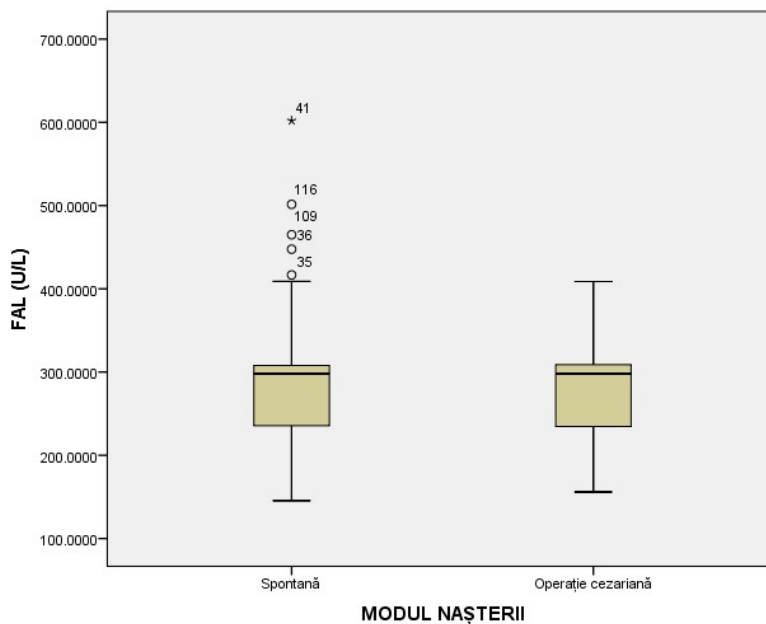


Figure 6. Distribuția valorilor fosfatazei alcaline în funcție de modul de naștere

Testul Chi-square nu a arătat nicio corelație statistică între sexul nou-născuților și nevoia de fototerapie (Tabel 3).

Tabel 3. Corelația dintre sexul nou-născuților și nevoia de fototerapie ($X^2 = 1,11$, $p = 0,29$)

		Fototerapie (Nu/Da)		Total
		Nu (n=219)	Da (n=31)	
Sex	Feminin	114	13	127
	Masculin	105	18	123

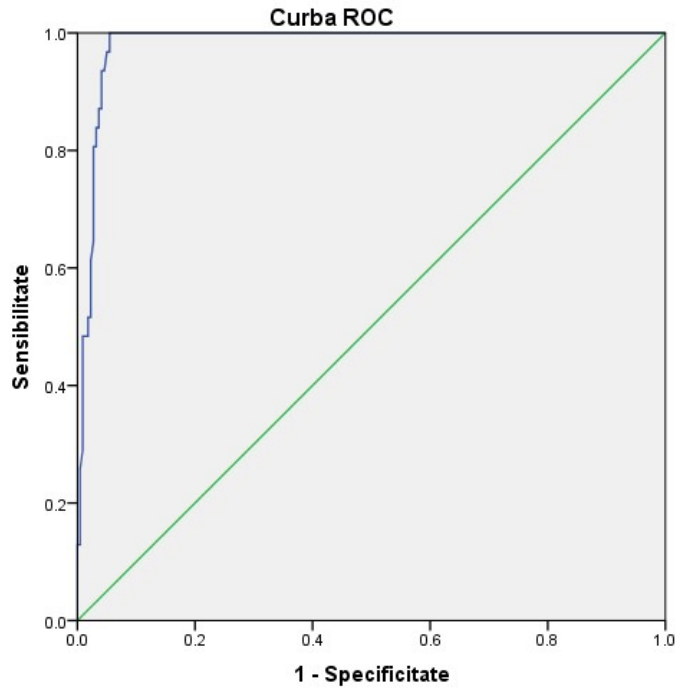


Figura 7. Curba ROC pentru stabilirea valorii cutoff a FAL corelată cu nevoia de fototerapie

Au fost întocmite curbe ROC pentru a calcula o valoare cutoff a fosfatazei alcaline peste care este necesară fototerapia și urmărirea mai atentă a nou-născutului pentru că va dezvolta un icter care necesită tratament. Valoarea obținută în studiul nostru a fost 319,55 UI/L.

În cazul nostru valoarea ariei de sub curbă a fost 0.98 pentru valoarea cut-off 319.55 UI/L pentru fosfatază alcalină (Sensibilitate 97% și 1-Specificitate = 0.06 (fals pozitivi) deci Specificitate = 94%)

Valorile bilirubinei transcutanate (BTC) la 24 de ore au fost cuprinse între 4.1mg/dl și 7.8mg/dl cu o medie+/-SD de 5.8+/-0.79mg/dl și o mediană de 5.8mg/dl. Valorile BTC la 48 de ore au fost cuprinse între 5.3mg/dl și 14mg/dl cu o medie+/-SD de 10.51+/-1.54mg/dl și o mediană de 10.30mg/dl. Printre valorile BTC la 48h s-au observat valori outlier. Un test *t* pentru eșantioane independente a arătat că media valorilor BTC la 48 de ore a fost semnificativ statistic mai mare decât cea măsurată la 24 de ore ($T = -43.04$, $p = 0.00$). (Figura 8)

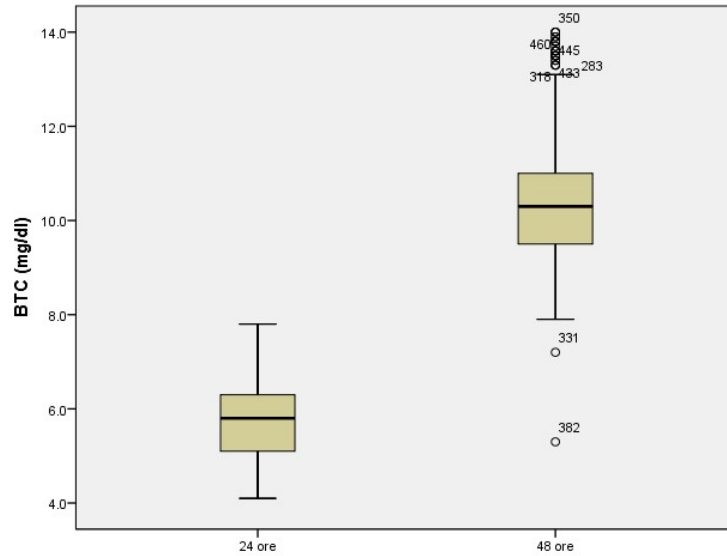


Figura 8. Valorile bilirubinei transcutanate la 24 și la 48 de ore

În funcție de necesitatea administrării fototerapiei, bilirubina transcutanată la 24 de ore, la subiecții la care nu a fost necesară fototerapia ($n = 219$), a avut valori cuprinse între un minim de 4.1mg/dl și 7.1 mg/dl cu o medie \pm -SD de 5.62 \pm -0.66mg/dl iar la cei la care a fost necesară ($n = 31$) a avut valori între 6.1mg/dl și 7.8mg/dl cu o medie \pm -SD de 7.06 \pm -0.33mg/dl și o mediană de 7.1mg/dl. Un test t pentru eșantioane independente a arătat că a existat o diferență semnificativă statistic între mediile valorilor bilirubinei transcutanate măsurate la 24 de ore ($t = -17.49$, $p = .00$, 95%CI = (-3.85; - 3.08)). (Figura 9)

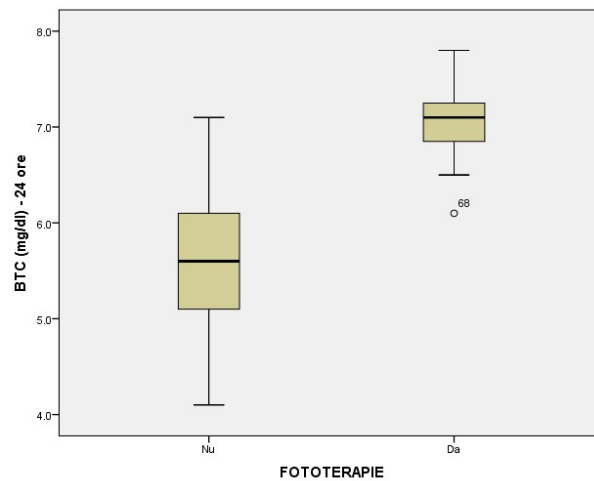


Figura 9. Grafice tip Box-plot pentru valorile bilirubinei transcutanate măsurate la 24 de ore

La subiecții la care nu s-a administrat fototerapie ($n = 219$), bilirubina transcutanată măsurată la 48 de ore s-a regăsit între 5.3 mg/dl și 12.7 mg/dl cu o medie \pm -SD de 10.08 \pm -1.09 mg/dl și o mediană de 10.1 mg/dl. La subiecții la care a fost necesară fototerapia ($n = 31$), bilirubina transcutanată măsurată la 48 de ore a fost între 13 mg/dl și 14 mg/dl cu o medie \pm -SD de 13.55 \pm -0.29 mg/dl și o mediană de 13.5 mg/dl. Un test t pentru eșantioane independente a arătat că a existat o diferență semnificativă statistic între mediile valorilor bilirubinei măsurate la 48 de ore ($t = -17.49$, $p = .00$ cu 95%CI: (-3.85; -3.08)). (Figura 10)

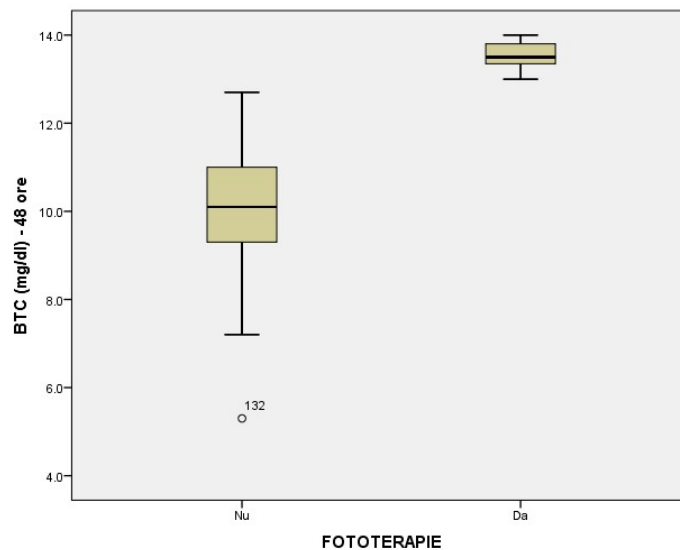


Figura 10 Grafic Box-plot pentru valorile bilirubinei transcutanate la 48 de ore în funcție de necesitatea administrării fototerapiei

La subiecții la care nu a fost necesară fototerapia, valorile bilirubinei la 24 de ore au fost între 4.1 mg/dl și 7.1 mg/dl cu o medie \pm -SD de 5.62 \pm -0.66 mg/dl și o mediană de 5.6 mg/dl iar cele măsurate la 48 de ore au fost între 5.3 mg/dl și 12.7 mg/dl cu o medie \pm -SD de 10.08 \pm -1.09 și o mediană de 10.1. Un test t pentru eșantioane independente a arătat că diferența între media valorilor hemoglobinei transcutanate măsurate la 24 de ore și cea a valorilor măsurate la 48 de ore la subiecții care nu au necesitat fototerapie a fost semnificativă statistic ($t = -51.56$, $p = .00$ cu 95%CI: (-4.63; -4.29)). (Figura 11)

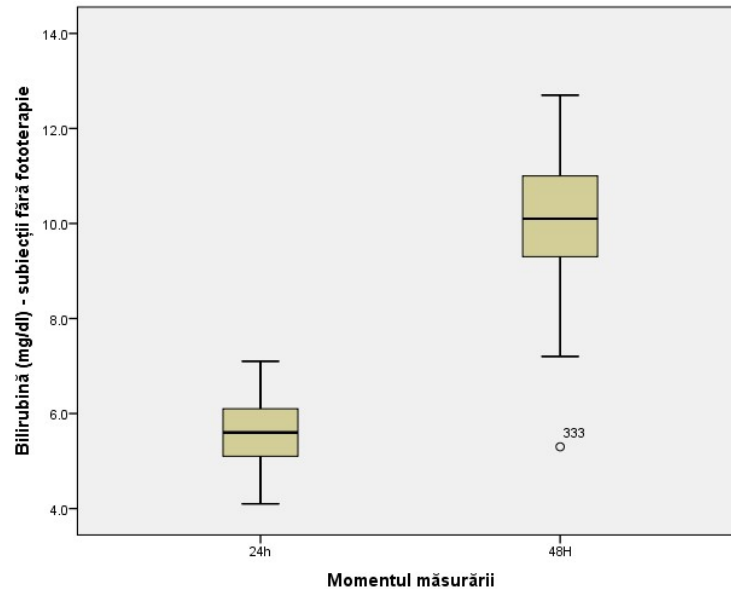


Figura 11. Grafic Box-plot pentru valorile bilirubinei la subiecții fără fototerapie la 24 și 48 de ore

La subiecții care au necesitat fototerapie, bilirubina transcutanată la 24 de ore a fost între 6.1 mg/dl și 7.8 mg/dl cu o medie \pm -SD de 7.06 \pm -0.35 mg/dl cu o mediană de 7.1 mg/dl iar cea măsurată la 48 de ore a fost între 13 mg/dl și 14 mg/dl cu o medie \pm -SD de 13.55 \pm -0.29 mg/dl și o mediană de 13.5 mg/dl. Un test t pentru eșantioane independente a arătat că a existat o diferență semnificativă statistic între media valorilor bilirubinei transcutanate la 24 de ore și cea la 48 de ore la subiecții care au necesitat fototerapie ($t = -78.62$; $p = 0.00$, 95%CI: (-6.65, -6.32)). (Figura)

Subiecții au fost spitalizați între 2 și 4 zile, cu o medie \pm -SD de 2.18 \pm -0.42 zile și o mediană de 2 zile. Subiecții care nu au necesitat fototerapie au fost spitalizați între 2 și 3 zile cu o medie \pm -SD de 2.05 \pm -0.21 zile și o mediană de 2 zile iar cei care au necesitat fototerapie au fost spitalizați între 3 și 4 zile cu o medie \pm -SD de 3.13 \pm -0.34 zile și o mediană de 3 zile. Un test Mann-Whitney a arătat că a existat o diferență semnificativă statistic între medianele numărului de spitalizare între cei care au neceistat și cei care nu au necesitat fototerapie ($U = 135.00$, $p = 0.00$). (Figura 13)

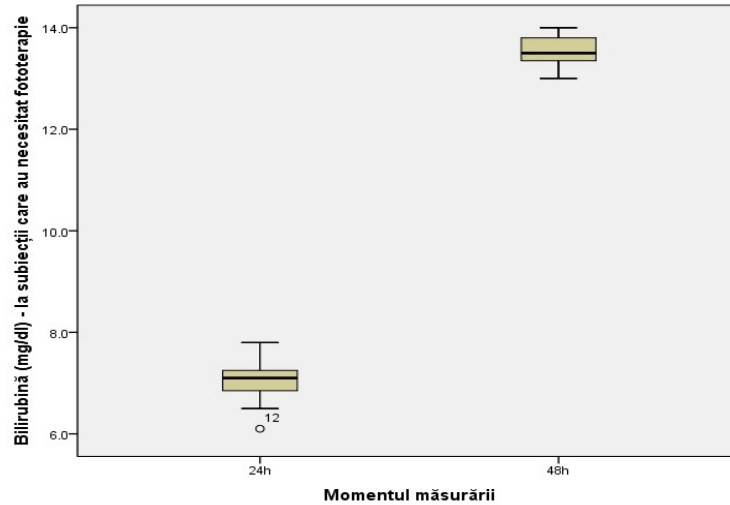


Figura 12. Grafic Box-plot pentru valorile bilirubinei la subiecții cu fototerapie, măsurate la 24 și 48 de ore

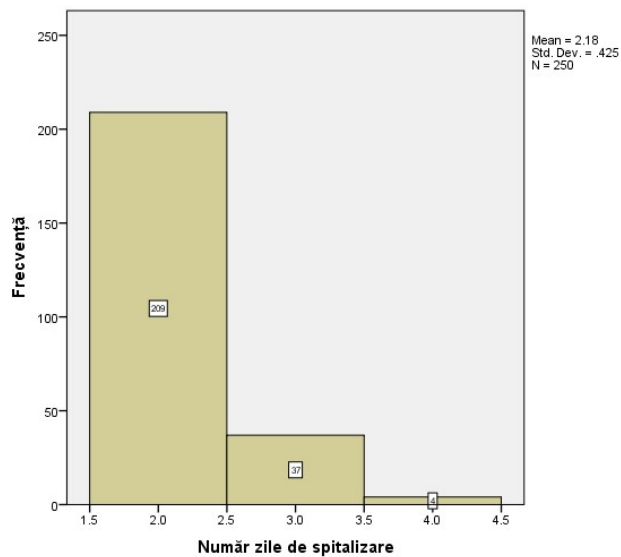


Figura 13. Histograma numărului de zile de spitalizare

Cei mai mulți subiecți ($n = 209$; 83.60%) au fost spitalizați pentru 2 zile, 14.8% ($n = 37$) au fost spitalizați 3 zile iar 1.6% ($n = 4$) au fost spitalizați 4 zile. (Figura 13)

Valorile greutății la naștere pentru subiecții care nu au necesitat fototerapie au fost cuprinse între 2500g și 4050g cu o medie \pm -SD de 3043.15 \pm -303.23g și o mediană de 3050g. La subiecții care au necesitat fototerapie valorile greutății la naștere au fost între 2550g și 3950g cu o medie \pm -

298.74g și o mediană de 3150. În medie, subiecții care au necesitat fototerapie au avut cu 58.46g mai mult decât cei care nu au necesitat. Un test t pentru eșantioane independente a arătat că nu a existat o diferență semnificativă statistic între media greutății la naștere a celor care nu au necesitat fototerapie și cei care au avut nevoie de tratament. (Figura 14)

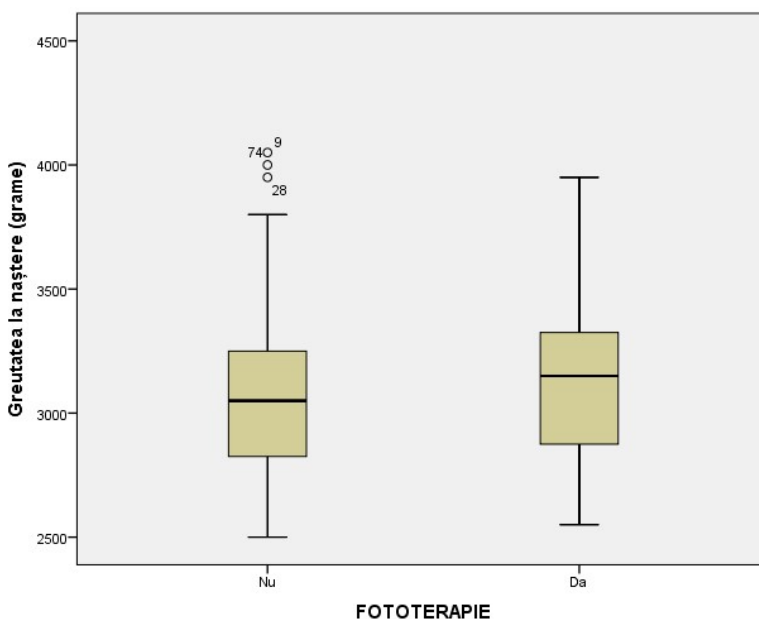


Figura 14. Grafic box-plot pentru greutatea la naștere în funcție de prezența/absența fototerapiei

La subiecții care au avut un scor Apgar la 1 minut de 8, valorile bilirubinei transcutanate la 24 de ore au fost între 4.2 mg/dl și 7.4 mg/dl cu o medie+/-SD de 5.64+/-0.94 mg/dl și o mediană de 5.6 mg/dl. La cei la care scorul Apgar la 1 minut a fost de 9, valorile BTC au fost între 4.1 mg/dl și 7.8 mg/dl cu o medie+/-SD de 5.87+/-0.77 mg/dl și o mediană de 5.9 mg/dl. La cei cu scor Apgar la 1 minut de 10, valorile BTC la 24 de ore au fost între 4.3 mg/dl și 7.8 mg/dl cu o medie+/-SD de 5.63+/-0.76 mg/dl și o mediană de 5.5 mg/dl. Un test Kruskal Wallis a arătat că nu a existat o diferență semnificativă statistic între valorile medianelor bilirubinei transcutanate la 24 de ore în funcție de scorul Apgar la 1 minut ($X^2 = 4.82, p = .09$). (Figura 15)

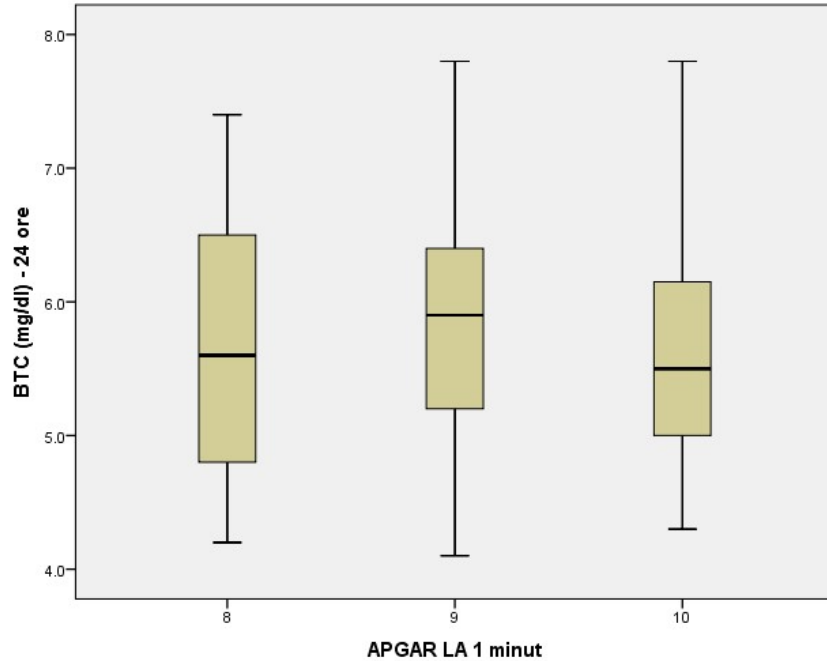


Figura 15. Grafic box-plot pentru valorile bilirubinei transcutanate la 24h în funcție de scorul Apgar la 1 minut

La subiecții la care scorul Apgar la 5 minute a fost de 9, valorile bilirubinei transcutanate la 24 de ore au fost între 4.1 mg/dl și 4.7 mg/dl, cu o medie \pm -SD de 5.84 \pm -0.81 mg/dl și o mediană de 5.9 mg/dl. La cei la care scorul a fost de 10 la 5 minute, valorile BTC la 24 de ore au fost între 4.1 mg/dl și 7.8 mg/dl cu o medie \pm -SD de 5.78 \pm -0.78 mg/dl și o mediană de 5.7 mg/dl. Un test Mann-Whitney a arătat că nu a existat o diferență semnificativă statistic între valorile medianelor BTC la 24 de ore în funcție de scorul Apgar la 5 minute ($U = 6799$, $p = 0.50$). (Figura 16)

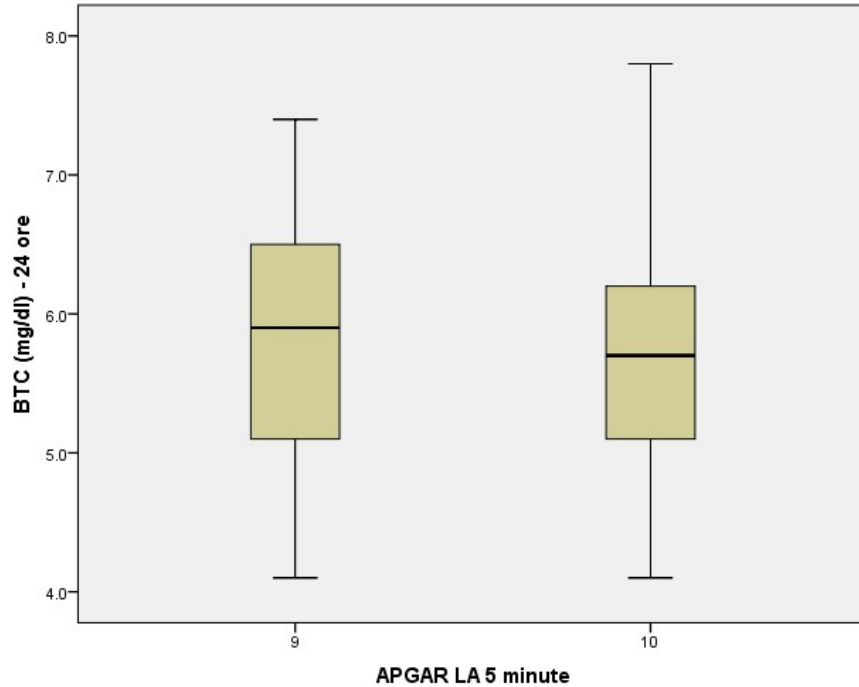


Figura 16. Grafic box-plot pentru valorile bilirubinei transcutanate la 24h în funcție de scorul Apgar la 5 minute

La subiecții la care scorul Apgar la 1 minut a fost de 8, valorile BTC la 48 de ore au fost între 7.2 mg/dl și 13.8 mg/dl cu o medie \pm SD de 10.39 \pm 1.72 mg/dl și o mediană de 10.1 mg/dl. La cei la care scorul a fost 9, valorile BTC la 48 de ore au fost între 5.3 mg/dl și 14 mg/dl cu o medie \pm SD de 10.55 \pm 1.58 mg/dl și o mediană de 10.3 mg/dl. La cei cu scor de 10, valorile BTC la 48 de ore au fost între 8 mg/dl și 14 mg/dl cu o medie \pm SD de 10.42 \pm 1.33 mg/dl și o mediană de 10.25 mg/dl. Un test Kruskal-Wallis a arătat că nu a existat o diferență semnificativă statistic între medianele valorilor BTC la 48 de ore în funcție de scorul Apgar la 1 minut ($X^2 = 0.26$, $p = 0.88$). (Figura 17)

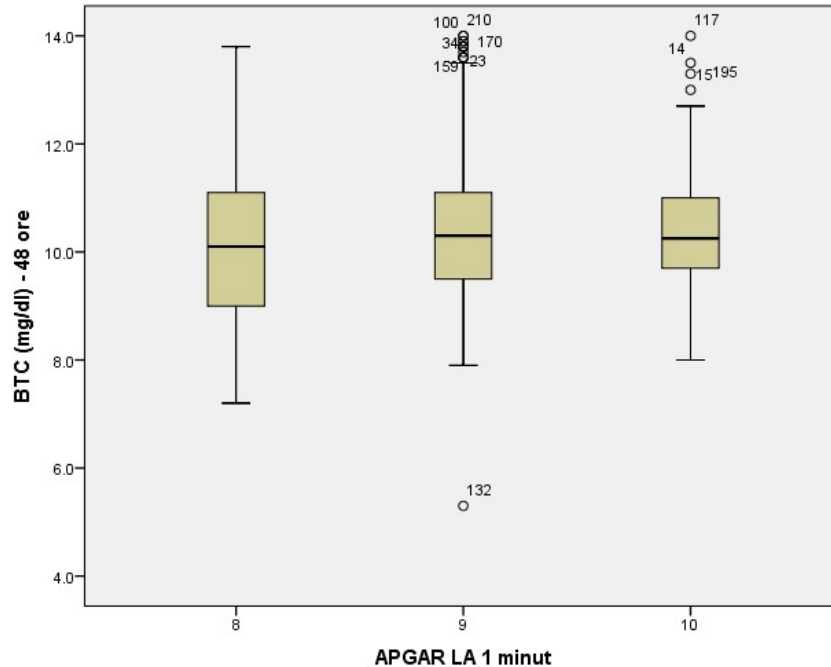


Figura 17. Grafic box-plot pentru valorile bilirubinei transcutanate la 48 h în funcție de scorul Apgar la 1 minut

La subiecții care au avut scor Apgar 9 la 5 minute, valorile BTC la 48 de ore au fost între: 5.3 mg/dl și 13.8 mg/dl cu o medie \pm -SD de 10.44 \pm -1.69 și o mediană de 10.2 mg/dl. La subiecții cu scor 10 la 5 minute, valorile BTC la 48 de ore au fost între 7.9 mg/dl și 14 mg/dl cu o medie \pm -SD de 10.55 \pm -1.45 mg/dl și o mediană de 10.3mg/dl. Un test Mann-Whitney a arătat că nu a existat o diferență semnificativă statistic între medianele valorilor BTC la 48 de ore în funcție de scorul Apgar la 5 minute. (Figura 18)

La subiecții născuți spontan, valorile bilirubinei la 24 de ore au fost între: 4.1 mg/dl și 7.8 mg/dl cu o medie \pm -SD de 5.67 \pm -0.79 mg/dl cu o mediană de 5.6 mg/dl. La subiecții extrași prin operație cezariană, valorile BTC la 24 de ore au fost între 4.2 mg/dl și 7.4 mg/dl cu o medie \pm -SD de 5.99 \pm -0.75 mg/dl și o mediană 5.9 mg/dl. Un test Mann-Whitney a arătat că a existat o diferență semnificativă statistic între valorile medianelor BTC la 24 de ore în funcție de modul nașterii ($U = 5717, p = 0.001$). (Figura 19)

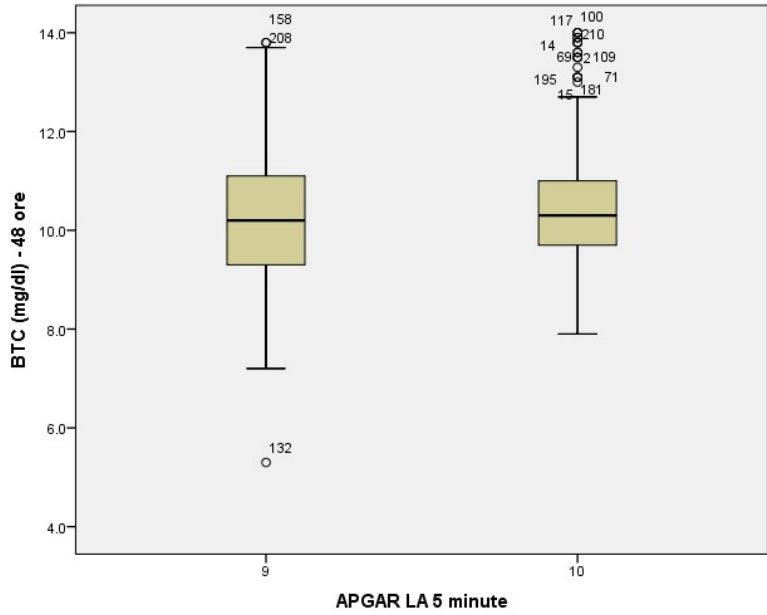


Figura 18. Grafic box-plot pentru valorile bilirubinei transcutanate la 48h în funcție de scorul Apgar la 5 minute

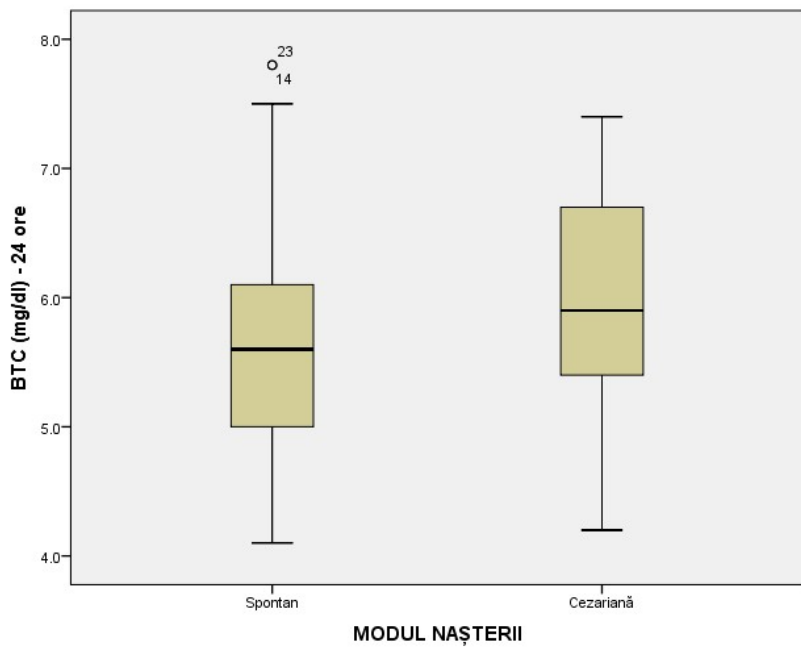


Figura 19. Distribuția valorilor BTC la 24 de ore în funcție de modul nașterii

Concluzii

Diagnosticarea precoce a icterului a fost o provocare în rândul neonatologilor și a reprezentat subiectul multor teze de cercetare. Diagnosticul tardiv sau conduita terapeutică neadecvată implică complicații grave precum icterul nuclear sau encefalopatia hiperbilirubinemică care atrag complicații neurologice pe viață sau chiar deces. În ultimii ani studiile s-au axat pe determinarea unor factori predictivi pentru apariția icterului patologic.

Datele din literatură au fost limitate la câteva studii recent apărute și care au prezentat corelații între alfa-fetoproteină, fosfataza alcalină dozate și evoluția icterului neonatal după naștere. Din datele pe care le avem mai există patru studii publicate la nivel mondial, realizate pe corelațiile între valorile fosfatazei alcaline din sângele din cordonul ombilical și valorile ulterioare ale bilirubinei. Dar în acestea, spre deosebire de studiul nostru, s-a utilizat valoarea bilirubinei serice sau o combinație între bilirubina transcutanată și cea serică. Studiul nostru s-a bazat exclusiv pe măsurători noninvazive ale bilirubinei.

Studiile prezentate în lucrarea de față au fost realizate în vederea realizării de cât mai multe corelații între fosfataza alcalină și parametrii determinanți ai apariției icterului ce implică complicații grave. Astfel, în primul studiu s-a încercat realizarea de corelații între modul nașterii, scorul Apgar la 1 minut și 5 minute, sexul nou-născutului și fosfataza alcalină. În urma analizării datelor și aplicării testelor statistice nu au fost observate diferențe semnificative statistice între grupul de studiu și grupul de control. Am concluzionat că modul nașterii, scorul Apgar și sexul nou-născutului nu sunt încadrați ca factori de risc pentru apariția icterului.

În cel de-al doilea studiu am cercetat corelații între valorile fosfatazei alcaline, valorile bilirubinei transcutanate și nevoia de fototerapie. În urma analizării datelor statistice am putut concluziona că valorile crescute ale fosfatazei alcaline se corelează cu valorile crescute ale bilirubinei transcutanate, implicit apariția icterului care necesită tratament. În plus, în urma realizării curbelor ROC am putut calcula o valoare cutoff pentru fosfataza alcalină. Astfel, toate valorile fosfatazei alcaline de peste 319,55 UI / L au fost asociate cu valori crescute ale bilirubinei și cu nevoia de fototerapie.

În cel de-al treilea studiu am încercat realizarea de corelații între valorile hemoglobinei și ale hematocritului și valorile fosfatazei alcaline. Deși din punct de vedere statistic în rândul pacienților noștri nu au existat diferențe semnificative statistice între grupul de studiu și cel de

control, în literatură există studii care au arătat o asociere între valorile scăzute ale hematocritului și valorile crescute ale fosfatazei alcaline.

În urma datelor analizate putem prezenta următorul algoritm de diagnostic precoce al icterului:

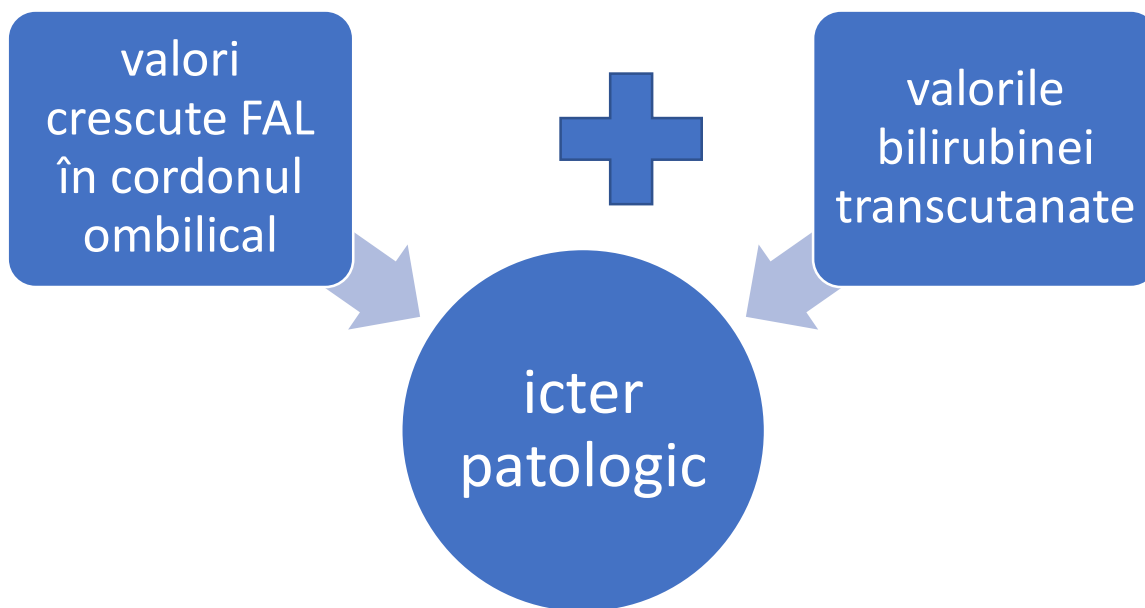


Figura 20 Algoritm de diagnostic al icterului patologic

Valorile fosfatazei alcaline pot fi considerate markeri predictivi pentru apariția icterului. Valorile crescute atrag atenția asupra unui icter care va necesita tratament. În studiile noastre s-au utilizat și s-au analizat doar datele nou-născuților care au necesitat fototerapie, dar nu trebuie să excludem tratamentul cu imunoglobuline sau în cazurile severe, chiar exanguinotransfuzia acolo unde este nevoie.

Punctele forte ale acestei cercetări au fost caracterul prospectiv al studiilor, recoltarea probelor de sânge de la nivelul cordonului ombilical, fără a necesita puncții venoase ale nou-născuților, analiza valorilor bilirubinei transcutanate care a fost realizată cu aparate de înaltă tehnologie cu o precizie cât mai mare și de asemenea, înrolarea unui număr semnificativ de pacienți. De asemenea stabilirea obiectivului principal de calcul al valorii limita pentru fosfataza alcalină reprezintă un punct forte, deoarece majoritatea studiilor au evidențiat doar asocierea între valorile crescute ale fosfatazei alcaline și apariția icterului patologic.

Limitările studiilor au fost perioada scurtă a cercetării, 6 luni, includerea doar a nou-născuților normoponderali la termen fără alte patologii asociate și doar a nou-născuților care au necesitat tratament cu fototerapie. Perioada cercetării a permis înrolarea unui număr semnificativ de pacienți deoarece au fost realizate într-o maternitate de grad III cu număr mare de nașteri dar a limitat rezultatele pe termen lung de urmărire (nu s-a putut preciza durata icterului) sau eventualele complicații apărute.

Beneficiile depistării precoce a valorilor FAL care se corelează cu valori ulterioare crescute ale bilirubinei și implicit cu nevoia de fototerapie sunt atât de natură medicală (nou-născuții aflați la risc de a dezvolta forme intense de icter vor fi atent monitorizați și tratați la timp) cât și de natură financiară (scade durata medie de spitalizare prin externarea mai rapidă a nou-născuților fără risc de a dezvolta forme intense de icter și implicit scad cheltuielile spitalului pentru aceste cupluri mamă-nou-născut).

Cercetarea actuală poate constitui un reper științific pentru viitoarele studii care ar putea fi realizate plecând de la valorile markerilor biochimici ce pot fi dozați din cordonul ombilical. Am cercetat doar o singură enzimă în asociere cu apariția patologiei icterice fără a utiliza metode invazive pentru nou-născut. Pe viitor se pot încerca corelații între valorile altor biomarkeri din sângele recoltat de la nivelul cordonului ombilical și apariția anumitor patologii (exemple: glicemia și predispoziția pentru instalarea diabetului la nou-născut sau valorile transaminazelor și apariția bolilor hepatice la vârsta neonatală). Există multe posibilități de explorare a acestei „mine de aur” reprezentată de sângele de la nivelul cordonului ombilical. În prezent, pe scară largă este inclus în toate ghidurile pentru folosirea lui în cazul prematurilor și nou-născuților cu asfizie perinatală, dar poate fi utilizat și la nou-născuții normoponderali la termen pentru a preveni puncțiile venoase repetate.

Originalitatea tezei este evidențiată de utilizarea unor metode non-invazive de diagnostic a icterului: recoltarea de sânge de la nivelul cordonului ombilical, recoltarea de probe încă de la naștere, măsurarea bilirubinei transcutanate, analiza factorilor de risc.

De asemenea utilizarea FAL ca și biomarker predictiv pentru evoluția icterului și a necesității utilizării fototerapiei constituie o abordare nouă mai ales pentru populația caucaziană deoarece până la această dată nu au fost publicate alte lucrări asemănătoare cu studii efectuate pe populația caucaziană. Celelalte patru studii asemănătoare identificate în literatura de specialitate au fost efectuate pe populații din Africa și Orientul Mijlociu.

Recoltarea de la nivelul cordonului ombilical de sânge a fost făcută imediat după naștere pentru dozarea valorilor fosfatazei alcaline și asocierea acesteia cu valorile bilirubinei transcutanate în dinamică. Astfel, o singură probă de sânge recoltată la naștere ne poate evidenția faptul că un nou-născut va dezvolta o formă mai severă de icter și va necesita urmărire atentă pentru începerea promptă a tratamentului.

De asemenea, este o lucrare axată pe studierea unei populații cauziene restul lucrărilor de aceste tip, bazate pe asocierea dintre FAL și bilirubină, au fost efectuate în cadrul populațiilor altor rase.

Utilizarea pe scară largă a acestor dozări ale FAL din cordonul ombilical în vederea stabilirii nou-născuților cu risc de a dezvolta forme intense de icter, poate avea impact asupra duratei de spitalizare medii din cadrul secțiilor de Neonatologie (în sensul scăderii duratei de spitalizare la pacienții care nu sunt predispuși la a dezvolta forme intense de icter) și asupra ghidurilor de specialitate.

Aplicații practice

O depistare precoce a cazurilor de nou-născuți care vor necesita expunerea la fototerapie poate duce la un mai bun management al acestor cazuri, cu o posibilă scădere a numărului de exsanguinotransfuzii și cu scăderea incidenței complicațiilor generate de hiperbilirubinemie.

În cazul nou-născuților cu valori ale FAL sub valoarea cutoff stabilită în prezenta lucrare (în cazul populațiilor cauziene) se poate decide externarea într-un termen mai scurt decât cel stabilit standard la nivelul fiecărui spital. Astfel se va putea obține o scădere a duratei medii de spitalizare.

Atât scăderea duratei medii de spitalizare cât și prevenirea apariției complicațiilor hiperbilirubinemiei (care ar presupune o spitalizare îndelungată și costuri suplimentare pentru tratamentul specific) vor avea impact financiar pozitiv asupra spitalului.

Externarea mai rapidă pentru nou-născuții fără risc de a dezvolta forme intense de icter neonatal va duce la reîntregirea familiei într-un timp mai scurt de la momentul nașterii, cu beneficii asupra confortului psihic al leuzei și cu impact pozitiv asupra dezvoltării neurologice a nou-născutului. De asemenea confortul sporit al leuzei, odată ajunsă în cadrul familiei, va crește probabilitatea

de a alăpta exclusiv la sân pe o perioadă mai lungă, cu beneficii clare atât pentru nou-născut cât și pentru mamă.

Bibliografie

1. Hoylaerts MF, Manes T, Millan JL. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem.* 1997;272:22781–7.
2. Sligbrand T. Present status and future trends of human alkaline phosphatases. *Prog Clin Biol Res.* 1984;166:3–14.
3. Vergote IB, Abeler VM, Bormer OP, et al. CA125 and placental alkaline phosphatase as serum tumor markers in epithelial ovarian carcinoma. *Tumor Biol.* 1992;13:168–74.
4. Fishman WH, Inglis NR, Green S, et al. Immunology and biochemistry of regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer. *Nature.* 1968;219:697–9.
5. Komoda T, Sakagishi Y. The function of the carbohydrate moiety and alteration of carbohydrate composition in human alkaline phosphatase isoenzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1978;523:395–406.
6. Tsai LC, Hung MW, Chen YH, Su WC, Chang GG, Chang TC. Expression and regulation of alkaline phosphatases in human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Biochem.* 2000;267:1330–9.
7. Millan JL, Manes R. Seminoma-derived nagao isozyme is encoded by a germ cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85:3024–8.
8. Hofmann MC, Jeltsch W, Brecher J, Walt H. Alkaline phosphatase isozymes in human testicular germ cell tumors, precancerous stage, and three related cell lines. *Cancer Res.* 1989;49:4696–700.
9. McComb RB, Bowers GN, Posen S. Alkaline phosphatase. New York: Plenum Publishing Corp; 1979.
10. Harris H. The harvey lectures: series 76. New York: Academic; 1986. p. 95–123.
11. U. Sharma, D.Pal, R. Prasad Alkaline Phosphatase: An Overview *Ind J Clin Biochem* (July-Sept 2014) 29(3):269–278 DOI 10.1007/s12291-013-0408-y
12. Kozlenkov A, Manes T, Hoylaerts MF, Milla'n JL. Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 2002; 277: 22992Y9.
13. Le Du MH, Milla'n JL. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 2002; 277: 49808Y14.
14. Kozlenkov A, Manes T, Hoylaerts MF, Milla'n JL. Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 2002; 277: 22992Y9.
15. Galperin MY, Bairoch A, Koonin EV. A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. *Protein Sci* 1998; 7: 1829Y35
16. Stec B, Holtz KM, Kantrowitz ER. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J Mol Biol* 2000; 299: 1303Y11.
17. Rezende AA, Pizauro JM, Ciancaglini P, Leone FA. Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate. *Biochem J* 1994; 301: 517Y22.
18. Breathnach R, Knowles JR. Phosphoglycerate mutase from wheat germ: Studies with ¹⁸O-labeled substrate, investigations of the phosphatase and phosphoryl transfer activities, and evidence for a phosphoryl-enzyme intermediate. *Biochemistry* 1977; 16: 3054Y60.
19. Gijbsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/ phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 2001; 276: 1361Y8.
20. Sotirios Fouzas, Lito Mantagou, Eleni Skylogianni, Stefanos Mantagos and Anastasia Varvarigou Transcutaneous Bilirubin Levels for the First 120 Postnatal Hours in Healthy Neonates *Pediatrics* January 2010, 125 (1) e52-e57; DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2009-0403>

21. Robert J Tinnion, Nicholas D Embleton How to use...Alkaline phosphatase in neonatology - *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2012;XX:XX–XX. doi:10.1136/archdischild-2012-301633
22. Hung YL, Chen PC, Jeng SF, *et al.* Serial measurements of serum alkaline phosphatase for early prediction of osteopaenia in preterm infants. *J Paediatr Child Health* 2011;47:134–9.
23. Backström MC, Kouri T, Kuusela AL, *et al.* Bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase and serum inorganic phosphate in metabolic bone disease of prematurity. *Acta Paediatr* 2000;89:867–73.
24. Tuin A, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. On the role and fate of LPSdephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G377.
25. Hussein Mohamed Al Assal , Hatem Refaat Hablas , Ali Abd Ellatief Afia , Mohamed Abd Alhameed Khedr2, Hamada Mohammed Abd Elaal El kzaz Utility of Cord Blood Alkaline Phosphatase Enzyme as a Predictor of Significant Neonatal Jaundice in Well Term Infants. *N Y Sci J* 2017;10(4):70-74]. ISSN 1554-0200 (print); ISSN 2375-723X (online). <http://www.sciencepub.net/newyork>. 9.doi:10.7537/marsnys100417.09.
26. Mousa Ahmadpour-Kacho, Yadollah Zahed Pasha, Mohsen Haghshenas, Zahra Akbarian Rad, Alireza Firouzjahi, Ali Bijani, Abdollah Dehviri, Mehrangiz Baleghi Cord Blood Alkaline Phosphatase as an Indicator of Neonatal Jaundice - - Iran J Pediatr. 2015 October; 25(5): e718.
27. Hannan Mohamed Abd Elmonem , Ahmed Ragab Fakhr El-Din, Emad Farah Kholeef & Shahenda Nasr Eldin - Alkaline phosphatase and haptoglobin as predictor of neonatal jaundice The Egyptian Journal of Hospital Medicine (January 2019) Vol. 74 (5), Page 978-987