

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**YENİDOĞAN RAT ASTROSİTLERİNDE DENEYSEL  
OLARAK OLUŞTURULAN BİLİRÜBİN TOKSİSİTESİNE  
KAFEİNİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. MEHMET DELİKTAŞ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. HACER ERGİN**

**DENİZLİ-2015**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**YENİDOĞAN RAT ASTROSİTLERİNDE DENEYSEL  
OLARAK OLUŞTURULAN BİLİRÜBİN TOKSİSİTESİNE  
KAFEİNİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. MEHMET DELİKTAŞ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. HACER ERGİN**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 18.11.2014 tarih ve 2014TPF045 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ-2015**

Prof. Dr. Hacer Ergin danışmanlığında Dr. Mehmet Deliktaş tarafından yapılan “Yenidoğan Rat Astrositlerinde Deneysel Olarak Oluşturulan Bilirubin Toksisitesine Kafeinin Etkisi ” başlıklı tez çalışması 17.../08/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim/Bilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN : Prof. Dr. Hacer ERGİN

ÜYE : Prof. Dr. Münevver KAYNAK TÜRKMEN

ÜYE : Doç. Dr. Özmert MA ÖZDEMİR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

26.../08/2015  
Prof.Dr.Günfer TURGUT  
Dekan V.  
Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince hoşgörü, emek ve desteklerini esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında bana büyük katkıda bulunan tez hocam sayın Prof. Dr. Hacer Ergin'e,

Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Aziz Polat ve tüm değerli hocalarıma,

Birlikte çalıştığım tüm asistan ve hemşire arkadaşlarıma,

Tez aşamasında her konuda desteğini ve yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Doç. Dr. Özmert MA Özdemir, Prof. Dr. Hakan Akça, Prof. Dr. Mehmet Bülent Özdemir'e ve tezimin istatistiksel analizinde yardımcı olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mehmet Zencir'e,

Tezimin her aşamasında desteklerinden yararlandığım Aydın Demiray, Şakir Akgün ve Bekir Büyükkakın'a,

Her zaman manevi desteklerini aldığım çok sevdiğim aileme, sevgili eşim Seher ve oğlum Mehmet Sarp'a ayrı ayrı teşekkür ederim.

Dr. Mehmet Deliktaş

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLOLAR DİZİNİ	IX
ÖZET	X
İNGİLİZCE ÖZET	XI
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
SARILIK ve BİLİRÜBİN METABOLİZMASI	3
Yenidoğan Sarılıkları	5
Bilirubin Toksisitesi	7
Bilirubin Nörotoksisitesinin Hücresel ve Moleküler Mekanizmaları	7
Akut Bilirubin Ensefalopatisi ve Kernikterus	9
Bilirubin Toksisitesinin Patofizyolojisi	10
Tedavi	11
Bilirubin ve Oksidatif Stres	11
Hücre Kültürlerinde Bilirubin Toksik Etkisi	12
Bilirubin Toksisitesini Etkileyen Faktörler	13
KAFEİN ve ETKİLERİ	14
GEREÇ VE YÖNTEM	17
BULGULAR	24
TARTIŞMA	40
SONUÇLAR	53
KAYNAKLAR	55

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>A<sub>0</sub>:</b>	Sıfırncı saatteki absorbens değeri
<b>A<sub>48</sub>:</b>	48. saatteki absorbens değeri
<b>aEEG:</b>	Amplitüd elektroensefalografi
<b>AR:</b>	Adenozin reseptörü
<b>BAEP:</b>	Beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyeli
<b>BIND:</b>	Bilirübinin indüklediği nörolojik disfonksiyon
<b>Bil-Kaf:</b>	Bilirübin-Kafein
<b>BPD:</b>	Bronkopulmoner displazi
<b>CO:</b>	Karbonmonoksit
<b>CAT:</b>	Katalaz
<b>DMEM/F12:</b>	<i>Dubello's minimal essential medium/f12</i>
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>Epo:</b>	Eritropoetin
<b>GABA:</b>	Gama-aminobütirik asit
<b>GPx:</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GSH:</b>	Redükte glutasyon
<b>GSSG:</b>	Okside glutasyon
<b>HBSS:</b>	<i>Hanks buffered salt solution</i>
<b>IL-1<math>\beta</math>:</b>	İnterlökin-1 beta
<b>IL-6:</b>	İnterlökin-6
<b>Kaf-Bil:</b>	Kafein-Bilirübin
<b>MDA:</b>	Malondialdehit
<b>MPP+:</b>	<i>1-methyl-4-phenylpyridinium</i>

<b>MR:</b>	Manyetik rezonans
<b>NADPH:</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NF-κB:</b>	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
<b>NMDA:</b>	N-metil-D-aspartat
<b>NO:</b>	Nitrik oksit
<b>SOD:</b>	Süperoksit dismutaz
<b>SPSS:</b>	<i>Statistical packages for social sciences</i>
<b>SSS:</b>	Santral sinir sistemi
<b>TC<sub>50</sub>:</b>	Hücrelerin %50'sine toksik konsantrasyon
<b>TNF-α:</b>	Tümör nekrozis faktör-alfa
<b>TLR4:</b>	Toll-like Reseptör 4
<b>TLR9:</b>	Toll-like Reseptör 9
<b>TSB:</b>	Total serum bilirübin
<b>TUNEL:</b>	<i>Deoxynucleotidyl (TdT)-mediated dUTP nick end labeling</i>
<b>UDPGT:</b>	Üridildifosfat glukronil transferaz
<b>VLBW:</b>	Çok düşük doğum ağırlıklı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 (A,B,C) Beyin dokusunun elde edilmesi ve mekanik olarak parçalanması	18
Şekil 2 (A,B) Faz kontrast mikroskobu primer nöron hücre kültürü	18
Şekil 3 (A,B) Faz kontrast mikroskobu primer astrosit hücre kültürü	19
Şekil 4 (A,B) 96 kuyucuklu plaklar ve kuyucuklu plaklardaki astrosit hücreleri	21
Şekil 5 Bilirubin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı	24
Şekil 6 Kafein konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı	25
Şekil 7 Grupların 48. saatte hücre canlılığı	26
Şekil 8 Grupların 24. saatte apopitozis yüzdeleri	27
Şekil 9 (A) Apopitozis kontrol grubu	28
Şekil 9 (B) Apopitozis bilirubin grubu	28
Şekil 9 (C) Apopitozis kafein grubu	28
Şekil 9 (D) Apopitozis kafein + bilirubin grubu	28
Şekil 9 (E) Apopitozis bilirubin + kafein grubu	28
Şekil 10 Grupların CAT aktiviteleri	29
Şekil 11 Grupların Glutatyon düzeyleri	30
Şekil 12 Grupların GPx aktiviteleri	31
Şekil 13 Grupların SOD aktiviteleri	32
Şekil 14 Grupların MDA düzeyleri	33
Şekil 15 Grupların total nitrat/nitrit düzeyleri	34
Şekil 16 Grupların IL-1 $\beta$ düzeyleri	35
Şekil 17 Grupların IL-6 düzeyleri	36
Şekil 18 Grupların TNF- $\alpha$ düzeyleri	37
Şekil 19 Grupların TLR4 düzeyleri	38
Şekil 20 Grupların TLR9 düzeyleri	39



## TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
<b>Tablo 1</b> Yenidoğanda indirekt hiperbilirübineminin nedenleri	6
<b>Tablo 2</b> Grupların hücre canlılığındaki değişim yüzdeleri	26
<b>Tablo 3</b> Astrosit hücrelerinde apopitozisin değerlendirilmesi	27
<b>Tablo 4</b> Grupların CAT aktiviteleri	29
<b>Tablo 5</b> Grupların Glutasyon düzeyleri	30
<b>Tablo 6</b> Grupların GPx aktiviteleri	31
<b>Tablo 7</b> Grupların SOD aktiviteleri	32
<b>Tablo 8</b> Grupların MDA düzeyleri	33
<b>Tablo 9</b> Grupların total nitrat/nitrit düzeyleri	34
<b>Tablo 10</b> Grupların IL-1 $\beta$ düzeyleri	35
<b>Tablo 11</b> Grupların IL-6 düzeyleri	36
<b>Tablo 12</b> Grupların TNF- $\alpha$ düzeyleri	37
<b>Tablo 13</b> Grupların TLR4 düzeyleri	38
<b>Tablo 14</b> Grupların TLR9 düzeyleri	39

## ÖZET

### **Yenidoğan rat astrositlerinde deneysel olarak oluşturulan bilirubin toksisitesine kafeinin etkisi**

Dr. Mehmet DELİKTAŞ

Yenidoğan bakımındaki son gelişmelere rağmen hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisite halen önemli bir problemdir. Fizyolojik düzeylerde antioksidan etkili olan bilirubin, yüksek düzeylerde oksidatif hasara neden olabilmektedir. Hatta immatür antioksidan enzim sistemleri nedeniyle, pretermelerde daha düşük bilirubin düzeyleri bile nörolojik hasara yol açabilmektedir.

Deneysel çalışmalarda, prematüre apnesinin tedavisinde kullanılan kafeinin, hipoksi, hiperoksi, nörotoksinlere bağlı nöron hasarını azalttığı saptanmıştır. Önceki klinik çalışmalarda kafeinin çok düşük doğum ağırlıklı (VLBW) bebeklerde mekanik ventilasyon ihtiyacını, bronkopulmoner displazi, patent duktus arteriosus, 18-21 aylıkken serebral palsy ve nörogelişimsel bozukluk sıklığını azalttığı, beyaz cevher yapısını düzelttiği gösterildi. Ancak kafeinin hiperbilirubinemideki etkisi henüz açıklığa kavuşmadı.

Bu çalışmada iki günlük Wistar albino ratlardan, modifiye Cole ve De Vellis yöntemiyle astrosit hücre kültürü elde edildi. Astrositlerin %50'sine toksik etkili indirekt bilirubin konsantrasyonu (TC<sub>50</sub>) 50 µM, hücre canlılığını %100 arttıran kafein konsantrasyonu 100 µM olarak saptandı. Bilirubin toksisitesine bağlı apoptozis TUNEL boyama yöntemiyle değerlendirildi. Gruplar kontrol, bilirubin, kafein, bilirubin maruziyetinden önce ve sonra kafein verilen gruplar olarak düzenlendi. Astrosit hücre kültüründe her grupta 24. saatte apoptozis, antioksidan enzimler, proinflamatuvar sitokinler, Toll-like reseptörler, 48. saatte hücre canlılığı değerlendirildi.

Bilirubinün apoptozu, malondialdehit, total nitrat/nitrit, interlökin (IL)-1β, IL-6, tümör nekrozis faktör-α, Toll-like reseptör (TLR)4 düzeylerini arttırdığı, hücre canlılığı, katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz aktivitesi ve glutatyon, TLR9 düzeylerini azalttığı gösterildi. Profilaktik ve tedavi edici kafein uygulaması, bilirubinün yıkıcı etkilerini baskıladı.

Sonuç olarak, profilaktik ve tedavi edici kafein, bilirubin nörotoksisitesine karşı antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuvar, antinitrozatif özelliklere sahip olup, pretermelerde bilirubin nörotoksisitesinin önlenmesinde umut verici görünüyor.

Anahtar kelimeler: Bilirubin, kafein, yenidoğan, nörotoksisite

## SUMMARY

### **The effect of caffeine on experimental bilirubin toxicity in newborn rat astrocytes**

Dr. Mehmet DELİKTAŞ

Neurotoxicity caused by hyperbilirubinemia is still an important problem despite recent developments of newborn care. Bilirubin has an antioxidant effect at physiologic levels but, may cause oxidative damage at high levels. Furthermore, even lower bilirubin levels may lead to neurologic damage in preterms due to immature antioxidant enzyme systems.

Caffeine used in the treatment of premature apnea was detected to decrease the neuron damage due to hypoxia, hyperoxia and neurotoxins in the experimental studies. In previous clinical studies, caffeine was shown to decrease mechanical ventilation requirement, the frequencies of bronchopulmonary dysplasia, patent ductus arteriosus, cerebral palsy and neurodevelopmental disorders at 18-21 months, and improve the white matter structure in the very low birth weight babies. But the effect of caffeine in the hyperbilirubinemia was not clarified yet.

In this study, we used astrocyte cell cultures obtained from two days old Wistar albino rats via modified Cole and De Vellis method. The indirect bilirubin concentration resulting toxicity on 50% of the astrocytes (TC50) was detected as 50  $\mu$ M and caffeine concentration increasing cell viability 100% was found as 100  $\mu$ M. Apoptosis due to bilirubin toxicity was evaluated by TUNEL staining technique. Groups were defined as control, bilirubin, caffeine, caffeine before bilirubin exposure, and caffeine after bilirubin exposure groups. Apoptosis, antioxidant enzymes, proinflammatory cytokines, Toll-like receptors at 24 hours and cell viability at 48 hours were evaluated at astrocyte cultures in each group.

Bilirubin was shown to increase apoptosis, malondialdehyde, total nitrate/nitrite, interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosing factor- $\alpha$ , Toll-like receptor (TLR) 4 levels, and decrease cell viability, catalase, glutation peroxidase and superoxide dismutase activities, and glutathione, TLR9 levels. Prophylactic and therapeutic caffeine administration inhibited these detrimental effects of bilirubin.

In conclusion, prophylactic and therapeutic caffeine have antiapoptotic, antioxidant, antiinflammatory and antinitrosative properties against bilirubin neurotoxicity, and caffeine use seems encouraging for prevention of bilirubin neurotoxicity in preterms.

Key words: Bilirubin, caffeine, newborn, neurotoxicity

## GİRİŞ

Yenidoğanların sık sorunlarından biri olan sarılık, term bebeklerin %60'ında, preterm bebeklerin %80'inde görülmektedir (1). Fizyolojik düzeylerde indirekt bilirübin antioksidan etki gösterirken, tedavi edilmeyen patolojik düzeylerde hiperbilirubinemi yenidoğan beyninde oksidatif hasara yol açarak akut bilirübin ensefalopatisi veya kernikterusa neden olabilmektedir (2-4). Hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisitenin mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte, deneysel ve klinik çalışmalarda, henüz antioksidan sistemleri ve enzimleri gelişmeyen preterm yenidoğanlarda, daha düşük bilirübin seviyelerinde nörolojik hasar geliştiği rapor edilmiştir (5,6). Membranları kolaylıkla geçen indirekt bilirübinin, mitokondrial fonksiyonları ve oksidatif fosforilasyonu engelleyerek, nörotransmitter sentez, salınım ve geri alımını, protein sentezini inhibe ederek, eksitotoksisiteye ve hücre zarında hasara yol açarak nörotoksisiteye neden olduğu bildirilmektedir (7,8).

Ksantin türevi olan kafein, prematüre apnesinin tedavisinde ve preekstübasyon döneminde yaklaşık 40 yıldır kullanılmaktadır (9). Deneysel çalışmalarda hipoksi (10,11), hiperoksi (12), nörotoksinlerin (13,14) oluşturduğu nöron hasarını azaltarak, nöronların dendrit uzunluğunu arttırarak (15) beyin koruyucu etkili olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda deneysel çalışmalarda kafeinin pretermelerde antiapneik özelliğinden başka erken ve geç yaralı etkilerinin de olduğu gösterilmiştir. Gebelik yaşı <31 hafta olan 5101 pretermi kapsayan bir çalışmada, hayatın ilk iki günün başlanan kafeinin, üç günden sonra başlanan kafeine göre, mekanik ventilasyon, ekstübasyon ihtiyacını, BPD, ve patent duktus arteriosus sıklığını azalttığı gösterilmiştir (16). Kafeinin geç etkilerini araştıran randomize plasebo-kontrollü çok merkezli bir çalışmada, neonatal dönemde kafein uygulanan 2006 VLBW bebekte düzeltilmiş yaş 18-21 aylıkken serebral palsy ve nörogelişimsel bozukluklarda belirgin azalma saptanmıştır (17). Başka bir çalışmada doğum ağırlığı <1250 gr pretermelerde, hayatın 3. günü başlanan kafeinin etkileri, 38-42 haftalıkken difüzyon manyetik rezonans (MR) ile değerlendirildiğinde, beyaz cevher mikro yapısını belirgin düzelterek beyin koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (18). Deneysel çalışmalarda, nonselektif adozin reseptör antagonisti kafeinin, antiapopitotik, antiinflamatuvar, antioksidan, antinitrozatif ve antioksisitotoksik özellikleriyle nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir (12,13,19-21).

Hiperbilirubinemiye bağlı n rotoksisitenin önlenmesi veya tedavisi amacıyla birçok ajan üzerinde çalışılmış; deneysel çalışmalarda L-karnitin (22), glikoursodeoksikolik asit (23), ursodeoksikolik asit (24), MK-801 (25), taurin (26), deksetazon (27), N-asetil sistein (28), ginkgo biloba (29), eritropoetin (Epo) (30)'in nöroprotektif etkileri gösterilmiş; ancak bu ilaçların hiçbiri klinik uygulamaya girmemiştir.

Prematüre apnesinin tedavisi ve profilaksisi için hayatın ilk günlerinden itibaren klinik kullanıma giren, klinik ve deneysel çalışmalarda nöroprotektif etkileri gösterilen kafeinin, hiperbilirubinemiye bağlı n rotoksisitedeki etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisite oluşturulmuş yenidoğan rat astrosit hücre kültüründe kafeinin etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

## GENEL BİLGİLER

### SARILIK ve BİLİRÜBİN METABOLİZMASI

Sarılık, yenidoğan döneminde en sık karşılaşılan sorunlardan birisidir ve büyük bir kısmı selim seyirli olup sekelsiz iyileşir. Ancak bilirübinin potansiyel toksik etkileri nedeniyle sarılıklı yenidoğanlar ciddi hiperbilirübinemi, bilirübin ensefalopatisi ve kernikterus riski açısından yakından takip edilmelidir (31).

Bilirübinin %75'i dolaşımdaki eritrositlerin, %25'i ise miyogloblin, sitokrom, katalaz (CAT), siklooksijenaz, peroksidaz ve triptofan pirolaz gibi hem proteinlerinin yıkımı sonucu oluşur. Bir gram hemoglobinin yıkımından 35 mg bilirübin açığa çıkmaktadır. Yenidoğanlarda günlük 8-10 mg/kg olan bilirübin yapımı erişkindeki düzeyin yaklaşık ikibuçuk katıdır (8,32,33).

Bilirübin dolaşımında dört şekilde bulunabilir:

1. Albumine bağlı indirekt bilirübin
2. Albumine bağlı olmayan indirekt bilirübin (nörotoksik etkilerden sorumludur)
3. Direkt bilirübin (bilirübin monoglukoronid ve bilirübin diglukoronid olarak bulunur, suda çözünür, lipofilik olmadığı için kan beyin engelini geçemez)
4. Delta bilirübin (albumine kovalent olarak bağlanmış direct bilirübindir. Uzamış kolestazlarda yaşamın ikinci haftasından sonra oluşur, özel yöntemlerle ölçülebilir) (34).

Eritrositlerin yıkımı retiküloendotelial sistemde olur. Hem oksijenaz enzimi tarafından hem oksidasyonu sonucu hem halkası açılır. Birinci karbon atomunun karbonmonoksit (CO) şeklinde kaybı ile bir safra pigmenti olan biliverdin meydana gelir. Bu reaksiyon vücutta tek CO oluşan reaksiyondur ve soluk havasında CO ölçümü ile hem yıkımı ve bilirübin oluşum hızını belirlemede kullanılır. İkinci aşamada sitozolik bir enzim olan biliverdin redüktaz katalizörlüğünde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ile birlikte biliverdinden bilirübin meydana gelir. Oluşan bilirübin suda erimeyen, konjuge olmamış bilirübindir ve indirekt bilirübin olarak adlandırılır (1,8,33).

İndirek bilirubin, lipofilik özelliği nedeniyle plasenta, kan beyin bariyeri, hepatosit membranı gibi biyolojik membranları rahatça geçer. Retikuloendotelial sistemde oluşup dolaşıma geçen bilirubinün önemli bir kısmı serumda geri dönüşümlü olarak albumine bağlanır (1). Konjuge olmamış bilirubin albumin üzerinde yüksek afiniteli ve düşük afiniteli iki farklı bölgeye bağlanır. Albumine bağlanmayan az miktardaki serbest bilirubin ise yağda çözünebilme özelliğinden dolayı dokulara yerleşebilmektedir. Albumine bağlı bilirubin karaciğere gelir, hepatosit membran reseptörlerine bağlanarak hücre içine girer. Hepatosit içinde bilirubin başlıca ligandine (Y- proteinine) ve diğer sitozolik bağlayıcı proteinlere bağlanır. Konjuge olmamış bilirubinün pH 7.4'te suda eriyebilirliği çok düşüktür. Bilirubin konjugasyonu karaciğer hücrelerinin düz endoplazmik retikulumunda olur. Burada bulunan üridildifosfat glukronil transferaz (UDPGT) enzimi aracılığıyla, bilirubin monoglukuronid oluşur. Daha sonra da transglukuronidaz enzimi aracılığıyla bilirubin diglukronid meydana gelir (34). Sonuç olarak bilirubin karaciğerde, suda eriyen ve vücuttan atılabilen şekli olan konjuge bilirubine dönüştürülmüş olur. Konjuge bilirubin kanaliküler membrandan bir taşıyıcı protein yardımı ile safra içine atılır (8,34). Bağırsağa geçen konjuge bilirubin tekrar emilmezken; indirekt bilirubin, kolesterol, tiroksin ve diğer bazı maddelerle birlikte enterohepatik dolaşıma girer. Bilirubinün monoglukuronid ve diglukuronid formları stabil moleküller olmadıklarından; bağırsaktaki alkali ortamda non-enzimatik olarak, mukozal yüzeyindeki alfa-glukuronidaz ile enzimatik olarak indirekt bilirubine dönüşüp karaciğere geri döner (34,35). Bu durum karaciğerin bilirubin yükünü arttırmaktadır (8). Bağırsağa geçen bilirubinün yaklaşık %25'inin geri emildiği düşünülmektedir. Bilirubin metabolizmasının bu enterohepatik fazı, yenidoğan sarılığında önemli rol oynamaktadır (33,35). Bebeğin beslenmesinin düzeltilmesi ile enterohepatik dolaşım azaltılabilmektedir. Yenidoğan bağırsak lümeninde konjuge bilirubin, bakteriler tarafından tekrar geri emilemeyen sterkobiline dönüştürülmektedir (1). Bilirubinoidlerin büyük bir bölümü bağırsaklardan, küçük bir kısmı ise kolondan geri emilip karaciğer ve böbrekler tarafından atılmaktadır (35).

İntrauterin dönemde karaciğerin bilirübini dolaşımdan alma ve konjuge etme yeteneği kısıtlıdır. UDPGT aktivitesi fetal karaciğerde 17-30. gebelik haftaları arasında erişkin değerlerinin yalnızca % 0.1'i kadardır, 30-40. gebelik haftaları arasında artarak erişkin değerinin % 1'ine ulaşır. Doğumdan sonra da aktivitesi artarak 6-14 hafta sonra erişkin değerlerine ulaşır. Fetal dönemde bilirubin ekskresyonunda ana yol plasentadır. Plasentadan geçen indirekt bilirubin anne karaciğerinde metabolize edilerek atılır. Bu nedenle yenidoğan bebekte ciddi hemolitik hastalığı olanlar hariç doğumda sarılık görülmesi enderdir (8).

### **Yenidoğan Sarılıkları**

Total serum bilirubin (TSB) düzeyi 5-6 mg/dl'ye ulaşana kadar yenidoğanın cildinde sarılık görülmemektedir. Büyük çocuk ve erişkinlerde ise TSB 2 mg/dl'ye ulaştığında cilt ve sklerada sarılık görülmektedir. Yenidoğan sarılıkları, indirekt hiperbilirubinemi (konjuge olmamış bilirubin) ve direkt hiperbilirubinemi (konjuge olmuş bilirubin) olarak ikiye ayrılır (33).

Yenidoğan bebeklerin büyük çoğunluğunda yaşamın ilk günlerinde belirgin indirekt hiperbilirubinemi görülmektedir (1,32). Yenidoğanda indirekt hiperbilirubinemi nedenleri Tablo 1'de belirtilmiştir (33). Sarılık 14-21 günden daha uzun sürerse neonatal kolestaz olabileceği düşünülmeli; serum total ve direkt bilirubin düzeyleri ölçülmelidir (36).

Neonatal kolestaz yenidoğanda safra akımının azalması sonucunda gelişen konjuge hiperbilirubinemi olarak tanımlanmaktadır. Yenidoğanda konjuge bilirubinemi, TSB düzeyi <5 mg/dl iken direk/konjüge bilirubin konsantrasyonunun 1 mg/dl'den fazla olması ya da TSB'i >5 mg/dl ise TSB'nin %20'sinden fazla olması olarak tanımlanmaktadır (37). Neonatal kolestazın en sık nedenleri idiyopatik neonatal hepatit ve biliyer atrezidir (36).



**Tablo 1.** Yenidoğanda indirekt hiperbilirübineminin nedenleri (33)

<b>1. Bilirübin yapımında artış</b>	<b>2. Bilirübin klirensinde azalma</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Hemolitik hastalık</b> İmmün mekanizmalar Rh alloimmünizasyonu ABO ve diğer kan grubu uyumsuzlukları</li><li>• <b>Hereditör</b> Eritrosit membran defektleri Eritrosit enzim defektleri Hemoglobinopatiler</li><li>• <b>Diğer</b> Sepsis Yaygın damar içi pıhtılaşma Ekstravazasyon Polisitemi Diabetik annenin makrozomik bebeği</li><li>• <b>Enterohepatik sirkülasyonda artış</b> Anne sütü sarılığı Pilor stenozu İnce/ kalın barsak obstrüksiyonu, ileus</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Prematürite</b></li><li>• <b>Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği</b></li><li>• <b>Yenidoğanın metabolik hastalıkları</b> Crigler-Najar Sendromu Gilbert Sendromu Tirozinemi Hipermetioninemi</li><li>• <b>Metabolik</b> Hipotiroidizm Hipopituitarizm</li></ul>

## **Bilirubin Toksikitesi**

Bilirubin düzeyi fizyolojik sınırların üstüne çıkıp serumda aşırı yükseldiğinde bilirubin toksisitesi gelişir (31,38,39). Bazı ilaçların (sulfonamidler) bilirubin ile yarışarak albümine bağlanması, beyin kan akımında ve kan-beyin bariyerinin geçirgenliğinde artış, bilirubinün beyin dokusuna geçişini kolaylaştıran faktörlerdir. Hiperozmolarite, anoksi, hiperkarbi, prematürelilik gibi durumlarda kan-beyin bariyerinin devamlılığı bozulduğundan albümine bağlı bilirubin de beyne geçebilmektedir (1,31,40). Yüksek bilirubin düzeyleri ve bilirubine uzun süre maruziyet bilirubinün toksik etkisini daha da arttırmaktadır.

Bilirubinün toksik etkisi için enzim sistemlerinin ve hücre düzenleyici reaksiyonların inhibisyonu gibi pek çok mekanizma ileri sürülmüştür (40). Mitokondri membranında bulunan sitokrom oksidaz, malat dehidrogenaz, monoamin oksidaz gibi enzimler bilirubini oksidasyonla detoksifiye etmektedir. Böylece beyin dokusu bilirubinün toksik etkisine karşı kendisini korumaktadır. Yenidoğanlarda bu enzimlerin aktivitelerinin matür hayvan modellerine göre daha düşük olduğu; bu nedenle yenidoğanların bilirubin nörotoksitesine daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (38).

## **Bilirubin Nörotoksitesinin Hücresel ve Moleküler Mekanizmaları**

Bilirubin nörotoksitesinin hücresel ve moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, beyinde bilirubine bağlı oluşan nöronal disfonksiyon, bilirubinün protein fosforilasyonunu inhibe etmesi ile açıklanmaktadır (1,41,42).

Bilirubin mitokondride oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek sitotoksik etki göstermektedir (3). Bilirubine bağlı olarak hücrede serbest radikal oluşumu, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunun artışı, protein karbonilleri ve *4-hidroksi-2-nonenal* düzeyinin artışıyla sonuçlanmaktadır. Birçok deneysel çalışmada bu maddeler bilirubine bağlı oksidatif hasarın göstergesi olarak kullanılmıştır (23,41). Brito ve arkadaşları (23) glukoursodeoksikolik asidin, bilirubine bağlı oluşan lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu azaltarak nöroprotektif etkili olduğunu göstermişlerdir.

Biyolojik sistemlerde sürekli oluşan serbest radikaller, antioksidan savunma mekanizmaları ile nötralize edilerek zararlı etkileri engellenmeye çalışılır. Yüksek bilirubin düzeylerinin beyinde serbest radikal oluşumunu arttırarak oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir. Hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olan redükte glutatyon, glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol almaktadır (41,43,44).

Bilirubin nörotoksisitesi için öne sürülen mekanizmalardan birisi de glutamat reseptör aracılı oluşan hasardır (25). İn vivo çalışmalarda indirekt bilirubin indüklediği beyin hasarında beyinde primer eksitator nörotransmitter olan glutamat eksitotoksisitesinin rol oynadığı ortaya konmuştur (3,45). Yüksek bilirubin düzeyleri glutamatın sinaptik aralığa sekresyonunu arttırmakta ve sinaptik aralıktan da geri alımını azaltmaktadır. Ekstrasellüler konsantrasyonu artan glutamat, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini aşırı uyararak eksitotoksisiteye neden olmaktadır (23,41,46). Grojean ve arkadaşlarının çalışmasında (25) bu teoriyi destekler şekilde NMDA reseptör antagonisti MK-801'in bilirubin nörotoksisitesinde koruyucu etkili olduğu bildirilirken; Shapiro ve arkadaşlarının çalışmasında (45) bu koruyucu etki gösterilememiştir.

Bilirubinün sinir hücrelerinde apoptozise yol açarak nörotoksik etkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (24,25). Apoptozis, hücrede kromatin kondensasyonu, çekirdek ve sitoplazma parçalanması ile karakterize aktif hücre ölümüdür (47). İndirekt bilirubin, sinir hücrelerinde mitokondrial transmembran potansiyelini azaltmakta, membran geçirgenliğini arttırmakta ve sitokrom c salınımına yol açmaktadır. Aynı zamanda indirekt bilirubin mitokondrial membranda apoptotik Bax translokasyonuna ve apoptozisi inhibe eden Bcl-2'nin inaktivasyonuna neden olmaktadır. Sitolitik sitokrom c, apoptozu aktive edici faktöre bağlanıp kaspazları aktive etmekte ve apoptoz kaskadının başlamasını sağlamaktadır (4,41).

Bilirubin, protein ve DNA sentezini, protein fosforilasyonunu inhibe ederek, enerji metabolizmasında kalsiyum dengesinde bozulmaya yol açarak nöron hasarına neden olmaktadır. Bilirubinün toksik etkisiyle nöron hücresinin yüzeyindeki fosfatidil serin tabakasının kaybı, nöronun fagositoz için hedef hücre olmasına neden olmaktadır (24,41).

İndirekt bilirubin, tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1 beta'nın (IL-1 $\beta$ ) ekspresyonunu stimüle ederek inflamatuvar yanıtı neden olur (46). Fernandes ve arkadaşları (46) astrosit hücre kültürü modelinde IL-10'un, *Nuclear factor-kappa B'nin* (NF- $\kappa$ B) translokasyonunu engelleyerek indirekt bilirübine bağlı artan inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu engellediğini göstermişlerdir.

### **Akut Bilirubin Ensefalopatisi ve Kernikterus**

Yenidoğan bebeklerin %8-11'inde ciddi hiperbilirubinemi gelişmektedir (48). Bilirubin ensefalopatisi veya kernikterus neonatal hiperbilirubineminin ciddi komplikasyonları olup; zamanında takip ve tedavi edilmezse ölümlerle sonuçlanabilmektedir (32,42,45,48).

İndirekt bilirubin yüksek seviyelere ulaştığında bazal ganglionlar, beyin sapındaki iştme ile ilgili nukleuslar, serebellum ve hipokampustaki purkinjye hücrelerinde birikip hasara neden olmaktadır. Ağır eritroblastozis fetalisten ölen sarılıklı bebeklerin otopsilerinde beyinde bilirubinle boyanmış alanlar olduğu ve bunların belirli bir dağılım gösterdiği saptanmıştır (33,49).

Akut bilirubin ensefalopatisi terimi, doğumdan sonraki ilk haftada görülen bilirubin toksisitesinin akut belirtilerini tanımlamak için, kernikterus ise bilirubin toksisitesinin kronik ve kalıcı klinik sekellerini tanımlamak için kullanılmaktadır (33,41,50). Son yıllarda bilirubin ensefalopatisi ile ilişkili değişiklikleri tanımlamak için bilirubin indüklediği nörolojik disfonksiyonlar (BIND) teriminin kullanılması önerilmiştir. BIND, izole işitsel nöropati, hareket bozuklukları, distoni, bilişsel bozukluklar, hafif zeka geriliği gibi hafif ve belirsiz nörolojik, akut bilirubin ensefalopatisi ve postikterik nöromotor/işitsel sekelleri de içine alan geniş bir spektrum gösterir (33).

### ***Akut Bilirubin Ensefalopatisi***

İndirekt bilirubinun santral sinir sistemi (SSS)'nde depolanması, sarı renkte bir boyanmaya ve bilirubin ensefalopatisi ile karakterize nörolojik disfonksiyona yol açmaktadır (24). Akut bilirubin ensefalopatisi sıklıkla geri dönüşümlü, erken dönemde hipotoni, letarji, zayıf emme, anormal beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyeli (BAEP);

geç dönemde hipertoni, opistotonus, tiz sesle ağlama, batan güneş manzarası, ateş ve BAEP’te kötüleşme ile karakterize bir durumdur (49).

### ***Kernikterus***

Bilirubinün indüklediği beyin hasarının nöropatolojik bulguları ile birlikte klinik bulgularını da kapsayan kompleks bir sendromdur (51). En sık etkilenen bölgeler bazal ganglionlar (özellikle globus pallidus, subtalamik çekirdek), hipokampus, substantia nigra, çeşitli kranial sinirler (özellikle okülomotor, vestibüler, koklear, fasiyal sinir çekirdekleri), çeşitli beyin sapı çekirdekleri, özellikle ponsun retiküler yapısı, serebellar çekirdekler ve medulla spinalisin ön boynuz hücreleridir (33). Başlıca risk faktörleri, serum bilirubin düzeyinin yüksekliği, hiperbilirubineminin süresi, bilirubin albümin bağlanmasının azalması, gebelik yaşının düşüklüğü, hemoliz varlığı, sepsis, asidoz ve nöronların bilirubin toksisitesine olan duyarlılığıdır (31). Kernikterusun nöropatolojik lezyonları daha çok globus pallidus, internal kapsül ve talamus bölgelerinde MR ile görüntülenmiştir (1). Anormal motor hareketler, işitme ile ilgili bozukluklar, özellikle yukarı bakış paralizisine neden olan okülomotor sinir hasarı, süt dişlerinde enamel displazi kernikterusun klinik tetradını oluşturmaktadır (52).

### **Bilirubin Toksisitesinin Patofizyolojisi**

Nörotoksisiteden, beyine, interstisyel sıvı ve beyin omurilik sıvısına rahatça geçebilen indirekt bilirubin sorumludur. Bilirubin yapım hızının kan ve dokuların tamponlama kapasitesini aşması, albüminin bilirubin bağlama kapasitesinde azalma, kan-beyin bariyerinde geçirgenliğin artması (hipertonsite, menenjit, hipoksemi) bilirubinün beyin dokusuna geçişini arttırmaktadır (33). Perinatal dönemde geçirilen hipoksi ve/veya iskemi bilirubinün indüklediği beyin hasarına yatkınlığı daha da arttırmaktadır (3). Bilirubin önce sinir terminallerine bağlanır, membran potansiyelini düşürür, sinir iletisini azaltır; daha sonra sinir terminalleri ve aksonlara penetre olur ve retrograd olarak nöronlara geçer (33). Nöronlara geçen bilirubin agregasyon, presipitasyon ve kristalizasyon ile toksik etkiye neden olmaktadır (42). Bilirubin nörotoksisitesinde önce hücre ölümü olup daha sonra bilirubin hücreye bağlanmakta ya da bilirubin hücre içine girdikten sonra hücre ölümüne sebep olabilmektedir. Son

yıllarda bilirubin nörotoksitesi ile ilgili çalışmalar daha çok ikinci görüşü desteklemekteyse de hücre düzeydeki araştırmalar yoğun olarak devam etmektedir (39).

## **Tedavi**

Yenidoğan sarılığında tedavinin primer hedefi akut bilirubin ensefalopatisini önlemektir. Ciddi hiperbilirubinemi riskinin belirlenmesi, yakın izlem ve gerektiğinde acil tedavi uygulanması tedavinin ana prensipleridir (50). Fototerapi ve kan değişimi, tedavinin temelini oluşturmaktadır. Farmakolojik tedaviler de kullanılabilir. Farmakolojik tedavide bilirubin klirensinin hızlandırılması (fenobarbital ile glukuronil transferaz enzim indüksiyonu ve aktif kömür/agar ile enterohepatik dolaşımın azaltılması) ve bilirubin yapımının azaltılması (Hem oksijenaz inhibitörleri, intravenöz immünglobülin) amaçlanır (53).

Hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksitenin önlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda L-karnitin (22), glikoursodeoksikolik asit (23), ursodeoksikolik asit (24), MK-801 (25), taurin (26), deksametazon (27), N-asetil sistein (28), ginkgo biloba (29), eritropoetin (Epo) (30)'in nöroprotektif etkileri gösterilmiştir; ancak hiç biri klinik uygulamaya girmemiştir.

## **Bilirubin ve Oksidatif Stres**

Bilirubin ile ilgili çalışmalar incelendiğinde bilirubinün hücresel düzeyde çift yönlü bir etkisinin bulunduğu, fizyolojik düzeylerde antioksidan etki gösterirken, patolojik seviyelerde oksidatif zedelenmeye yol açtığı düşünölmektedir (23). Hücre içinde reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ve temizlenmesi arasındaki dengenin bozulmasıyla gelişen oksidatif stres, sinir sisteminde serebral iskemi, eksitotoksosite ve nörodejeneratif süreçlerin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (54).

Bilirubinün düşük düzeylerde reaktif oksijen radikallerine bağlı hasarı önleyerek antioksidan etki göstermesi nedeniyle fizyolojik sarılığın doğal koruyucu etkileri olduğuna inanılmaktadır (2,23,28,42,54). Stocker ve arkadaşlarının çalışmasında (55) ise bilirubinün hidroksil radikallerini temizleyici etkisi rapor edilmiştir. Lanone ve arkadaşlarının çalışmasında (54) ratlara önce E.coli endotoksini, ardından tek doz

bilirubin IV bolus uygulandığında, bilirubinin endotoksemiye bağı karaciğer disfonksiyonu ve mortaliteye karşı koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir.

Yenidoğanlarda hepatik transport veya konjugasyonun yetersiz maturasyonu, enterohepatik dolaşım ve hemolizin artmasıyla yüksek düzeye ulaşan bilirubin toksik etkiye neden olur. İndirekt bilirübine maruziyet ile oluşan reaktif oksijen radikallerinin üretimi, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, glutatyon homeostazında bozulmanın sonucunda hücrelerde oksidatif hasar gelişir (28). Glutatyon, hücrenin en önemli antioksidan maddesidir. Hücresel antioksidan defans sistemi glutatyon tarafından sağlanır. Astroglial hücrelerde hücre içi glutatyon miktarı nöronlardan daha fazladır. Bu nedenle oksidan hasara karşı astrositler daha güçlüdür (28,56). Brito ve arkadaşları (28) önemli bir glutatyon prekürsörü olan N-asetil sisteinin nöronlarda bilirübine bağı oluşan oksidatif hasara karşı nöroprotektif etkisini göstermişlerdir.

### **Hücre Kültürlerinde Bilirubinin Toksik Etkisi**

Primer kültürlerde yaşayan organizmalardan elde edilen hücreler 24 saatten uzun süre varlığını sürdürebilmektedir. Sinir hücre kültürleri primer nöron, astrosit, oligodentrosit ve mikroglia kültürü olmak üzere dörde ayrılır. Sinir hücre kültürlerinde toksik maddelere bağı gelişen sitotoksik etki ve mekanizması değerlendirilmektedir (57).

Bilirubin astrositler, nöronlar, eritrositler gibi farklı hücre tiplerine toksik etkilidir (44). Astrosit ve nöron hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda bilirübine bağı apoptoz ve nekroz geliştiği gösterilmiştir (5,22,24,28). Nöronlar, glutatyon içeriğinin azlığı yanında bilirübini okside etme ve hücreden uzaklaştırma yeteneklerinin yetersizliği nedeniyle bilirubinin toksik etkisine astrositlerden daha duyarlıdır (5,24,28,39). Astrositlerin belirli antioksidanları yüksek konsantrasyonlarda bulundurabildiği ve bu nedenle oksidatif hasara nöronlardan daha dirençli olduğu bilinmektedir (56).

İn vivo ve in vitro sistemlerde toksik etkinin farklı bilirubin düzeylerinde ortaya çıktığı gösterilmiştir. İn vivo sistemlerde kan-beyin ve kan-BOS bariyerleri, indirekt bilirubinin hücrelere penetrasyonunu sınırlayarak toksisite gelişimini önlemektedir (2). İn vitro çalışmalarda kullanılan sinir hücre kültürleri sitotoksik etkiyi

değerlendirmek için basit ve yararlı yöntemlerdir (57).

Deneyel kernikterus modellerinde astrositlerin iyon homeostazisinde, birçok nöroaktif bileşiklerin sentez ve salgılanmasında, nöronlara metabolik ve trofik destek sağlanmasında, hasarlı nöronlardan salınan toksik maddelerin temizlenmesinde etkili oldukları gösterilmiştir. Bilirübinin nöronlarda belirgin kalıcı hasara yol açarken astrositlerde daha çok geri dönüşümlü hasar oluşturduğu gösterilmiştir (5,56). Tüm bu özellikler bilirubin ensefalopatisinde astrositlerin önemli bir role sahip olduğunu ve tedavi modellerinde potansiyel hedef olabileceğini düşündürmektedir.

### **Bilirubin Toksisitesini Etkileyen Faktörler**

Hiperbilirubinemi ile ilişkili nörotoksisiteye duyarlılığı artıran pek çok faktör vardır. Bu nedenle basit olsa bile yalnızca total veya indirek bilirubin konsantrasyonuna dayandırılan tedavi kararları risk faktörlerinin varlığında yeterli olmayacaktır. Beyindeki bilirubin konsantrasyonu ve bilirubine maruz kalınan süre bilirubinün nörotoksik etkilerinin en önemli belirleyicileridir. Bilirubin ensefalopatisinde en önemli etkenler, bilirubinün üretim hızı ve SSS matürasyonudur (39).

Albümin gram başına maksimum 8.5 mg bilirubin bağlayabilir. Eğer serum albümin konsantrasyonu düşükse bilirubin bağlanması tehlikeye girer ve kernikterus riski artar (31). Enfeksiyon, asidoz, hiperoksi, sepsis, prematürite ve hiperozmolarite gibi kan beyin bariyerini değiştiren durumlar bilirubinün beyne girişini arttırmaktadır (39).



## KAFEİN ve ETKİLERİ

Beslenmede oldukça sık tüketilen ve önemli bir uyarıcı olan kafeinin sağlık üzerine olumlu ya da olumsuz etkileri, son yılların en çok araştırılan konulardan biridir. Kafein doğal olarak pek çok bitkinin meyvesinde, tohumunda ve yaprağında bulunur. Bununla beraber en bilinen kaynakları çay yaprakları, kahve ve kakao çekirdekleri ile kola tohumlarıdır (58-60). Kafein tüketimine ilişkin ilk bilgiler MÖ 2700'lü yıllara rastlar. Bu yıllardaki kafein kaynağı Çin'de yaprakları kaynatılarak içilen çaydır. Ancak, kafeinin insan yaşamına gerçek anlamda girişi, 8. yüzyılın ortalarında Etyopyalı çoban Kaldi'nin kahve bitkisini keşfetmesi ile olmuştur (59).

Kafein, esas olarak prematüre apnesi ve preekstübasyon döneminde kullanılan bir ilaçtır. Prematüre apnesinde yaklaşık 40 yıldır kullanılmaktadır. Kafein, kafein sitrat şeklinde bulunur. Aktif maddesi kafein baz olup, kafein sitrat ürünlerinin yarısı kafein baz şeklindedir. Hem intravenöz, hem de oral alımdan 2 saat sonra kanda pik düzeye erişir. İlacın eliminasyonu esas olarak böbreklerden olmakla birlikte, karaciğerde de metabolize edilir. Bu nedenle kolestaz, karaciğer yetmezliği ve böbrek yetmezliğinde ilacın yarı ömrü uzar (9).

Ksantinlerin etki mekanizması adenosin reseptörlerine karşı yarışmalarıdır. Adenosin, özellikle hipoksi sırasında üretilen ve etkisini değişik adenosin reseptörleri (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> ve A<sub>3</sub>) üzerine bağlanarak gösteren bir nöral inhibitördür. Ksantinler bu reseptörlere kompetitif olarak bağlanırlar ve solunum merkezini uyararak dakika ventilasyonunu, CO<sub>2</sub> duyarlılığını ve diyafragma aktivitesini arttırlar; hipoksi ve periyodik solunum nedeni ile oluşan solunum depresyonunu azaltırlar (61,62).

Kafeinin tedavi edici plazma konsantrasyonu 8-20 µg/ml'dir ve bu düzeyleri sağlayabilecek ilaç yükleme dozu 20-40 mg/kg, idame dozu ise 5 mg/kg'dır. Eğer 5 mg/kg dozunda yeterli yanıt alınamazsa, idame dozu 20 mg/kg'a dek çıkarılabilir (63-65). Kafeinin yarı ömrü 100 saat'tir. Bu nedenle günlük plazma konsantrasyonunda dalgalanma olması beklenmez, dolayısı ile kan düzeyine bakmak gerekmez (63). Bebeğin ağırlığı değişikçe doz da ayarlanmalıdır. Yarı ömrü uzun olduğu için ilaç kesildikten sonra apne olabilir, bu nedenle bebekler ilaç kesildikten sonra apne açısından gözlenmelidir. Nadiren taşikardi, takipne, tremor, opistotonus, tonik-klonik konvülziyonlar, kusma, beslenme intoleransı, gastrik boşalmada gecikme,

hiperglisemi, hipokalemi, sarılık gibi yan etkiler gözlenebilir. Bu tür yan etkiler ilaç dozu kanda 50-100 microgram/ml'i aştığında gözlenir (64).

Bebeğin gebelik yaşı azaldıkça prematüre apnesi sıklığı artar. Prematüre apnesi gebelik yaşı 34-35 hafta olan bebeklerin %7'sinde, 29 hafta ve 1000 gr altı bebeklerin neredeyse %100'ünde gözlenir. Genellikle 36-40 gebelik haftasından sonra görülmez; ancak çok prematüre bebeklerde postkonsepsiyonel 43-44 haftaya dek semptomlar gözlenebilir. Kafeinin bir diğer kullanım alanı da preekstübasyon dönemidir. Preterm bebeklerde yapılan bir çalışmada, planlı ekstübasyondan 24 saat önce kafein sitratın 20 mg/kg'lık yüksek doz ve 5 mg/kg'lık düşük doz rejimleri incelenmiş ve yüksek doz rejiminin bebeklerde mortalite ve morbiditeyi etkilemeden ekstübasyon başarısızlığını azalttığı gösterilmiş (65). Yeni yapılan bir çalışmada (64), preterm bebeklerde kullanılan kafein sitratın yüksek doz rejiminin (40 mg/kg/doz yükleme, 20 mg/kg/doz idame), düşük doz rejimine (20 mg/kg/doz yükleme, 10 mg/kg/doz idame) kıyasla preterm bebeklerde ekstübasyon başarısızlığında önemli azalma sağladığı ve bebeklerin daha az apne epizodlarına girdiği saptanmış.

Kafeinin, adenzinin nörotransmitter sistemdeki etkilerini önleyerek motor aktivasyonu ve uyanıklığı sağladığı, nöronal sinyal regülasyonunda eksitatör etkili glutamati A<sub>2a</sub> reseptör blokajıyla etkisiz hale getirerek eksitotoksisteyi önlediği gösterilmiştir (13,20,21). Adenzin, erişkin insan beyinde hipoksi ve inflamasyon anında artan nöroprotektif bir maddedir. Fetal dönemde de beyin ve kalp için protektif etkilidir; ancak yenidoğan döneminde beyaz cevhere zararlı etkileri olduğu düşünülmektedir. Zira, adenzin reseptörü olmayan farelerde kronik hipokside ventriküler genişlemenin olmadığı; reseptörleri homozigot ve heterozigot olan farelerde ise ventrikülomegali olduğu, adenzin agonisti olan siklopentadenozin uygulanan ratlarda ise periventriküler beyaz cevher hasarı geliştiği görülmüştür (66,67).

Deneyisel çalışmalarda, yenidoğan ratlarda kronik kafein uygulamasının, prefrontal korteks piramidal nöronlarında dendrit uzunluğu ve sinaps sayısını arttırdığı, bu etkinin puberteye kadar devam ettiği ve dikkat, üç boyutlu öğrenme gibi bilişsel beyin fonksiyonlarını etkileyebileceği sonucuna varılmış (15). Yenidoğan ratlarda hipokside sonra uygulanan metilksantinlerin gelişmekte olan rat beyinde nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiş (10). Başka bir çalışmada kronik hipoksiye

maruz bırakılan yenidoğan ratlarda kafeinin hipomiyelinasyon ve ventrikülomegaliyi azalttığı saptanmış (11). Bir diğer çalışmada hiperoksiye maruz bırakılan ratlarda kafeinin, antioksidan ve antiapoptotik etkiyle farklı gelişim sürecindeki nöron hücrelerini hiperoksik hasardan koruduğu, proliferasyon kapasitesini geliştirdiği bulunmuştur (12).

Kafeinin antiinflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, prematür apnesinde kullanılan kafeinin yenidoğan rat akciğerinde TLR2, TLR4 ve TLR9 düzeylerine etkisi incelenmiş. Kafein alan grupta, TLR 2 ve TLR4 düzeyleri azalırken, TLR9 düzeyinin yüksek olduğu saptanmıştır (68).

Klinik çalışmalarda da preterm bebeklerde kafein tedavisinin nöroprotektif ve antiinflamatuvar etkili olduğu gösterilmiştir. Apne profilaksi/tedavisi için kafein alması planlanan preterm bebeklerde intravenöz kafein tedavisinin serebral kortikal aktiviteyi arttırdığı saptanmıştır (69). Doğum ağırlığı < 1251 gr olan, üç günlükten itibaren kafein verilen pretermelerde düzeltilmiş yaş 38-42 haftada beyin MR incelemede beyaz cevher mikro yapısının kontrol grubuna göre belirgin gelişmiş olduğu bulunmuştur (18). Kafeinin geç etkilerini araştıran randomize plasebo-kontrollü çok merkezli bir çalışmada, neonatal dönemde üç günlükten itibaren kafein uygulanan 937 bebekte 18-21 aylıkken serebral palsy ve nörogelişimsel bozukluklarda belirgin azalma saptanmış, aynı bebekler 5 yaşında tekrar incelendiğinde ise bu farklılığın kaybolduğu görülmüştür (17,70). Kafeinin antiinflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada annelerine uygulanan kafeinin bebeklerin kord kanı monositlerinde TNF- $\alpha$ 'yı azalttığı gösterilmiştir (19).

Çalışmalarda kafeinin nöroprotektif etkileri antiapoptotik, antioksidatif, anti-inflamatuvar etkilerine ve glutamat salınımını inhibe ederek eksitotoksisteyi azaltmasına bağlanmıştır (10-13,19-21).

Bilirübine bağlı nörolojik hasar ile ilgili mekanizmalar ve bilirübünün astrosit hücre yaşamı/ölümü üzerine olan etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bu aşamada bilirübine bağlı toksik etkiyi azaltacak ajanların saptanması önem kazanmaktadır. Antioksidan ve nöroprotektif etkileri bilinen kafeinin, astrositlerde bilirubin nörotoksitesine etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada yenidoğanlarda bilirubin nörotoksitesinin önlenmesi ve tedavisinde kafeinin etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 18/11/2014 tarih ve 07 sayı ile onayı alınan bu deneysel çalışma, Şubat 2015- Nisan 2015 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada tek anneden 5-8 gr ağırlığında doğan iki günlük Wistar-albino ratlardan elde edilen primer astrosit hücre kültürü kullanıldı.

### Çalışma Grupları

**Grup I, Kontrol grubu (n:6):** Herhangi bir ilaç uygulanmadı.

**Grup II, Bilirubin grubu (n:6):** Astrosit hücre kültürüne 50 µM bilirubin (*Sigma Aldrich, B 4126-1G*) 24 saat süreyle uygulandı.

**Grup III, Kafein grubu (n:6):** Astrosit hücre kültürüne 100 µM kafein (*Sigma Aldrich, St Louis, USA*) 24 saat süreyle uygulandı.

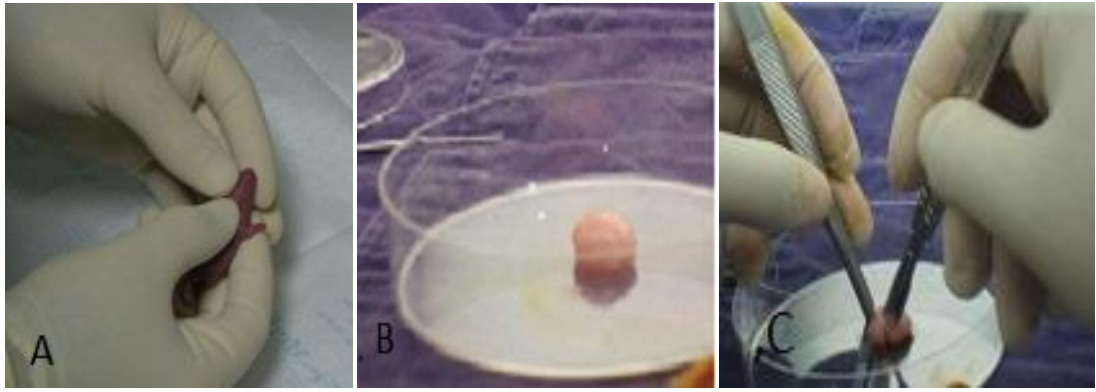
**Grup IV, Kafein-Bilirubin grubu (n:6):** Astrosit hücre kültürüne 100 µM kafein eklendikten dört saat sonra 50 µM bilirubin ilave edilip 24 saat süreyle uygulandı.

**Grup V, Bilirubin-Kafein grubu (n:6):** Astrosit hücre kültürüne 50 µM bilirubin eklendikten dört saat sonra 100 µM kafein ilave edilip 24 saat süreyle uygulandı.

### Astrosit Hücre Kültürünün Hazırlanması

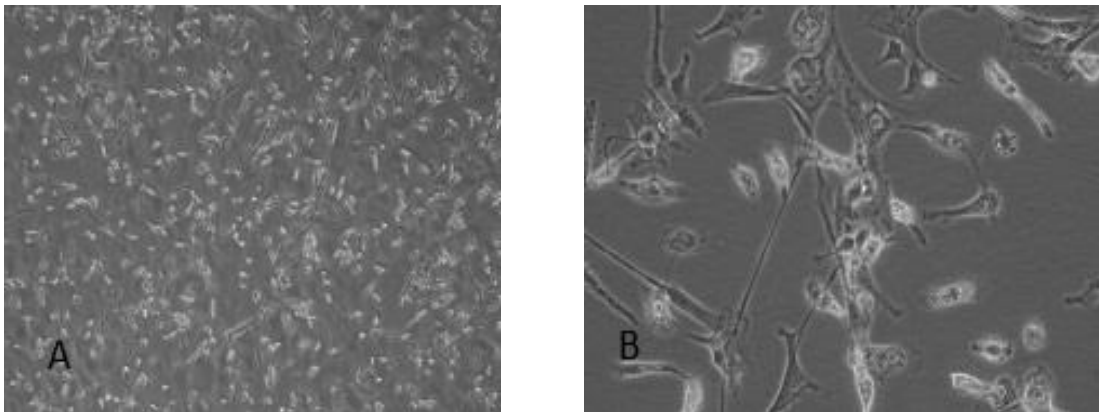
Astrosit primer hücre kültürü, %95'in üzerinde saflıkta astrosit hücrelerinin elde edildiği kanıtlanmış olan Mc Carthy ve de Vellis yöntemlerinden modifiye edilerek hazırlanmış Cole de Vellis yöntemi uygulanarak, literatürde tanımlandığı gibi hazırlandı (71,72). İki günlük rat yavrularına anestezi madde kullanılmadan steril koşullarda servikal dislokasyon ile dekapitasyon uygulandı. Beyin dokusu *Hanks buffered salt solution* (HBSS), 100 ml, (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*), 500 µl gentamisin (Gentamisin, 10 mg/10 ml, *Sigma-Aldrich, St Louis, USA*), 5 ml fungizon (*Gibco Antibiotic-Antimycotic, 25 µg/ml amfoterisin B, 100x/100 ml, Invitrogen, New York, USA*) içeren kültür kabına konuldu. Beyin dokusu mekanik olarak parçalanıp (Şekil 1), jöle kıvamına gelene kadar HBSS ile yıkandı. Tripsin 500 µl

(Trypsin/EDTA, 100 ml, %0.05/%0.02, Biochrom, Berlin, Germany), DNaz-I 50  $\mu$ l (DNase I recombinant, RNase-free, 10 U/ $\mu$ l, Roche, Mannheim, Germany) eklenip 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda 60 dk süreyle sallanarak inkübe edildi. Yetmiş mikronluk filtreden geçirildikten sonra elde edilen hücre süspansiyonu polilizin kaplı kültür kaplarına 20 ml *Dubello's Minimal essential medium/f12* (DMEM/F12)(DMEM/Ham's F-12 1:1, 500 ml, Biochrom, Berlin, Germany) besiyerine ekilerek primer nöron hücre kültürü hazırlandı (Şekil 2).



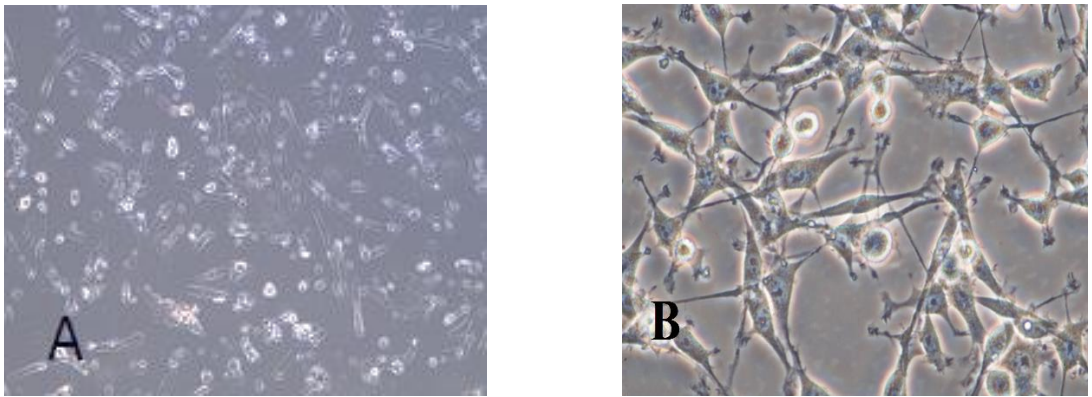
**Şekil 1 (A,B,C):** Beyin dokusunun elde edilmesi ve mekanik olarak parçalanması

Primer nöron hücre kültürleri 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin gelişimi faz kontrast mikroskopunda incelenerek değerlendirildi. Besiyerleri üç günde bir taze besiyeri ile değiştirildi. Çoğalan primer nöron hücre kültürlerinden beşinci günden sonra astrosit hücre kültürleri elde edildi.



**Şekil 2 (A,B):** Faz kontrast mikroskopu primer nöron hücre kültürü **A:** x40, **B:** x100.

Çoğalarak bitişik duruma gelen primer nöron hücre kültürlerindeki besiyeri aspire edilip distile su ile yıkandıktan sonra tripsin eklendi. Kültür kapları mekanik olarak sallandı ve hücrelerin kültür kabı tabanından tamamen kalkması sağlandı. DMEM/F12 eklendikten sonra tüm besiyeri aspire edilip yeni bir kültür kabına konulup; 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde 45 dk süre ile bekletildi. İnkübatörden çıkartıldıktan sonra kültür kaplarındaki besiyeri aspire edilerek taze besiyeri ile 1/3 dilüe edildi ve yeni kültür kaplarına ekim yapıldı. Sadece astrosit hücrelerinin üremesine izin veren astrosit besiyeri ( DMEM-F12), 500 µl gentamisin, 5 ml fungizon, %15 fetal bovine serum (Hyclone, 100 ml, Thermo Scientific, Cromlington, UK), 5 ml L-glutamine (Gibco L-Glutamine-200 mM, 100x/100 ml, Invitrogen, New York, USA), 500 µl insulin (Human Insulin <rh> , 0.5 mg/ml, Biochrom, Berlin, Germany) bu kaplara ilave edildi. Kültür kapları orbital sallayıcıya konularak 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda 80/dakika devirde 24 saat çalkalanarak astrosit kültürününün saflaştırılması, mikroglia ve oligodendrositlerden ayrılması sağlanmaya çalışıldı. Tabandan ayrılarak yüzer duruma geçen mikroglia ve oligodendrositler toplandı. Kültür kabının tabanına yapışık astrosit hücreleri bırakıldı ve astrosit besiyeri değiştirildi. Daha sonra astrosit besiyeri üç dört günde bir değiştirildi. Astrosit hücreleri bitişik duruma gelene kadar çoğaldıktan sonra 1/3 oranında pasajlanarak hücre kültürünün devamı sağlandı ve değişik pasajlara ait astrosit hücre kültürleri kullanıldı (71,72) (Şekil 3).



**Şekil 3 (A,B):** Faz kontrast mikroskobu primer astrosit hücre kültürü **A:** x40, **B:** x100

### **Bilirubin Solüsyonunun Hazırlanması**

Astrosit hücre kültüründe kullanılan indirekt bilirubin 10 ml astrosit besiyerinde çözüldü ve ana stok 100 µl'de 2000 µM olacak şekilde hazırlandı. Bilirubin stok solüsyonu +4 °C'de karanlık ortamda saklandı. Deneyler sırasında istenilen bilirubin konsantrasyon değeri elde edilene kadar stok solüsyonu astrosit besiyeri ile sulandırıldı (2,73).

### **Kafeinin Hazırlanması**

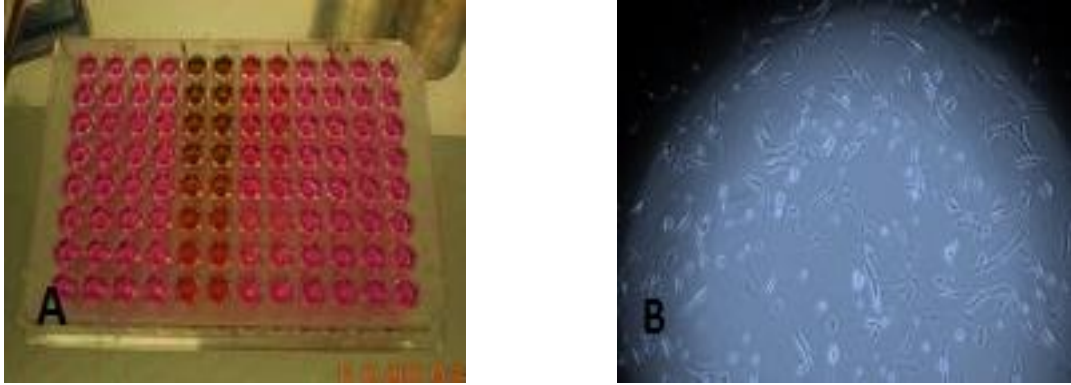
Astrosit hücre kültüründe kafein ana stok 10 mM olacak şekilde hazırlandı.

### **Bilirubin ve Kafein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi**

Astrosit hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta  $3 \times 10^4$  hücre/100 µl astrosit besiyeri içerisinde olacak şekilde ekildikten 24 saat sonra faz kontrast mikroskopunda incelenerek hücrelerin varlığı ve canlılıkları değerlendirildi (Şekil 4). Kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılıp her kuyucukta 100 µl olacak şekilde astrosit besiyeri eklendikten sonra sıfırıncı saat olarak kabul edildi. Sıfırıncı saatteki absorbans ( $A_0$ ) *Cytotox-glo* (Promega) kit kullanılarak Glomaks Sistem (Promega) cihazı ile luminometrik olarak ölçüm yapıldı. Daha sonra tüm plaklardaki besiyerleri uzaklaştırıldı. Her konsantrasyon için altışar kuyucuk olacak şekilde sırasıyla 1000 µM, 800 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 2.5 µM, 1 µM indirekt bilirubin eklendi. Yine her konsantrasyon için altışar kuyucuk olacak şekilde sırasıyla 5000 µM, 2500 µM, 1000 µM, 800 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1 µM kafein eklendi. Kuyucuklardaki sıvı miktarını 100 µl'ye tamamlayacak şekilde astrosit besiyeri ilave edildi. Plaklar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde, karanlık ortamda 48 saat inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Kuyucuklardaki sıvı miktarını 100 µl'ye tamamlayacak şekilde astrosit besiyeri ilave edildi. Absorbans ( $A_{48}$ ) *Cytotox-glo* kit kullanılarak Glomaks Sistem cihazı ile luminometrik olarak ölçüldü ve hücre canlılığı formülle (Hücre canlılığı (%) =  $100 \times A_{48} / A_0$ ) hesaplandı (74). Hücre canlılığına göre deneyde kullanılacak indirekt bilirubin konsantrasyonu ve kafein konsantrasyonu belirlendi.

## Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi

Astrosit hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 100 µl astrosit besiyeri içerisinde  $3 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekilip; 48 saat sonra kuyucuklar faz kontrast mikroskopunda incelenerek hücrelerin varlığı ve canlılıkları değerlendirildi. Kuyucuklar kontrol, bilirubin, kafein, kafein + bilirubin, bilirubin + kafein olarak gruplandırıldı. Kuyucuklardaki sıvı miktarı astrosit besiyeri eklenerek 100 µl'ye tamamlandı ve  $A_0$  *Cytotox-glo* kit kullanılarak Glomaks Sistem cihazı ile luminometrik olarak ölçüm yapıldı. Plaklar  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  ve %95 nem içeren karanlık ortamda 48 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µl taze astrosit besiyeri eklendi ve  $A_{48}$  *Cytotox-glo* kit kullanılarak Glomaks Sistem cihazı ile luminometrik olarak ölçülerek hücre canlılığı hesaplandı (28,74) .



Şekil 4: (A) 96 kuyucuklu plaklar ve (B) kuyucuklu plaklardaki astrosit hücreleri (x40)

## Apopitozisin Belirlenmesi

Apopitozisin belirlenmesi amacıyla *deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)* tekniği kullanıldı. Deneyler *ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection* (Millipore, katalog no S7101) kiti ile yapıldı.

Kontrol, bilirubin, kafein, kafein + bilirubin, bilirubin + kafein grupları kültür kaplarında  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  ve %95 nem içeren karanlık ortamda 24 saat inkübe edildikten sonra astrosit besiyeri aspire edildi. Hücreler serum fizyolojik ile yıkayıp tekrar aspire edildi. Tripsin ile hücreler tabandan kaldırıldı ve astrosit besiyeri ile



yıkılarak hücrelerin tabandan tamamen kalkması sağlandı. Falkon tüpüne aktarılan hücreler 1500/dakika devirde beş dakika santrifüj edildi. Hücre çözeltisi üzerine fiksatif solüsyonu (%1 paraformaldehit) konuldu ve 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Falkon tüpü iyice karıştırılarak 100 µl alındı ve lam üzerine yayılarak kurutuldu. Lam post fiksatif solüsyonuna (20 ml etanol + 10 ml asetik asit) konuldu ve -20°C' de beş dakika bekletildi. Distile su ile yıkanan lam üzerine TdT solüsyonu eklendikten sonra 37°C'de etüvde bir saat inkübe edildi. *Stop wash buffer* ile lamlar 15 sn yıkandıktan sonra oda ısısında beş dakika inkübe edildi. Peroksidaz solüsyonu hücrelerin üzerine damlatılıp oda ısısında beş dakika inkübe edildi. Distile su ile yıkanan lamlar oda ısısında beş dakika inkübe edildikten sonra *metil green* solüsyonu eklendi ve oda ısısında 10 dk bekletildi. Lamlara n-bütanol eklendikten sonra 30 sn inkübe edilip ksilen konuldu ve altı dakika inkübe edildi. Lamlar kurutularak entelan ve lamel ile kapatıldı. Faz kontrast mikroskopunda her deney grubu için beş alan sayılarak canlı ve apoptotik hücreler tespit edildi (47).

### **Parametrelerin Aktivite ve Düzey Ölçümü**

Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü için *CAT Assay Kit* (YH Biosearch Laboratory Shanghai, China), süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü için *SOD Assay Kit* (YH Biosearch Laboratory Shanghai, China), total nitrat/nitrit düzeyi ölçümü için *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit* (YH Biosearch Laboratory Shanghai, China), glutatyon düzeyi ölçümü için *Glutathione Assay Kit* (Cayman), glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi ölçümü için *Colorimetric Assay for Cellular Glutathione Peroxidase* kit (YH Biosearch Laboratory Shanghai, China), malondialdehit (MDA) düzeyi ölçümü için *Colorimetric Assay For Lipid Peroxidation* (YH Biosearch Laboratory Shanghai, China), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) düzeyi ölçümü için *Human TNF alpha ELISA Kit* (YH Biosearch Laboratory Shanghai, China), interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) düzeyi ölçümü için *Human IL-1 beta ELISA Kit* (eBioscience Bender Med Systems GmbH Vienna, Austria), interlökin-6 (IL-6) düzeyi ölçümü için *Human IL-6 ELISA Kit* (eBioscience Bender Med Systems GmbH Vienna, Austria), Toll-like reseptör (TLR)4 düzeyi ölçümü için *TLR4 ELISA Kit* (YH Biosearch Laboratory Shanghai, China) ve TLR9 düzeyi ölçümü için *TLR9 ELISA Kit* (YH Biosearch Laboratory

Shanghai, China) kitleri kullanılarak protokoller uygulandı.

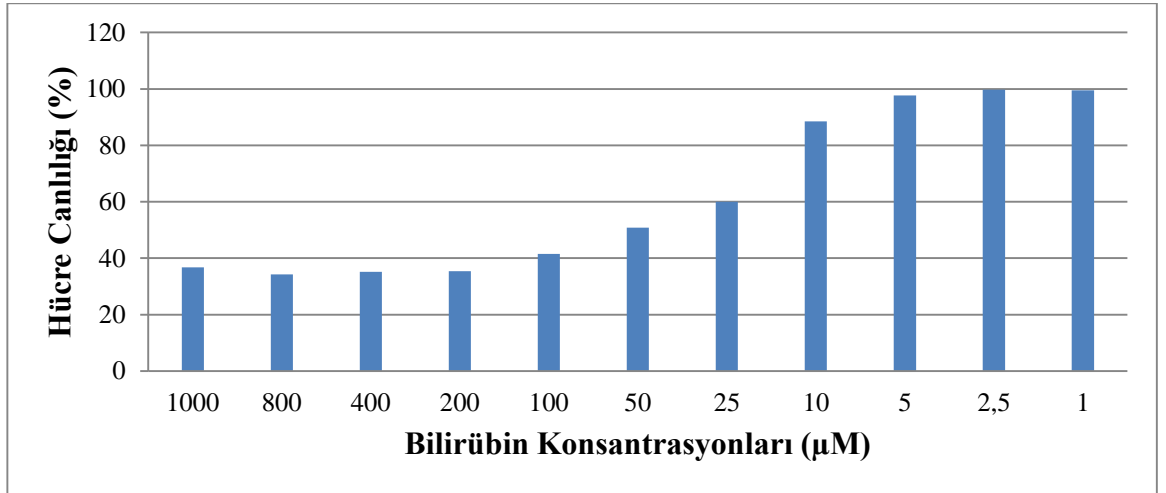
### **İstatistiksel Analiz**

Tüm veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Veriler normal dağılıma uygunluk testleri ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyan verilerde ortalamaları karşılaştırırken parametrik testlerden ANOVA ve posthoc testler (bonferroni düzeltmesi) uygulandı. Verilerin bilgisayarda hesaplanmasında *statistical packages for social sciences* (SPSS) (SPSS for Windows 17.0; SPSS, Chicago, Illinois, A.B.D) yazılım programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0.05$  olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

### Bilirubin ve Kafein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

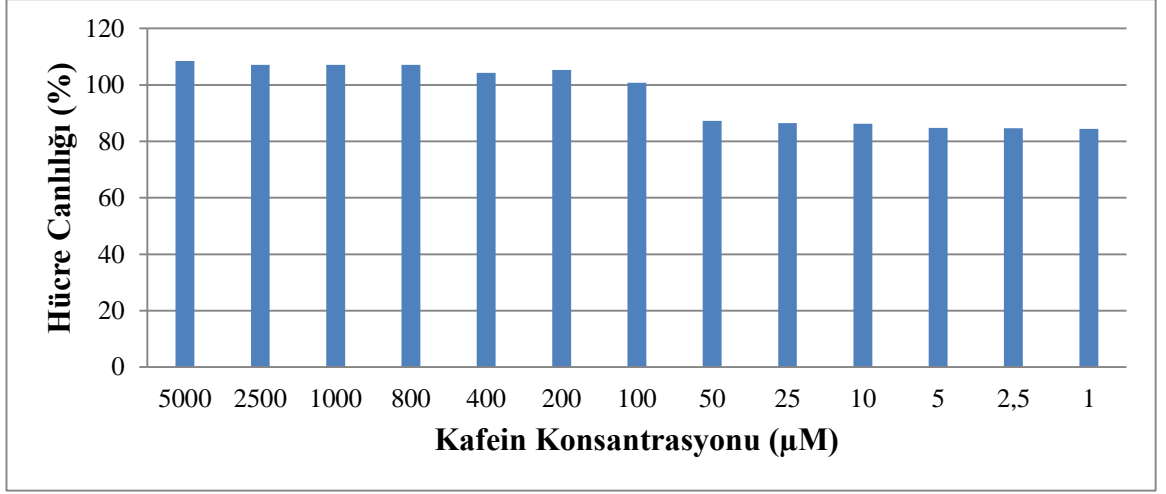
Farklı konsantrasyonlarda (1000  $\mu\text{M}$ 'den 1  $\mu\text{M}$ 'e kadar) bilirubin uygulandıktan 48 saat sonra % olarak hücre canlılığı belirlendi. Bilirubin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı 1000  $\mu\text{M}$ : %36.7, 800  $\mu\text{M}$ : %34.2, 400  $\mu\text{M}$ : %35.1, 200  $\mu\text{M}$ : %35.3, 100  $\mu\text{M}$ : %41.4, 50  $\mu\text{M}$ : %50.8, 25  $\mu\text{M}$ : %59.9, 10  $\mu\text{M}$ : %88.4, 5  $\mu\text{M}$ : %97.7, 2.5  $\mu\text{M}$ : %99.6, 1  $\mu\text{M}$ : %99.5 saptandı (Şekil 5). Bilirubin konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı azaldı. Astrosit hücrelerinin %50'sine toksik etkili olan bilirubin konsantrasyonu ( $\text{TC}_{50}$ ) 50  $\mu\text{M}$  olarak saptandı. Sitotoksosite, apoptozis değerlendirilmesinde, CAT, SOD, total nitrit/nitrat, Glutasyon, GPx, MDA, TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$ , IL-6, TLR4, TLR9 düzey ölçümlerinde 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu kullanıldı.



Şekil 5. Bilirubin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı.

Farklı konsantrasyonlarda (5000  $\mu\text{M}$ 'dan 1  $\mu\text{M}$ 'a kadar) kafein uygulandıktan 48 saat sonra % olarak hücre canlılığı belirlendi. Kafein konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı 5000  $\mu\text{M}$  : %108.5, 2500  $\mu\text{M}$ : %107.0, 1000  $\mu\text{M}$ : %107.0, 800  $\mu\text{M}$ : %107.0, 400  $\mu\text{M}$ : %104.2, 200  $\mu\text{M}$ : %105.2, 100  $\mu\text{M}$ : %100.7, 50  $\mu\text{M}$ : %87.2, 25  $\mu\text{M}$ : %86.4, 10  $\mu\text{M}$ : %86.2 ve 5  $\mu\text{M}$ : %84.7, 2,5  $\mu\text{M}$ : %84.6, 1  $\mu\text{M}$ : %84.3 olarak saptandı (Şekil 6). Hücre canlılığını % 100 arttıran kafein değeri 100  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi. Sitotoksosite, apoptozis değerlendirilmesinde, CAT, SOD, total nitrit/nitrat,

Glutasyon, GPx, MDA, TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$ , IL-6, TLR4, TLR9 düzey ölçümünde 100  $\mu$ M konsantrasyonu kullanıldı.



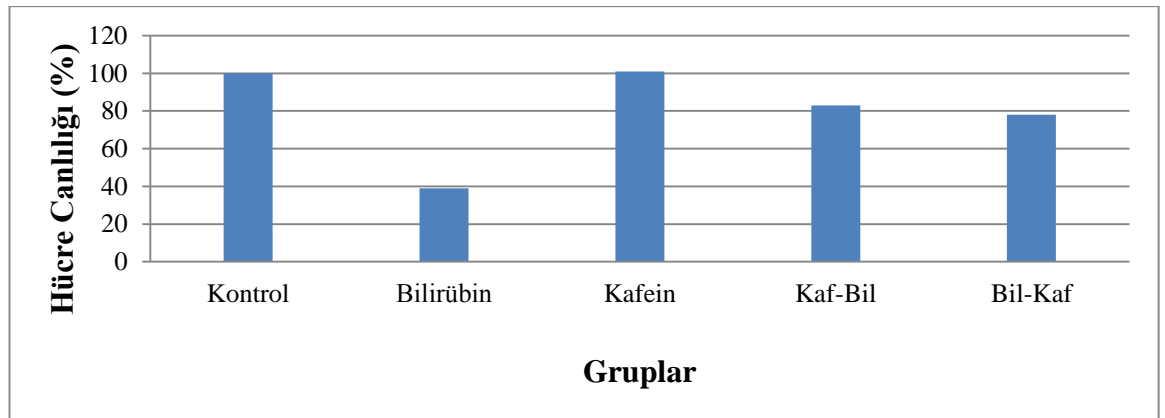
Şekil 6. Kafein konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı.

## Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Grupların başlangıçtaki hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek; 48. saatte yeniden değerlendirilen hücre canlılığı kontrol grubunda  $100.00 \pm 0.42$ , bilirubin grubunda  $39.01 \pm 0.56$ , kafein grubunda  $101.22 \pm 0.28$ , Kaf-Bil grubunda  $83.22 \pm 0.42$ , Bil-Kaf grubunda  $78.55 \pm 0.56$  bulundu. Bilirubin grubunda hücre canlılığı en düşük olup; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.001$ ). Hücre canlılığı kafein grubunda  $101.22 \pm 0.33$  olup; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanmazken ( $p = 0.21$ ); bilirubin grubuyla karşılaştırıldığında, hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.001$ ). Kafein, Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarında hücre canlılığındaki artış, bilirubin grubuyla karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı idi (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kaf-Bil ile Bil-Kaf grupları karşılaştırıldığında, profilaktik kafeinin, tedavi amacıyla verilen kafeine göre hücre canlılığını istatistiki olarak anlamlı arttırdığı görüldü ( $p < 0.001$ ) (Tablo 2, Şekil 7).

**Tablo 2.** Grupların hücre canlılığındaki değişim yüzdeleri.

Gruplar		48.saatte hücre canlılığı (%) (Ort $\pm$ SD)							
(1)	<b>Kontrol</b>	100.00 $\pm$ 0.42							
(2)	<b>Bilirubin</b>	39.01 $\pm$ 0.56							
(3)	<b>Kafein</b>	101.22 $\pm$ 0.28							
(4)	<b>Kaf-Bil*</b>	83.22 $\pm$ 0.42							
(5)	<b>Bil-Kaf**</b>	78.55 $\pm$ 0.56							
1-2	$p < 0.001$	1-3	$p = 0.21$	1-4	$p < 0.001$	1-5	$p < 0.001$	2-3	$p < 0.001$
2-4	$p < 0.001$	2-5	$p < 0.001$	3-4	$p < 0.001$	3-5	$p < 0.001$	4-5	$p < 0.001$
*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin		**Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein							



**Şekil 7.** Grupların 48. saatte hücre canlılığı.

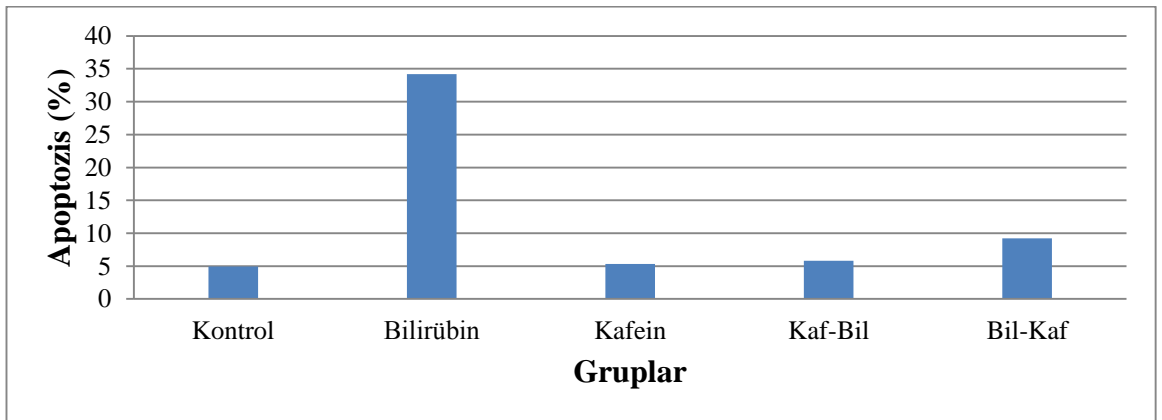
## Apoptozisin Değerlendirilmesi

Gruplarda astrosit hücrelerinde apoptozis 24. saatte değerlendirildi (Şekil 9-13). Apoptozis, kontrol grubunda  $4.94 \pm 1.72$ , bilirubin grubunda  $34.19 \pm 2.60$ , kafein grubunda  $5.33 \pm 2.44$ , Kaf-Bil grubunda  $5.82 \pm 1.41$ , Bil-Kaf grubunda  $9.21 \pm 2.56$  saptandı. Apoptozis kontrol grubunda en düşük, bilirubin grubunda en yüksekti. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, bilirubin grubunda apoptozis belirgin yüksekti ( $p < 0.001$ ). Kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarıyla karşılaştırıldığında, bilirubin grubunda apoptozis artışı istatistiksel olarak anlamlı iken (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ), kafein ve kontrol grubu arasında fark saptanmadı ( $p = 0.9$ ). Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarıyla karşılaştırıldığında kafein grubunda apoptozis belirgin düşük bulundu ( $p = 0.013$ ,  $p < 0.001$ ). Kaf-Bil grubunda, Bil-Kaf grubuna göre apoptozis istatistiksel olarak anlamlı düşük olup ( $p < 0.001$ ); profilaktik kafeinin tedavi amacıyla kullanılan kafeinden daha etkili olduğu görüldü (Tablo 3, Şekil 8).

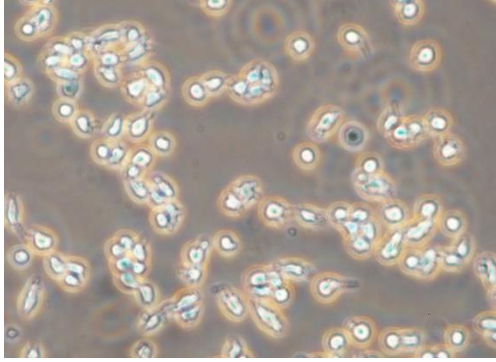
**Tablo 3.** Astrosit hücrelerinde apoptozisin değerlendirilmesi.

Gruplar		24. saatte apoptozis (%) (Ort $\pm$ SD)
(1)	<b>Kontrol</b>	$4.94 \pm 1.72$
(2)	<b>Bilirubin</b>	$34.19 \pm 2.60$
(3)	<b>Kafein</b>	$5.33 \pm 2.44$
(4)	<b>Kaf-Bil*</b>	$5.82 \pm 1.41$
(5)	<b>Bil-Kaf**</b>	$9.21 \pm 2.56$

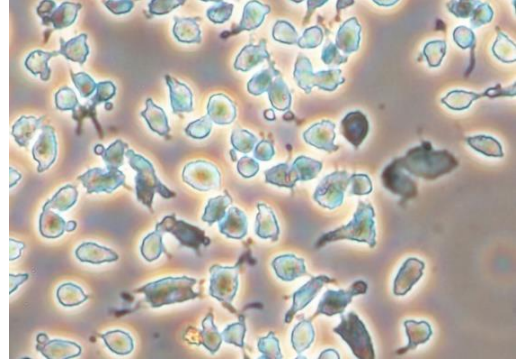
1-2  $p < 0.001$     1-3  $p = 0.9$     1-4  $p < 0.001$     1-5  $p < 0.001$     2-3  $p < 0.001$   
2-4  $p < 0.001$     2-5  $p < 0.001$     3-4  $p = 0.013$     3-5  $p < 0.001$     4-5  $p < 0.001$   
\*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin    \*\*Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein



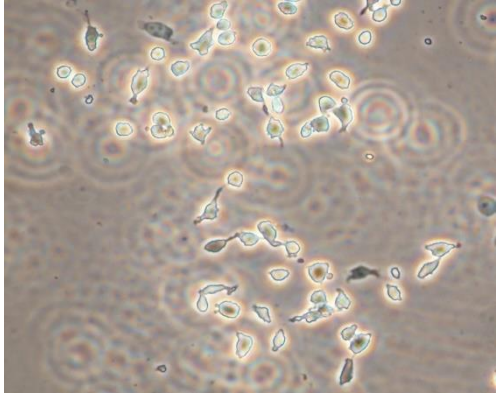
**Şekil 8.** Grupların 24. saatte apoptozis yüzdeleri.



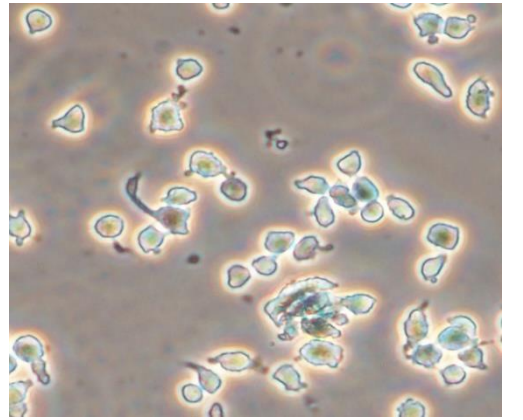
**Şekil 9 (A)** Apoptozis kontrol grubu (x40).



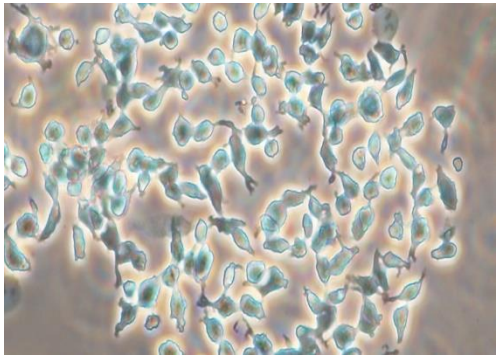
**Şekil 9 (D)** Apoptozis kafein + bilirubin grubu (x40).



**Şekil 9 (B)** Apoptozis bilirubin grubu (x40).



**Şekil 9 (E)** Apoptozis bilirubin + kafein grubu (x40).



**Şekil 9 (C)** Apoptozis kafein grubu (x40).

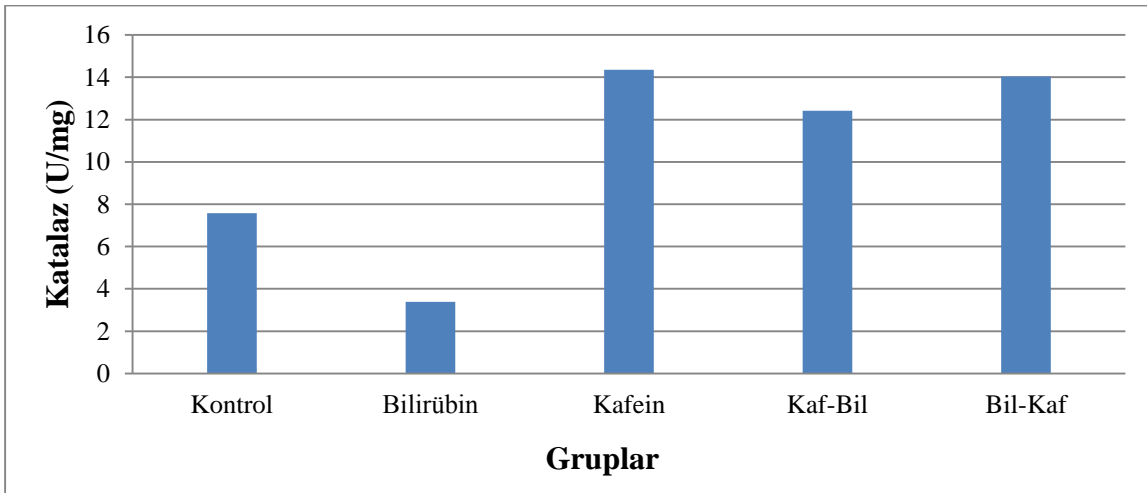
## Katalaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Grupların CAT aktivitesi 24. saatte değerlendirildi. CAT aktivitesi kontrol grubunda  $7.58 \pm 0.25$  U/mg, bilirubin grubunda  $3.38 \pm 0.52$  U/mg, kafein grubunda  $14.35 \pm 2.25$  U/mg, Kaf-Bil grubunda  $12.41 \pm 2.14$  U/mg, Bil-Kaf grubunda  $14.02 \pm 1.75$  U/mg saptandı. Kafein grubunda CAT aktivitesi kontrol grubundan istatistiki olarak anlamlı yüksek idi ( $p < 0.001$ ). Bilirubin grubunda CAT aktivitesinin diğer gruplardan daha düşük olduğu görüldü ve kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf grubu ile karşılaştırıldığında bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kafein grubunda CAT aktivitesi Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarından istatistiksel olarak anlamlı yüksekti (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) (Tablo 4, Şekil 10).

**Tablo 4.** Grupların CAT aktiviteleri.

Gruplar	CAT aktivitesi (U/mg) (Ort $\pm$ SD)
(1) Kontrol	$7.58 \pm 0.25$
(2) Bilirubin	$3.38 \pm 0.52$
(3) Kafein	$14.35 \pm 2.25$
(4) Kaf-Bil*	$12.41 \pm 2.14$
(5) Bil-Kaf**	$14.02 \pm 1.75$

1-2  $p < 0.001$     1-3  $p < 0.001$     1-4  $p < 0.001$     1-5  $p < 0.001$     2-3  $p < 0.001$   
2-4  $p < 0.001$     2-5  $p < 0.001$     3-4  $p < 0.001$     3-5  $p < 0.001$     4-5  $p < 0.001$   
\*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin    \*\*Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein



**Şekil 10.** Grupların CAT aktiviteleri.

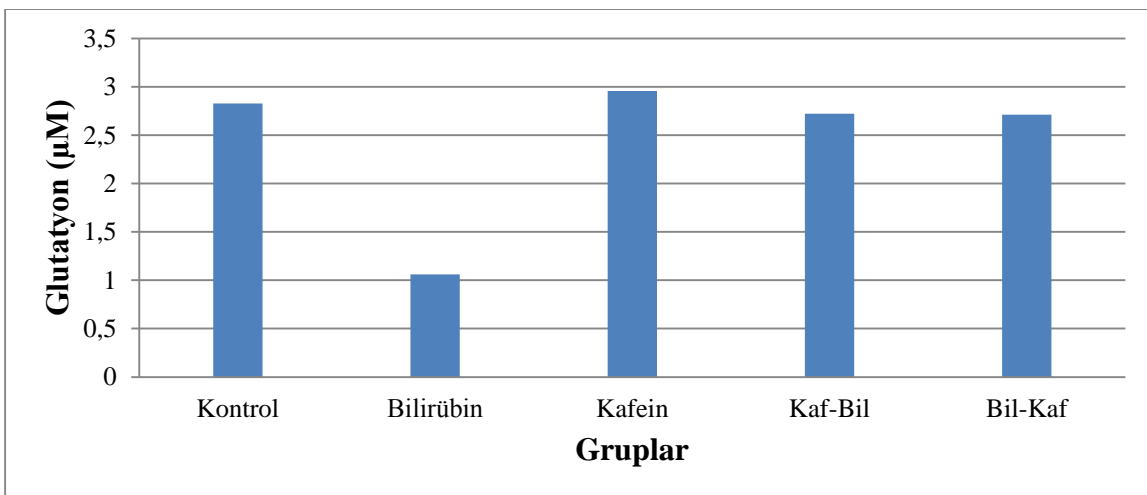


## Glutasyon Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların glutasyon düzeyi 24. saatte değerlendirildi. Glutasyon düzeyi kontrol grubunda  $2.82 \pm 0.21 \mu\text{M}$ , bilirubin grubunda  $1.06 \pm 0.10 \mu\text{M}$ , kafein grubunda  $2.95 \pm 0.22 \mu\text{M}$ , Kaf-Bil grubunda  $2.72 \pm 0.20 \mu\text{M}$ , Bil-Kaf grubunda  $2.71 \pm 0.20 \mu\text{M}$  saptandı. Kafein grubunda glutasyon düzeyi kontrol grubundan istatistiki olarak anlamlı yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ). Glutasyon düzeyi bilirubin grubunda, kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kafein grubunda glutasyon düzeyi Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı yüksek saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarında glutasyon düzeyi bakımından istatistiki olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p = 1$ ) (Tablo 5, Şekil 11).

**Tablo 5.** Grupların glutasyon düzeyleri.

Gruplar		Glutasyon düzeyi ( $\mu\text{M}$ ) (Ort $\pm$ SD)							
(1)	<b>Kontrol</b>	$2.82 \pm 0.21$							
(2)	<b>Bilirubin</b>	$1.06 \pm 0.10$							
(3)	<b>Kafein</b>	$2.95 \pm 0.22$							
(4)	<b>Kaf-Bil*</b>	$2.72 \pm 0.20$							
(5)	<b>Bil-Kaf**</b>	$2.71 \pm 0.20$							
1-2	$p < 0.001$	1-3	$p < 0.001$	1-4	$p < 0.001$	1-5	$p < 0.001$	2-3	$p < 0.001$
2-4	$p < 0.001$	2-5	$p < 0.001$	3-4	$p < 0.001$	3-5	$p < 0.001$	4-5	$p = 1$
*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin		**Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein							



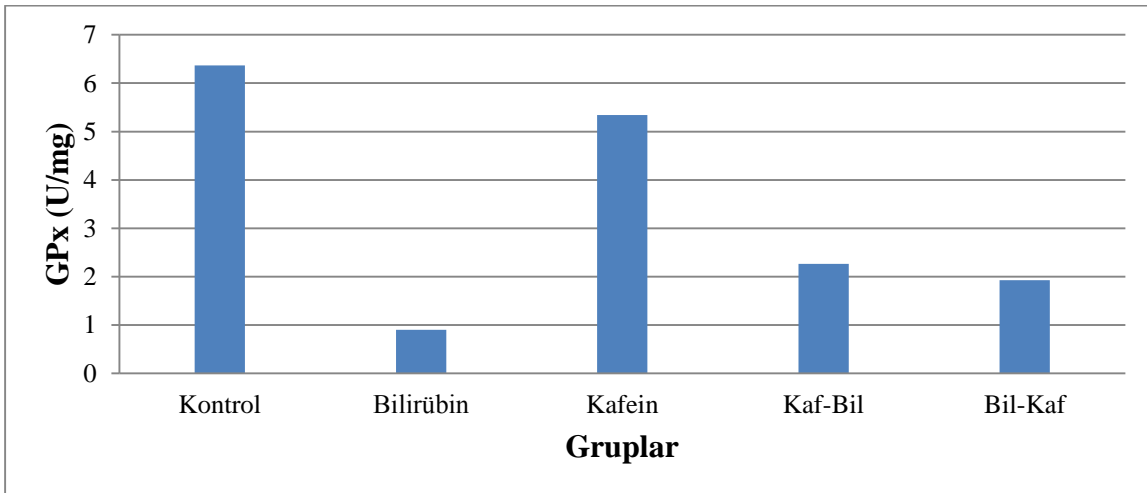
**Şekil 11.** Grupların glutasyon düzeyleri.

## Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Grupların GPx aktivitesi 24. saatte değerlendirildi. GPx aktivitesi kontrol grubunda  $6.36 \pm 0.11$  U/mg, bilirubin grubunda  $0.89 \pm 0.10$  U/mg, kafein grubunda  $5.34 \pm 0.11$  U/mg, Kaf-Bil grubunda  $2.26 \pm 0.10$  U/mg, Bil-Kaf grubunda  $1.92 \pm 0.10$  U/mg saptandı. Kafein grubunda GPx aktivitesi kontrol grubundan istatistiki olarak anlamlı düşük idi ( $p < 0.001$ ). GPx aktivitesi bilirubin grubunda, kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kafein grubunda GPx aktivitesi Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı yüksekti (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kaf-Bil grubunda GPx aktivitesi, Bil-Kaf grubundan istatistiki olarak anlamlı yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo 6, Şekil 12).

**Tablo 6.** Grupların GPx aktiviteleri.

Gruplar		GPx aktivitesi (U/mg) (Ort $\pm$ SD)							
(1)	<b>Kontrol</b>	$6.36 \pm 0.11$							
(2)	<b>Bilirubin</b>	$0.89 \pm 0.10$							
(3)	<b>Kafein</b>	$5.34 \pm 0.11$							
(4)	<b>Kaf-Bil*</b>	$2.26 \pm 0.10$							
(5)	<b>Bil-Kaf**</b>	$1.92 \pm 0.10$							
1-2	$p < 0.001$	1-3	$p < 0.001$	1-4	$p < 0.001$	1-5	$p < 0.001$	2-3	$p < 0.001$
2-4	$p < 0.001$	2-5	$p < 0.001$	3-4	$p < 0.001$	3-5	$p < 0.001$	4-5	$p < 0.001$
*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin		**Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein							



**Şekil 12.** Grupların GPx aktiviteleri.

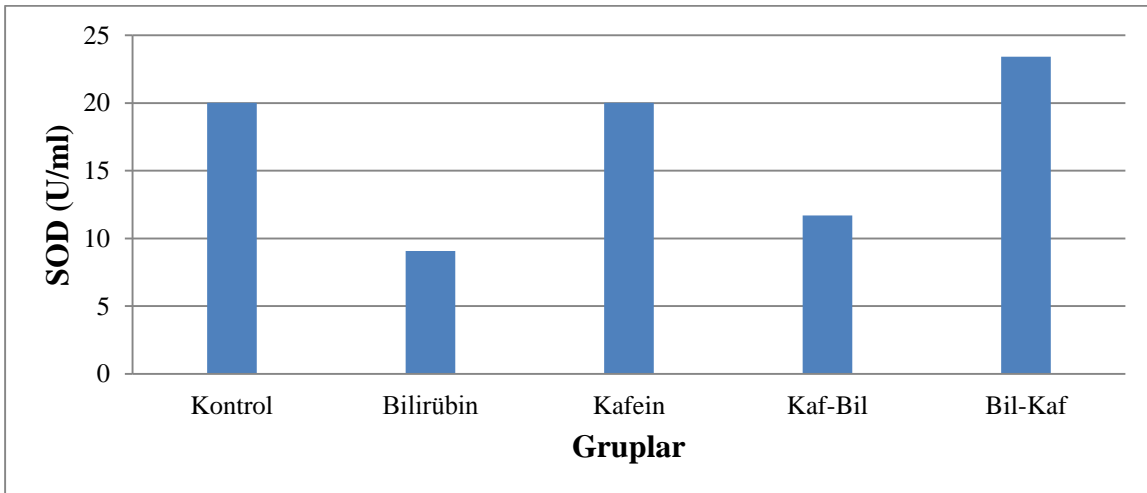
## Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

SOD aktivitesi 24. saatte değerlendirildi. SOD aktivitesi kontrol grubunda  $20.01 \pm 0.20$  U/ml, bilirubin grubunda  $9.06 \pm 0.19$  U/ml, kafein grubunda  $20.02 \pm 0.29$  U/ml, Kaf-Bil grubunda  $11.70 \pm 0.19$  U/ml, Bil-Kaf grubunda  $23.41 \pm 0.21$  U/ml saptandı. SOD aktivitesi bilirubin grubunda, kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kontrol grubu ve kafein grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p = 1$ ). Kafein grubunda SOD aktivitesi Kaf-Bil grubundan yüksek, Bil-Kaf grubundan düşük bulundu (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kaf-Bil grubunda SOD aktivitesi, Bil-Kaf grubundan istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo 7, Şekil 13).

**Tablo 7.** Grupların SOD aktiviteleri.

Gruplar		SOD düzeyi (U/ml) (Ort $\pm$ SD)
(1)	<b>Kontrol</b>	$20.01 \pm 0.20$
(2)	<b>Bilirubin</b>	$9.06 \pm 0.19$
(3)	<b>Kafein</b>	$20.02 \pm 0.29$
(4)	<b>Kaf-Bil*</b>	$11.70 \pm 0.19$
(5)	<b>Bil-Kaf**</b>	$23.41 \pm 0.21$

1-2  $p < 0.001$     1-3  $p = 1$     1-4  $p < 0.001$     1-5  $p < 0.001$     2-3  $p < 0.001$   
2-4  $p < 0.001$     2-5  $p < 0.001$     3-4  $p < 0.001$     3-5  $p < 0.001$     4-5  $p < 0.001$   
\*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin    \*\*Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein



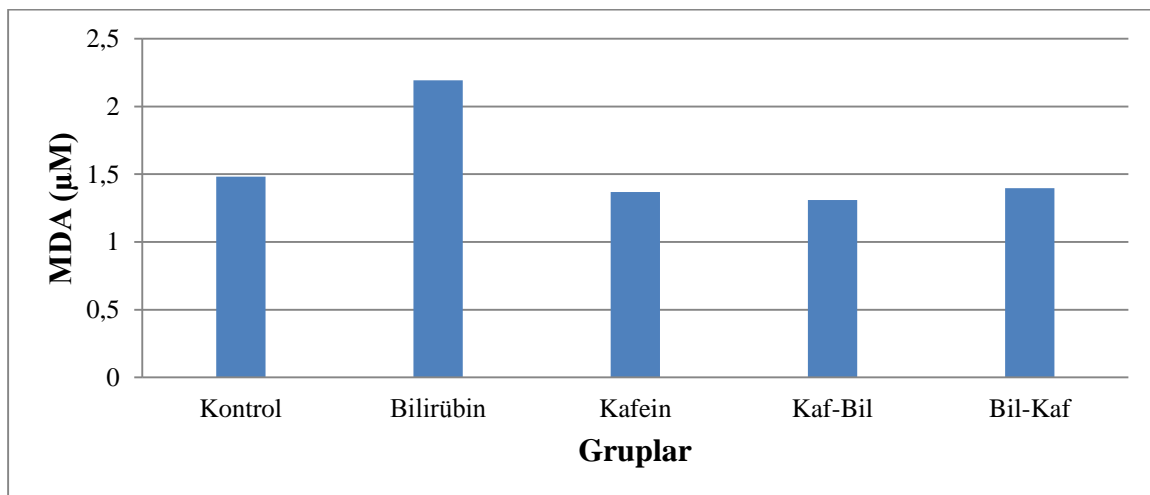
**Şekil 13.** Grupların SOD aktiviteleri.

## Malondialdehit Düzeyinin Değerlendirilmesi

MDA düzeyi 24. saatte değerlendirildi. MDA düzeyi kontrol grubunda  $1.48 \pm 0.13 \mu\text{M}$ , bilirubin grubunda  $2.19 \pm 0.14 \mu\text{M}$ , kafein grubunda  $1.36 \pm 0.17 \mu\text{M}$ , Kaf-Bil grubunda  $1.31 \pm 0.15 \mu\text{M}$ , Bil-kaf grubunda  $1.39 \pm 0.12 \mu\text{M}$  saptandı. Kontrol grubunda MDA düzeyi kafein grubundan yüksek olup; istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p < 0.001$ ). MDA düzeyi bilirubin grubunda, kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kafein grubunda MDA düzeyi Kaf-Bil grubundan istatistiki olarak anlamlı yüksek saptandı ( $p < 0.001$ ). Kafein ve Bil-Kaf gruplarında MDA düzeyi bakımından istatistiki olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p = 0.05$ ). Kaf-Bil grubunda MDA düzeyi, Bil-Kaf grubundan düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo 8, Şekil 14).

**Tablo 8.** Grupların MDA düzeyleri.

Gruplar		MDA düzeyi ( $\mu\text{M}$ ) (Ort $\pm$ SD)							
(1)	<b>Kontrol</b>	$1.48 \pm 0.13$							
(2)	<b>Bilirubin</b>	$2.19 \pm 0.14$							
(3)	<b>Kafein</b>	$1.36 \pm 0.17$							
(4)	<b>Kaf-Bil*</b>	$1.31 \pm 0.15$							
(5)	<b>Bil-Kaf**</b>	$1.39 \pm 0.12$							
1-2	$p < 0.001$	1-3	$p < 0.001$	1-4	$p < 0.001$	1-5	$p < 0.001$	2-3	$p < 0.001$
2-4	$p < 0.001$	2-5	$p < 0.001$	3-4	$p < 0.001$	3-5	$p : 0.05$	4-5	$p < 0.001$
*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin		**Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein							



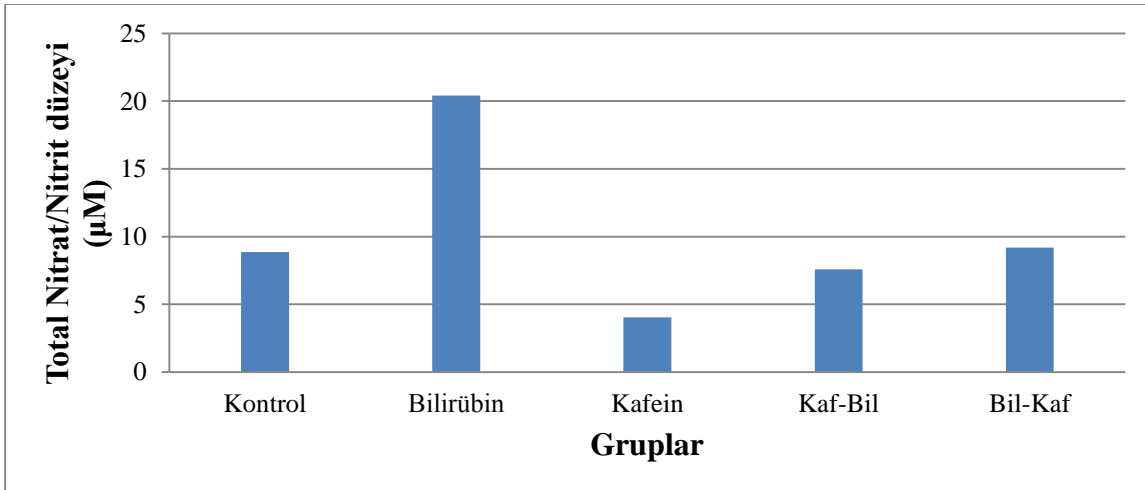
**Şekil 14.** Grupların MDA düzeyleri.

## Total Nitrat/Nitrit Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların total nitrat/nitrit düzeyi 24. saatte değerlendirildi. Total nitrat/nitrit düzeyi kontrol grubunda  $8.85 \pm 0.25 \mu\text{M}$ , bilirubin grubunda  $20.41 \pm 0.37 \mu\text{M}$ , kafein grubunda  $4.04 \pm 0.48 \mu\text{M}$ , Kaf-Bil grubunda  $7.57 \pm 0.65 \mu\text{M}$ , Bil-Kaf grubunda  $9.17 \pm 0.72 \mu\text{M}$  saptandı. Kafein grubunda total nitrat/nitrit düzeyi kontrol grubundan istatistiki olarak anlamlı düşük idi ( $p < 0.001$ ). Bilirubin grubunda total nitrat/nitrit düzeyi kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarından istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kafein grubunda total nitrat/nitrit düzeyi Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı düşük idi (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kaf-Bil grubunda total nitrat/nitrit düzeyi, Bil-Kaf grubundan istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo 9, Şekil 15).

**Tablo 9.** Grupların total nitrat/nitrit düzeyleri.

Gruplar		Total Nitrat/Nitrit düzeyi ( $\mu\text{M}$ ) (Ort $\pm$ SD)			
(1)	<b>Kontrol</b>	$8.85 \pm 0.25$			
(2)	<b>Bilirubin</b>	$20.41 \pm 0.37$			
(3)	<b>Kafein</b>	$4.04 \pm 0.48$			
(4)	<b>Kaf-Bil*</b>	$7.57 \pm 0.65$			
(5)	<b>Bil-Kaf**</b>	$9.17 \pm 0.72$			
<b>1-2</b> $p < 0.001$		<b>1-3</b> $p < 0.001$	<b>1-4</b> $p < 0.001$	<b>1-5</b> $p < 0.001$	<b>2-3</b> $p < 0.001$
<b>2-4</b> $p < 0.001$		<b>2-5</b> $p < 0.001$	<b>3-4</b> $p < 0.001$	<b>3-5</b> $p < 0.001$	<b>4-5</b> $p < 0.001$
*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin		**Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein			



**Şekil 15.** Grupların total nitrat/nitrit düzeyleri.

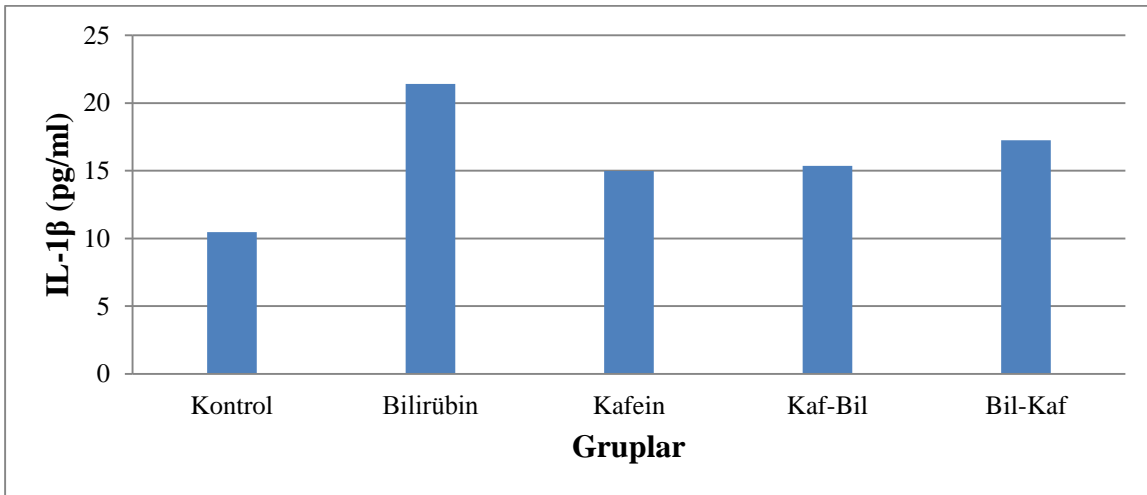
## İnterlökin-1 $\beta$ Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların IL-1 $\beta$  düzeyi 24. saatte değerlendirildi. IL-1 $\beta$  düzeyi kontrol grubunda  $10.46 \pm 0.13$  pg/ml, bilirubin grubunda  $21.41 \pm 0.12$  pg/ml, kafein grubunda  $14.99 \pm 0.17$  pg/ml, Kaf-Bil grubunda  $15.35 \pm 0.18$  pg/ml, Bil-Kaf grubunda  $17.25 \pm 0.19$  pg/ml saptandı. Kontrol grubunda IL-1 $\beta$  düzeyi kafein grubundan istatistiki olarak anlamlı düşük saptandı ( $p < 0.001$ ). Bilirubin grubunda IL-1 $\beta$  düzeyi, kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Bil-Kaf grubunda IL-1 $\beta$  düzeyi kafein ve Kaf-Bil gruplarından yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) (Tablo 10, Şekil 16).

**Tablo 10.** Grupların IL-1 $\beta$  düzeyleri.

Gruplar		IL-1 $\beta$ düzeyi (pg/ml) (Ort $\pm$ SD)
(1)	<b>Kontrol</b>	$10.46 \pm 0.13$
(2)	<b>Bilirubin</b>	$21.41 \pm 0.12$
(3)	<b>Kafein</b>	$14.99 \pm 0.17$
(4)	<b>Kaf-Bil*</b>	$15.35 \pm 0.18$
(5)	<b>Bil-Kaf**</b>	$17.25 \pm 0.19$

1-2  $p < 0.001$     1-3  $p < 0.001$     1-4  $p < 0.001$     1-5  $p < 0.001$     2-3  $p < 0.001$   
2-4  $p < 0.001$     2-5  $p < 0.001$     3-4  $p < 0.001$     3-5  $p < 0.001$     4-5  $p < 0.001$   
\*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin    \*\*Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein



**Şekil 16.** Grupların IL-1 $\beta$  düzeyleri.

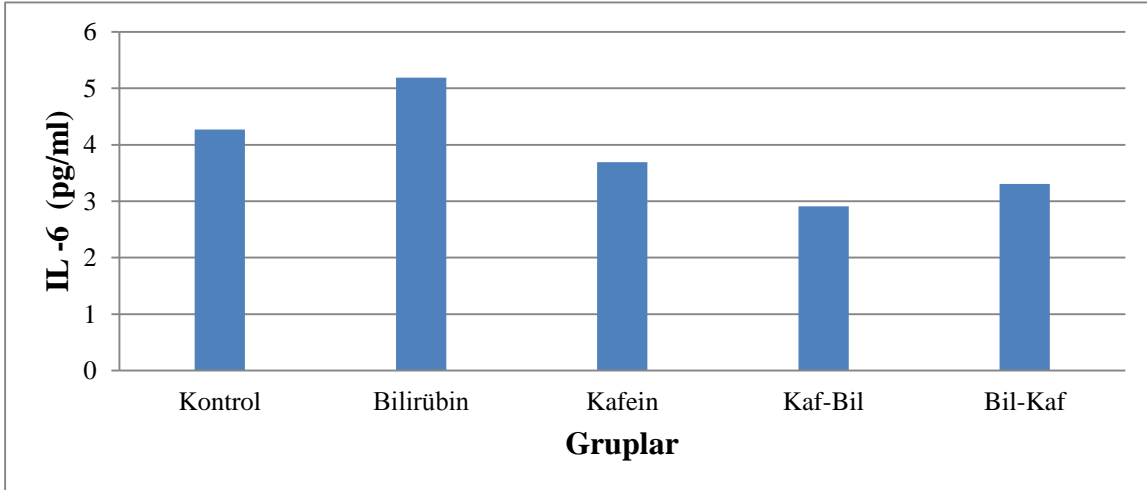
## İnterlökin-6 Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların IL-6 düzeyi 24. saatte değerlendirildi. IL-6 düzeyi kontrol grubunda  $4.27 \pm 0.16$  pg/ml, bilirubin grubunda  $5.18 \pm 0.19$  pg/ml, kafein grubunda  $3.69 \pm 0.16$  pg/ml, Kaf-Bil grubunda  $2.91 \pm 0.11$  pg/ml, Bil-Kaf grubunda  $3.30 \pm 0.12$  pg/ml saptandı. Kafein grubunda IL-6 düzeyi kontrol grubundan istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu ( $p < 0.001$ ). Bilirubin grubunda IL-6 düzeyi, kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kafein grubunda IL-6 düzeyi Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarından daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kaf-Bil grubunda IL-6 düzeyi, Bil-Kaf grubundan düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo 11, Şekil 17).

**Tablo 11.** Grupların IL-6 düzeyleri.

Gruplar	IL-6 düzeyi (pg/ml) (Ort $\pm$ SD)
(1) Kontrol	$4.27 \pm 0.16$
(2) Bilirubin	$5.18 \pm 0.19$
(3) Kafein	$3.69 \pm 0.16$
(4) Kaf-Bil*	$2.91 \pm 0.11$
(5) Bil-Kaf**	$3.30 \pm 0.12$

1-2  $p < 0.001$     1-3  $p < 0.001$     1-4  $p < 0.001$     1-5  $p < 0.001$     2-3  $p < 0.001$   
2-4  $p < 0.001$     2-5  $p < 0.001$     3-4  $p < 0.001$     3-5  $p < 0.001$     4-5  $p < 0.001$   
\*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin    \*\*Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein



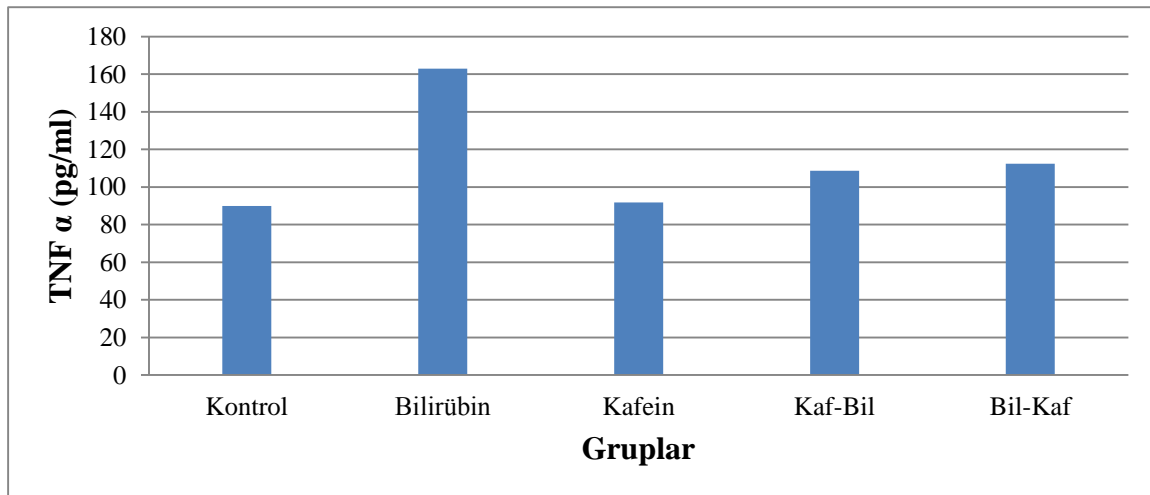
**Şekil 17.** Grupların IL-6 düzeyleri.

## Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$ Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların TNF- $\alpha$  düzeyi 24. saatte değerlendirildi. TNF- $\alpha$  düzeyi kontrol grubunda  $89.88 \pm 1.76$  pg/ml, bilirubin grubunda  $162.90 \pm 1.53$  pg/ml, kafein grubunda  $91.79 \pm 1.91$  pg/ml, Kaf-Bil grubunda  $108.61 \pm 2.25$  pg/ml, Bil-Kaf grubunda  $112.44 \pm 2.48$  pg/ml saptandı. Kafein grubunda TNF- $\alpha$  düzeyi, kontrol grubundan daha yüksekti; ancak istatistiki fark saptanmadı ( $p=0.41$ ). Bilirubin grubunda TNF- $\alpha$  düzeyi, kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). Kafein grubunda TNF- $\alpha$  düzeyi, Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak düşüktü (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). Kaf-Bil grubunda TNF- $\alpha$  düzeyi, Bil-Kaf grubundan istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu ( $p=0.009$ ) (Tablo 12, Şekil 18).

**Tablo 12.** Grupların TNF- $\alpha$  düzeyleri.

Gruplar		TNF- $\alpha$ düzeyi (pg/ml) (Ort $\pm$ SD)							
(1)	<b>Kontrol</b>	$89.88 \pm 1.76$							
(2)	<b>Bilirubin</b>	$162.90 \pm 1.53$							
(3)	<b>Kafein</b>	$91.79 \pm 1.91$							
(4)	<b>Kaf-Bil*</b>	$108.61 \pm 2.25$							
(5)	<b>Bil-Kaf**</b>	$112.44 \pm 2.48$							
1-2	$p<0.001$	1-3	$p=0.41$	1-4	$p<0.001$	1-5	$p<0.001$	2-3	$p<0.001$
2-4	$p<0.001$	2-5	$p<0.001$	3-4	$p<0.001$	3-5	$p<0.001$	4-5	$p=0.009$
*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin		**Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein							



**Şekil 18.** Grupların TNF- $\alpha$  düzeyleri.



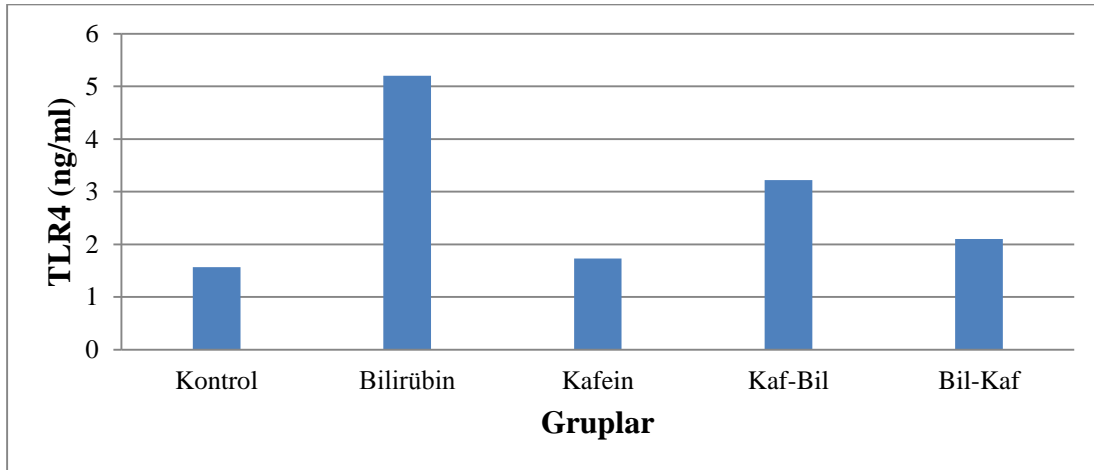
## Toll-like Reseptör 4 Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların TLR4 düzeyi 24. saatte değerlendirildi. TLR4 düzeyi kontrol grubunda  $1.56 \pm 0.13$  ng/ml, bilirubin grubunda  $5.20 \pm 0.38$  ng/ml, kafein grubunda  $1.73 \pm 0.15$  ng/ml, Kaf-Bil grubunda  $3.22 \pm 0.25$  ng/ml, Bil-Kaf grubunda  $2.10 \pm 0.17$  ng/ml saptandı. Kafein grubunda TLR4 düzeyi, kontrol grubundan istatistiki olarak anlamlı yüksek idi ( $p < 0.001$ ). Bilirubin grubunda TLR4 düzeyi, kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kafein grubunda TLR4 düzeyi Kaf-Bil ve Bil-Kaf gruplarından istatistiki olarak anlamlı düşüktü (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Kaf-Bil grubunda TLR4 düzeyi, Bil-Kaf grubundan yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo 13, Şekil 19).

**Tablo 13.** Grupların TLR4 düzeyleri

Gruplar	TLR4 düzeyi (ng/ml) (Ort $\pm$ SD)
(1) Kontrol	$1.56 \pm 0.13$
(2) Bilirubin	$5.20 \pm 0.38$
(3) Kafein	$1.73 \pm 0.15$
(4) Kaf-Bil*	$3.22 \pm 0.25$
(5) Bil-Kaf**	$2.10 \pm 0.17$

1-2  $p < 0.001$     1-3  $p < 0.001$     1-4  $p < 0.001$     1-5  $p < 0.001$     2-3  $p < 0.001$   
2-4  $p < 0.001$     2-5  $p < 0.001$     3-4  $p < 0.001$     3-5  $p < 0.001$     4-5  $p < 0.001$   
\*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin    \*\*Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein



**Şekil 19.** Grupların TLR4 düzeyleri

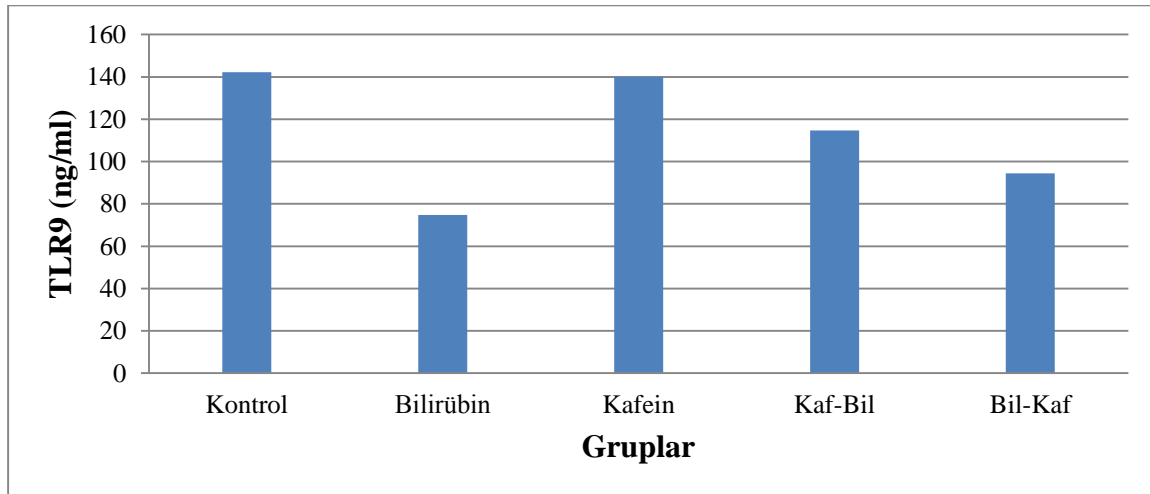
## Toll-like Reseptör 9 Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların TLR9 düzeyi 24. saatte değerlendirildi. TLR9 düzeyi kontrol grubunda  $142.21 \pm 2.98$  ng/ml, bilirubin grubunda  $74.68 \pm 2.64$  ng/ml, kafein grubunda  $140.14 \pm 2.47$  ng/ml, Kaf-Bil grubunda  $114.65 \pm 2.84$  ng/ml, Bil-Kaf grubunda  $94.45 \pm 2.98$  ng/ml saptandı. Kafein grubunda TLR9 düzeyi kontrol grubundan daha düşük saptanırken istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.29$ ). Bilirubin grubunda TLR9 düzeyi kontrol, kafein, Kaf-Bil, Bil-Kaf gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). Bil-Kaf grubunda TLR9 düzeyi kafein ve Kaf-Bil gruplarından daha düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) (Tablo 14, Şekil 20).

**Tablo 14.** Grupların TLR9 düzeyleri

Gruplar	TLR9 düzeyi (ng/ml) (Ort $\pm$ SD)
(1) Kontrol	$142.21 \pm 2.98$
(2) Bilirubin	$74.68 \pm 2.64$
(3) Kafein	$140.14 \pm 2.47$
(4) Kaf-Bil*	$114.65 \pm 2.84$
(5) Bil-Kaf**	$94.45 \pm 2.98$

1-2  $p<0.001$     1-3  $p:0.29$     1-4  $p<0.001$     1-5  $p<0.001$     2-3  $p<0.001$   
2-4  $p<0.001$     2-5  $p<0.001$     3-4  $p<0.001$     3-5  $p<0.001$     4-5  $p<0.001$   
\*Kaf-Bil: Kafein-Bilirubin    \*\*Bil-Kaf: Bilirubin-Kafein



**Şekil 20.** Grupların TLR9 düzeyleri

## TARTIŞMA

İndirek hiperbilirubinemi, ekstrauterin hayata adaptasyon döneminde, bebeklerin çoğunda fizyolojik olup, TSB konsantrasyonları bebek için tehlike oluşturmayacak düzeylerde kalır (75,76). Yenidoğanların küçük bir bölümünde ise TSB, vücudun nöroprotektif savunma sistemini aşarak geri dönüşümsüz beyin hasarı oluşturabilecek düzeylere ulaşmaktadır. Kernikterus olarak da adlandırılan kronik bilirubin ensefalopatisinin insidansı tam olarak bilinmemekle birlikte, Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülme sıklığının 100 000 canlı doğumda 1-1.4 olduğu tahmin edilmektedir (77). Beyinde en sık etkilenen bölgeler bazal ganglionlar, hipokampus, substantia nigra, okülomotor, vestibüler, koklear, fasiyal sinir çekirdekleri, beyin sapı çekirdekleri, özellikle ponsun retiküler yapısı, serebellar çekirdekler ve medulla spinalisin ön boynuz hücreleridir.

Bilirubini okside eden enzimler beyin, bağırsak, karaciğer ve böbreğin mitokondri membranında bulunmaktadır. Klinik deneyimler bilirubin nörotoksitesine yenidoğanların daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Bu durum immatür beyin dokusunda bilirubin oksidaz aktivitesinin matür beyin dokusuna göre daha az olması ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bilirubin oksidaz aktivitesinin genetik olarak heterojen olması, bilirubine karşı duyarlılığın bireysel olarak farklı olmasını açıklayabilmektedir (38). İndirekt bilirubinin hangi düzeyde nörotoksik olduğu kesin olarak bilinmemekle birlikte (78), pik serum bilirubin düzeyinin  $\geq 22$  mg/dl olmasının kötü nörogelişimsel sonuç için bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (79). Ancak preterm yenidoğanlarda, özellikle hipoksi, asidoz, sepsis, hemoliz ya da kan-beyin bariyeri hasarı gibi ek bir faktörün varlığında daha düşük bilirubin seviyelerinde nörolojik hasar geliştiği rapor edilmiştir (6).

Bilirubin ensefalopatisinin patofizyolojisi, bilirubinin özellikle bazal ganglionlarda depolanma nedeni ve nöron hasarının mekanizması da tam olarak bilinmemektedir (33). Bu nedenle bu konuların aydınlatılmasını amaçlayan çalışmalara paralel olarak, bilirubin nörotoksitesine bağlı nörolojik sekellerin önlenmesine yönelik çalışmalar da yoğun biçimde sürdürülmektedir. Bu çalışmada da nöronlara temel trofik ve metabolik destek sağlayan astrosit hücrelerinde bilirubinin toksik etkileri ve kafeinin toksisitenin önlenmesindeki rolü araştırıldı.

İndirekt bilirubin, astrosit ve nöronlar için düşük düzeyde antioksidan, yüksek düzeyde sitotoksik etkili olduğundan, hücre içi konsantrasyonu düşük seviyede tutulmalıdır (4). Kan-

BOS bariyeri, BOS'tan kana bilirübinin atılmasını sağlayan transporterler, oksidasyon ve konjugasyonla bilirübinin toksik olmayan moleküllere dönüştürülmesi sayesinde SSS indirekt bilirübinin toksik etkilerinden korunmaktadır (49).

Bilirübin toksisitesinde ana hedef glial hücreler ve nöronlardır. Nöronların bilirübinin toksik etkisine astrositlerden daha duyarlı olduğu düşünülmektedir (5,28,80). Beyinde en yoğun hücre topluluğu olan astrositler, nöronlara metabolik, trofik destek sağladıkları ve kan-beyin bariyerinin oluşumuna katkıda buldukları için SSS'nin korunmasında kritik önem taşırlar. Kan-beyin bariyerinin hasarında bilirübine ilk maruz kalan hücreler astrositlerdir (5,56,80,81). Bilirübini hücre dışına atan pompa ekspresyonunun artışı ve yüksek antioksidan kapasiteleri nedeniyle, astrositlerin bilirübinin oluşturduğu oksidatif hasara nöronlardan daha dirençli olduğu ve nöronları toksik hasardan koruduğu bildirilmiştir (5,56). Bu nedenle deneysel olarak oluşturulan bir çok kernikterus modelinde astrositler kullanılmıştır. Bilirübinin sitotoksik etkisiyle hasarlanan astrositlerin, bilirübin ensefalopatisinin patogeneğinde önemli olduğu belirtilmiştir (5,24,28,46,81). Tüm bu bulgulara dayanılarak ciddi hiperbilirübinemi sırasında gelişen ensefalopatide astrositlerin önemli rolü olduğu ve gelecekteki tedavi modellerinde astrositlerin potansiyel hedef olacağı düşünülmektedir. Toksikolojik ve nörotoksikolojik çalışmalar için çok kullanışlı olan primer hücre kültür sistemleri ayrıca farklı nöron hücrelerinin toksinlere farklı duyarlılığının değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır (57). Biz de çalışmamızda bilirübinin toksik etkisini değerlendirmek için primer astrosit hücre kültürünü kullandık.

İndirekt bilirübinin plazma proteinlerine bağlı olmayan serbest fraksiyonu, elektriki olarak nötral diasitler olup; hücre membranlarını kolaylıkla geçebilir. İn-vitro çalışmalarda bilirübinin serbest fraksiyonunun, aköz saturasyonun altındaki konsantrasyonlarda (70 nM) nöron koruyucu olduğu (82), nörotoksik etki için eşik değerin 71-770 nM arasında değiştiği gösterilmiştir (2,25,49). Bilirübinin nörotoksik eşik değerinin geniş bir aralıkta olması, hücre fonksiyonları ve maturasyonunun, kullanılan metodların, kültürde bekleme sürelerinin farklı olmasından kaynaklanabilir (2). Çalışmamızda primer astrosit hücre kültürüne indirekt bilirübin sırasıyla 1000 µM, 800 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1 µM konsantrasyonlarda uygulandı. Diğer çalışmalara benzer şekilde bilirübin konsantrasyonu arttıkça hücre ölüm oranının arttığı ve TC<sub>50</sub> değerinin 50 µM olduğu saptandı (2,29,30,81,83).

Bilirübin nörotoksitesinin önlenmesi amacıyla birçok deneysel çalışma yapılmıştır.

Brito ve arkadaşlarının çalışmasında (23), glikoursodeoksikolik asidin, bilirübine bağlı oluşan lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu azaltarak nöroprotektif etkili olduğunu gösterilmiş. Silva ve arkadaşlarının çalışmasında (24), ursodeoksikolik asitin glial ve nöronal hücrelerde bilirübine bağlı gelişen apoptozisi inhibe ettiği saptanmış. Almaas ve arkadaşlarının çalışmasında (27), deksametazonun bilirübine bağlı interlökin 8 ve *Monocyte chemoattractant protein-1* salınımını inhibe ederek bilirubin nörotoksitesine karşı koruyucu etki gösterdiği bulunmuş. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında (26) profilaktik olarak uygulanan taurinin, hücre içi kalsiyum dengesini düzenleyerek ve apoptozisi inhibe ederek bilirubin nörotoksitesinde koruyucu etkili olduğu gösterilmiş. Grojean ve arkadaşlarının çalışmasında (25) NMDA reseptör antagonisti MK-801'in bilirubin nörotoksitesinde koruyucu etkili olduğu bildirilirken; Shapiro ve arkadaşlarının çalışmasında (45) bu koruyucu etki gösterilememiştir. Geiger ve arkadaşlarının çalışmasında (84), ratlarda bilirubin nörotoksitesini oluşturulmadan önce uygulanan minosiklinin antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkiyle nörotoksitesiyi ve *Brainstem auditory evoked response* bozukluğunu engellediği rapor edilmiştir. Ancak Li ve arkadaşlarının çalışmasında (85), minosiklinin ventral kohlear nukleus nöronlarında bilirübine bağlı hipereksitasyonu inhibe etmediği saptanmış. Becerir ve arkadaşlarının çalışmasında (83), profilaktik dokosaheksaenoik asitin, primer astrosit hücre kültüründe bilirübine bağlı apoptozisi azalttığı, hücre canlılığını ve antioksidan enzimleri arttırdığı gösterilmiş. Şahin'in tez çalışmasında (29), primer astrosit hücre kültürüne hem profilaktik hem de tedavi edici olarak uygulanan ginkgo bilobanın bilirubin sitotoksitesini ve apoptozisi azalttığı; Küçüktaşçı'nın tez çalışmasında (30), primer astrosit hücre kültürüne profilaktik ve tedavi edici olarak uygulanan Epo'nun bilirübine bağlı sitotoksitesiyi, apoptozis ve inflamatuvar sitokinleri azalttığı, hücre canlılığı ve antioksidan enzimleri arttırdığı saptanmış.

Hem in vivo, hem in vitro çalışmalarda nöroprotektif etkisi saptanan kafeinin, bu etkiyi antiapoptotik, antiinflamatuvar, antioksidan ve nörotrofik özellikleriyle gösterdiği bildirilmiştir (10-13,19-21). Adenozinin nörotransmitter sistemdeki inhibitor etkilerini önleyerek motor aktivasyonu ve uyanıklığı sağlayan kafeinin, nöronal sinyal regülasyonunda anahtar rol oynayan glutamati, A<sub>2a</sub> reseptör blokajı yaparak eksitotoksitesiyi önlediği gösterilmiştir (13,20,21).

DeneySEL çalışmalarda kullanılan bir günlük ratların 22-24 haftalık fetüse, üç günlük ratların 28-32 haftalık fetüse karşılık geldiği bildirilmektedir (86). Çalışmamızda iki günlük

yenidoğan ratlar kullanıldı. Fenton fetal-infant büyüme kartlarında 26-28 haftalık bebeklerin 50. persantil vücut ağırlığı 1 kg'a denk gelmektedir (87). BPD tedavisinde kafeinin tedavi edici plazma konsantrasyonu 8-20 µg/ml, kafeinin bu düzeyleri sağlayabilecek yükleme dozu 20-40 mg/kg, idame dozu 5-20 mg/kg olarak bildirilmektedir (63-65). Ağırlığı 1 kg olan bir bebeğin vücut yüzey alanı 0.12 m<sup>2</sup>'dir. Metrekare hesabı yapıldığında kafein idame dozu 40 mg/m<sup>2</sup> olarak saptanmıştır. Hücre kültüründe çalıştığımız petriker 25 cm<sup>2</sup> olduğundan, idame tedavi dozu 100 µM olarak hesaplanmıştır. Literatürde VLBW bebeklerde plazma tedavi edici konsantrasyonunun 80-110 µM olduğu bildirilmektedir (88).

Çalışmamızda astrosit hücre kültürüne uygulanan farklı dozlarda (5000 µM, 2500 µM, 1000 µM, 800 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1 µM) kafeinin hücre canlılığına etkisi araştırıldı. Hücre canlılığını %100 arttıran kafein konsantrasyonu 100 µM olarak saptandı. Bu doz aynı zamanda bizim hesapladığımız idame doz ile eşdeğerdir.

Bilirubin nörotoksitesinin altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar yoğun araştırmalara rağmen halen tam olarak aydınlatılamamış, ancak birçok mekanizma ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bilirubin toksitesine bağlı olarak, ratlarda nöron hücreleri ve mitokondri membranlarında lipid akışkanlığı, protein sıralanması ve redoks durumunun bozulduğu, mitokondriyal permeabilite ve sitokrom C salgılanmasının arttığı, mitokondrinin şiştiği, hücre enerji metabolizmasının, Na<sup>+</sup>-K<sup>-</sup> ATP az plazma membran transport sisteminin, Ca bağlayan protein ekspresyonunun bozulduğu, eksitotoksik nörotransmitter glutamat salgılanmasının artıp uptake'nin azaldığı, artan oksidatif stres, NO (nitrik oksit) ve inflamasyon sonucunda hücrenin nekroz ya da apoptoz ile ölüme gittiği gösterilmiştir (25,41,78,89). Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 50 µM konsantrasyonda indirekt bilirubin, hücre canlılığını yaklaşık %60 oranında azalttığı, apoptozisi yaklaşık 7 kat arttırdığı, profilaktik ve tedavi edici olarak uygulanan 100 µM kafeinin hücre canlılığını arttırdığı, apoptozisi azalttığı saptandı.

Hayvan çalışmalarında kafeinin hipoksinin oluşturduğu hasarı azaltarak beyin koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (10,11). Kronik hipoksi ve adenosin reseptör aktivasyonu, oligodendrositlerin maturasyonunun bozulmasına ve periventriküler beyaz cevher hasarına yol açmaktadır. Periventriküler beyaz cevher hasarı, serebral miyelinizasyon ve serebrokortikal volüm azalması, ventrikülomegali serebral palsy ve bilişsel bozuklukların en önemli nedenidir. Back ve arkadaşlarının çalışmasında (11) yenidoğan fareler postnatal 3-12.

günlerde hipoksik bırakılarak hipomiyelinizasyon ve ventrikülomegali oluşturulmuş. Hipoksik gruba 20 µM kafein uygulanması ile fare yavrularında miyelinizasyonun arttığı, ventrikülomegalinin azaldığı saptanmış. Bu çalışma ile kafeinin erken postnatal dönemde periventriküler beyaz cevher hasarını azaltabileceği sonucuna varılmış. Kumral ve arkadaşlarının çalışmasında (10) yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik hasardan sonra 1-7. günlerde 10 mg/kg dozda intraperitoneal uygulanan aminofilinin beyin hasarı ve kognitif fonksiyonlara etkisi araştırılmış. Hipoksik grupta apoptozisin arttığı, hipoksiden sonra aminofilin uygulanan grupta apoptozisin azaldığı saptanmıştır.

Deneyel çalışmalarda hiperoksinin oluşturduğu nöron hasarını kafeinin azalttığı gösterilmiştir (12). Endesfelder ve arkadaşlarının çalışmasında (12) altı günlük rat yavrularına hiperoksi maruziyetinden sonra uygulanan 10 mg/kg kafeinin, hiperoksiye bağlı nöron ölümünü ve apoptozisi azalttığı saptanmıştır. Gözlenen yararlı etkiler kafein ve metabolitlerinin antioksidan özelliklerine ve A<sub>1</sub> ve A<sub>2a</sub> reseptörlerinde adenozin ve kafein arasındaki yarışmaya dayandırılmış. Deneyel çalışmalarda nörotoksinlerin oluşturduğu nöron hasarını kafeinin azalttığı gösterilmiştir (13,14). Nobre ve arkadaşlarının çalışmasında (13) 6-hidroksidopamin ile nörotoksisite oluşturulan rat mezensefalik hücre kültürlerinde, kafein ve 8-(3-chlorostyryl)-caffeine'in sitotoksisiteyi önlediği, apoptozisi geriletmediği, lipid peroksidasyonu ve nitrit üretimini engellediği rapor edilmiştir. Alvira ve arkadaşlarının çalışmasında (14) yedi günlük rat yavrularında, 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) nörotoksin ile serebellar granül nöron kültüründe oluşturulan nörotoksisiteyi, 1-20 mM kafeinin apoptozisi azaltıp, hücre canlılığını arttırarak engellediği saptanmıştır. Adenozin reseptör antagonistleri kullanılarak, kafeinin nöron koruyucu etkisinin adenozin reseptör blokajına bağlı olmadığı, MPP+ nörotoksine bağlı apoptozisin *Ataxia Telangiectasia Mutant Kinaz/p53* yolağı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda primer astrosit hücre kültüründe bilirübinle oluşturulan sitotoksisitenin, sitotoksisite oluşturulmadan önce ve sonra uygulanan kafeinle gerilediği, apoptozun azaldığı, hücre canlılığının arttığı görülmekle birlikte proflaktik kafeinin daha etkili olduğu bulundu. Çalışmamızın sonuçları, diğer çalışmalar gibi kafeinin nöroprotektif etkili olduğunu desteklemektedir.

Ratlarda doğumdan sonra ilk iki hafta, nöron büyümesi ve sinaptogenezis için kritik dönemdir. Juarez ve arkadaşlarının çalışmasında (15), neonatal ratlarda kronik kafein uygulamasının, prefrontal korteks piramidal nöronlarında dendrit uzunluğuna etkisi araştırılmış. Postnatal 1-12. günlerde 50 mg/kg dozda, s.c verilen kafeinin etkisi puberteden

önce (postnatal 35. gün) ve puberteden sonra (postnatal 70. gün) incelendiğinde, prefrontal korteks piramidal nöronlarında dendrit uzunluklarında kalıcı artış saptanmış. Neonatal kafein uygulamasının, piramidal nöronlara etkisinin puberteye kadar devam ettiği ve dikkat, üç boyutlu öğrenme gibi bilişsel beyin fonksiyonlarını etkileyebileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda bilirubin sitotoksitesisi oluşturulan primer astrosit hücre kültüründe kafeinin erken etkileri araştırıldı ve nöroprotektif etkili olduğu gösterildi.

Kafeinin beyin koruyucu etkili olduğunu bildiren çalışmalar yanında, hücre ölümünü arttırdığını rapor eden çalışmalar da bulunmaktadır (90-92). Marret ve arkadaşlarının çalışmasında (90), yenidoğan rat beyin astrosit hücre kültürüne kafein eklenmesinin hücre sayısına etkileri araştırılmış. Astrosit hücre kültürüne 102  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda kafeinin astrosit hücre sayısında değişikliğe yol açmadığı, 255  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda kafeinin ise astrosit hücre sayısında %30 azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda astrosit hücre kültürüne 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda uygulanan kafeinin 48. saatte hücre canlılığını arttırdığı (Şekil 6), 100  $\mu\text{M}$  kafeinin hücre canlılığına etkisinin kontrol grubu ile benzer olduğu (Şekil 7), hem profilaktik hem de tedavi edici olarak uygulanan 100  $\mu\text{M}$  kafeinin bilirubin sitotoksitesini azaltarak 48. saatte hücre canlılığını arttırdığı (Şekil 7), 24. saatte apoptozu azalttığı (Şekil 8) saptandı. Çalışmamızda, Marret ve arkadaşlarının çalışmasının tersine, kafeinin daha yüksek konsantrasyonlarında (100-5000  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığının azalmadığı, hücre canlılığının maksimum %108'e ulaştığı görüldü.

Kang ve arkadaşlarının (91), in vivo olarak kafeinin nörotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında, yedi günlük rat yavrularına günde üç kez 50 mg/kg dozda i.p uygulanan kafeinin, ilk dozdan 24 saat sonra çeşitli beyin alanlarında apoptotik hücre ölümünü arttırdığı saptanmış. Aynı grubun in vitro çalışmasında glial-kortikal hücre nöronlarına 150-1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda kafein uygulamasından 24 saat sonra glia hücreleri ve astrositler intakt kalırken, kortikal nöronlarda 300-1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda doz bağımlı olarak nöron ölümünün arttığı ve nöron sayısının azaldığı saptanmış. Kafeinin 300  $\mu\text{M}$ 'dan yüksek dozlarda murine kortikal hücre kültüründe nörotoksik olduğu, nörotoksik etkinin oksidatif stres ve eksitotoksitesite aracılığıyla değil, selektif pro-apoptotik bir proteaz olan kaspaz 3 aktivasyonu aracılığıyla olduğu gösterilmiş. Çalışmamızda, Kang ve arkadaşlarının (91) in vitro çalışmasına benzer şekilde, astrosit hücre kültürüne 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda uygulanan kafeinin 48 saat sonra %100 hücre canlılığını sağladığı gösterildi.

Desfrere ve arkadaşlarının çalışmasında (92), yenidoğan farelere 3. gün 10 mg/kg



dozda, 4-10. günlerde 2,5 mg/kg dozda i.p olarak uygulanan kafeinin, ilk iki hafta, astrosit proliferasyon ve maturasyon markırları olan glial fibriler asidik protein ve *calcium binding protein β* ekspresyonunda doz bağımlı olarak geçici azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Astrositlerin nöron fonksiyonları ve plastisiteyi desteklediği, ekstrasellüler sıvı homeostazisini, nörotransmitter ve nörotrofik faktörlerin salınmasını düzenlediği vurgulanarak, postnatal dönemde uygulanan kafein etkisiyle astrositlerin azalması ve astrositogenezisin bozulmasının, aktif gelişme döneminde beyin fonksiyonlarını etkileyebileceği ileri sürülmüş. Çalışmamızda astrosit proliferasyon ve maturasyon markırları çalışılmamakla birlikte, tersine kafein uygulanmasından 48 saat sonra astrosit hücre canlılığının %100 konsantrasyonda devam ettiği gösterildi.

Kafeinin klinik çalışmalarda beyin koruyucu etkileri ilk kez Schmidt ve arkadaşlarının (17) 2007 yılında yapılan ve 2006 prematüreyi kapsayan retrospektif epidemiyolojik çalışmasında gösterilmiştir. Schmidt ve arkadaşlarının randomize, plasebo kontrollü çalışmasında (17,70), doğum ağırlığı 500-1250 gr olan 2006 bebekte, premature apnesi tedavisinde kullanılan metalksantinlerin 18-21. ayda nörogelişim ve büyümeye geç etkileri araştırılmış. Düzeltilmiş yaşları 18-21 aylık olduğunda, verilerine ulaşılabilen kafein grubunda 937, plasebo grubunda 932 bebek değerlendirilmiş. Plaseboyla karşılaştırıldığında kafein tedavisinin, serebral palsy (%4.4 vs %7.3 p=0.009) ve kognitif gecikme insidansını (%33.8 vs %38.3 p=0.04) anlamlı olarak azalttığı, düzeltilmiş yaş 18-21. ayda, nörogelişimsel bozukluk olmaksızın yaşam oranlarını arttırdığı saptanmıştır. Ancak aynı bebekler 5 yaşına geldiğinde kafein grubundaki 803 ve kontrol grubundaki 807 bebek tekrar değerlendirildiğinde, kafeinin nörogelişimsel bozukluk olmaksızın yaşam oranlarını düzeltmediği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda 26-28 haftalık pretermelere karşılık gelen iki günlük ratlardan elde edilen ve bilirubin toksisitesine maruz bırakılan primer astrosit hücre kültüründe, kafeinin bilirubin toksisitesini azalttığı saptandı. Çalışmamızın sonuçları, kafeinin erken dönemde nöroprotektif etkili olduğunu ve VLBW bebeklerde bu etkileri nedeniyle de kullanılabileceğini desteklemektedir.

VLBW pretermelerde kafeinin nörolojik sonuçları düzeltme mekanizmasını araştıran bir çalışmada, doğum ağırlığı <1251 gr pretermelere postnatal 3. gün yükleme ve idame dozda başlanan kafeinin düzeltilmiş 38-42 haftada beyine etkileri araştırılmış. Bu bebeklerde beyin MR görüntülerinde beyaz ve gri madde anormallikleri, tüm ve bölgesel beyin hacimleri açısından kontrol grubuyla fark saptanmazken; difüzyon MR değerlendirmesinde kafein

verilen pretermelerde beyaz cevher mikro yapısında belirgin gelişme saptanmış. Kronik kafein maruziyetinin pretermelerde serebral beyaz madde gelişmesini düzelterek nörogelişimsel sonuçları düzelttiği sonucuna varılmıştır (18). Deneysel çalışmamızda kafeinin beyaz cevhere etkileri araştırılmamakla birlikte, deneysel bilirubin toksisitesi modelinde kafeinin astrosit hücre canlılığını, antioksidan enzimleri arttırıp, apoptozu, proinflamatuvar sitokinleri azaltarak, nöron destek hücreleri astrositler aracılığıyla beyin koruyucu etkili oldukları gösterildi.

Apne profilaksisi ve tedavisi için kafein alması planlanan median gebelik yaşı 29 (24-33) hafta, doğum ağırlığı 1200 (590-2435) gr, postnatal yaşı 2 (1-14) gün olan 51 preterm bebeğin incelendiği bir çalışmada, 10 mg/kg dozda iv kafein tedavisinden önce ve sonra iki saat süreyle amplitüd entegre elektroensefalografi (aEEG) kaydı yapılmış. Kafein uygulanmasından sonra aEEG ile serebral kortikal aktivitenin arttığı gösterilmiş. Bu etkinin kafeinin nöroprotektif etkisiyle ilişkili olup olmadığı bilinmemekle birlikte, nöronal kortikal aktiviteyi azaltan ilaçların neonatal ratlarda nörogenezisi inhibe ettiği, nöronal dejenerasyona yol açtığı, düşük nöronal aktivitenin nöronlarda apoptozu arttırdığı, proliferasyonu engellediği, dolayısıyla kafeinle serebral kortikal aktivite artışının nöronların canlı kalma olasılığını arttıracak ileri sürülmüştür (69). Apne profilaksisi ve tedavisinde kullanılan ve yukarıdaki çalışmada serebral kortikal aktiviteyi arttırıcı etkilerinin nöron canlılığını destekleyeceği yorumlanan kafeinin, çalışmamızda bilirubin nörotoksitesinin yıkıcı etkilerini düzelttiği gösterildi.

Aerobik metabolizma sırasında, normal hücre fonksiyonun bir parçası olarak sürekli oluşan serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı hücrelerin korunma mekanizmaları bulunmaktadır. Vücuttaki oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki denge oksidan güçler lehine bozulduğunda hücre ve doku hasarı meydana gelmekte, oksidatif stresle ilişkili hastalıklar oluşmaktadır (93,94). Dokularda oksidatif hasara karşı antioksidan enzim sistemleri SOD, CAT, GPx'dir. Enzimatik olmayan endojen antioksidanların en önemlilerinden biri ise glutatyondur (56,95). Oksidatif hasarın önlenmesinde hayati önemi olan SOD, süperoksitin  $H_2O_2$ 'ye dismutasyonunu hızlandırmakta, daha sonra CAT enzimi oluşan  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye dönüştürerek detoksifiye etmektedir. GPx hücrelerde oluşan hidroperoksitleri uzaklaştırır ve intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir (93). Yüksek konsantrasyonlarda bilirubin, kortikal sinaptozom membranında lipid peroksidasyonunu, protein oksidasyonunu ve serbest radikalleri arttırarak

oksidatif stresi indüklediği, bu durumun redükte glutatyon (GSH)/okside glutatyon (GSSG) oranının azalmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (41). Bilirübine maruz kalan nöronlarda NADPH ve sistein azalmasına sekonder GSH'de azalma, GSH öncüsü olan N-asetil sistein verilen ratlarda, bilirübünün indüklediği oksidasyonda azalma gösterilmiştir (28).

Lee ve arkadaşlarının (96) deneysel çalışmasında, kafeinin ana metabolitleri 1-metilksantin ve 1-metilurik asid'in, fizyolojik (40 mikromol/l) konsantrasyonlarda antioksidan özellik gösterdiği, in vitro şartlarda LDL oksidasyonunu önleyebildiği bildirilmiştir. Mukhopadhyay ve arkadaşlarının çalışmasında (97), yetişkin farelere 1 ay süre ile 20 mg/kg/gün dozda uygulanan kafeinin, hepatik CAT ve SOD aktivitelerini arttırdığı, MDA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Yetişkin ratlarda yapılan bir başka çalışmada, serebral iskemi-reperfüzyonla oluşturulan serebral hasara karşı çayda doğal olarak bulunan kafein (10 mg/kg iv.) ve theanin (1mg/kg/m<sup>2</sup> ip.) tedavilerinin etkinliği araştırılmış. Theanin ve kafein kombine tedavisinin, serebral iskemi-reperfüzyondan sonra oluşan beyin ödemi ve enfarktını, MDA'yı önemli ölçüde azalttığı; SOD, GPx ve glutatyon seviyelerini belirgin arttırdığı saptanmış ve nöroprotektif etki antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerine bağlanmıştır (98). Devasagayam ve arkadaşlarının çalışmasında (99) 1 mM konsantrasyondaki kafeinin antioksidan etkiyle yetişkin rat karaciğerinde serbest oksijen radikallerini inaktive ettiği, lipid peroksidasyonunu azalttığı ve mitokondriyal membranları yetmezlikten koruduğu bildirilmiştir.

Abreu ve arkadaşlarının çalışmasında (100) 21 günlük ratlarda kronik kafein (90 gün süreyle 20-40 mg/kg/gün) tüketiminin rat beyninde antioksidan sistem ve bilişsel davranışlar üzerindeki etkileri araştırılmış ve kafeinin lipid peroksidasyonunu azaltıp, redükte glutatyonu, glutatyon redüktaz ve SOD aktivitelerini arttırarak antioksidan sistemi koruduğu, yaşa bağlı bilişsel fonksiyonlardaki azalmayı önlediği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda yenidoğan rat astrosit hücre kültürü modelinde, 50 µM bilirübinle oluşturulan sitotoksitenin, antioksidan etkili CAT, GPx, SOD enzim aktivitelerini ve glutatyon düzeyini düşürdüğü, 100 µM kafeinin profilaktik ve tedavi edici olarak uygulanmasının CAT, GPx, SOD aktivitelerini ve glutatyon düzeyini yükselttiği gösterildi. Tüm bu bulgular kafeinin bilirübin sitotoksitesinde etkili bir antioksidan olduğunu desteklemektedir.

Oksidatif stres belirteçleri ile TNF- $\alpha$  salınımı ve NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu koreledir. Bilirübünün etkisi ile astrositler ve nöronlardan NF- $\kappa$ B ve mitojen aktive edici protein kinaz aracılığıyla TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 sekresyonu artıp inflamatuvar reaksiyona sebep olmaktadır.

Sitokinlerin astroglial hücrelerin ölümünü indükleyici etkisi olup, bu kaskadı bloke edecek ajanların indirekt bilirübine bağlı beyin hasarını önleyebileceği düşünülmektedir (23,46).

VLBW ( $\leq 30$  hf) bebeklerde median 3. gün başlanan kafeinin (20 mg/kg yükleme, 5 mg/kg idame) sitokine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, tedavinin 7. günü terapötik serum kafein düzeylerinin (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ) proinflamatuvar TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6'yı azalttığı, antiinflamatuvar IL-10'u arttırdığı  $\geq 20$   $\mu\text{g/ml}$  serum kafein düzeylerinin ise proinflamatuvar sitokinleri arttırdığı, IL-10'u azalttığı saptanmış. Çalışmamızda literatüre uygun olarak 20  $\mu\text{g/ml}$  'ye karşılık gelen 100  $\mu\text{M}$  kafein kullanıldı ve kafeinin bu konsantrasyonda, bilirubin sitotoksitesini oluşturulan astrositlerde antiinflamatuvar etkili olduğu gösterildi (101). Prematüre apnesi tedavisinde yaygın olarak kullanılan kafeinin, proinflamatuvar etkilerinden sakınmak için, kan düzeylerinin monitörizasyonu konusunda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Chavez-Valdez ve arkadaşlarının (19) çalışmasında, lipopolisakkarid (LPS)'le aktive olan kord kanı monositlerine maternal uygulanan kafeinin, adenosin reseptör mRNA ve protein ekspresyonuna etkileri araştırılmış. LPS'in monositlerde A<sub>1</sub>R ekspresyonunda artışa, 50  $\mu\text{M}$  kafeinin TNF- $\alpha$  sekresyonunda %20-50 azalmaya yol açtığı saptanmış. Kafeinin, A<sub>1</sub>R blokajı yoluyla TNF- $\alpha$  yapımını inhibe ederek antiinflamatuvar etkili olduğu vurgulanmış. Çalışmamızda profilaktik ve tedavi edici olarak uygulanan kafeinin, bilirubin sitotoksitesine bağlı artan TNF- $\alpha$  ve inflamatuvar biyomarkırlar IL-1 $\beta$ , IL-6 düzeylerini azalttığı saptandı. Bu sonuçlar, yenidoğanlarda apne profilaksisi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan kafeinin, adenosin reseptör antagonizması yoluyla antiinflamatuvar etki sağlayarak, hiperbilirubinemiye bağlı beyin hasarını da azaltabileceğini desteklemektedir.

Önceki çalışmalarda inflamasyonun, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretiminin artmasıyla ilişkili olduğu, bilirubin indüklediği nöronal oksidatif hasarda NO'nun anahtar mediyatör olduğu bildirilmiştir. Bilirubin postsinaptik nöronda NMDA subtip glutamat reseptörünü uyarması sonucu nöronal NO sentaz ekspresyonu, NO sentezi ve nitrit üretimi artmaktadır. Yapımı artan NO'nun, protein oksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, enerji eksikliği, glutatyon azalması, apoptozis ve hücre ölümüne yol açtığı, NO sentaz inhibitörü L-NAME uygulanmasıyla bilirubin nörotoksitesinin azaldığı gösterilmiştir (80,89,102). Nobre ve arkadaşlarının çalışmasında (13) rat mezensefalik hücre kültürlerinde 6-hidroksidopamin ile oluşturulan hasardan sonra uygulanan kafein ve 8-(3-chlorostyryl)-caffeine'in nitrit yapımı ve beyin hasarını önlediği saptanmıştır. Çalışmamızda bilirubin sitotoksitesine bağlı artan total nitrat/nitritin, profilaktik ve tedavi edici olarak uygulanan kafeinle azaldığı saptandı. Bu

sonuç, bilirubin sitotoksitesinde kafeinin antinitrozatif etkili olduğunu desteklemektedir.

TLR' ler mikroorganizmalara karşı doğal immün cevabın oluşmasında önemli rolü olan transmembran proteinlerdir. Güncel kanıtlar TLR'lerin, ekzojen patojen ilişkili LPS gibi moleküler paternlerden başka, noninfeksiyöz doku hasarıyla ilişkili sodium hiyaluronat, fibrin gibi moleküler patern ve ligandları da tanıyarak, patojenden bağımsız inflamasyon oluşumunda önemli rollerinin olduğunu desteklemektedir. Organel yıkımı ve hücre ölümüne yol açan doku hasarının, TLR ligantları gibi davranan endojen hasar molekülleri oluşturduğu gösterilmiştir (103-105). Glial hücre membranında eksprese olan TLR4'ün çeşitli patojenler ve hasarlanan hücreler tarafından aktive edilmesiyle, glial hücrelerden TNF- $\alpha$ , NO, IL-1 $\beta$  ve reaktif O<sub>2</sub> radikalleri gibi inflamatuvar sitokin, kemokin, nörotoksik maddelerin salgılanmasının ve buna bağlı doku ve hücre hasarının arttığı bildirilmiştir (105).

TLR'lerin beyin hücreleri ve inflamatuvar hücreler üzerindeki ekspresyonu ile serebral hastalıkların patogeneze katkısı olduğu düşünülmektedir. Serebral iskemide, beyin parankiminde lökosit infiltrasyonu ile karakterize yoğun bir inflamasyon olduğu, inflamasyona katılan nötrofillerin TLR4 aktivasyonu ile oluşturdukları inflamatuvar cevabın infarkt alanını arttırdığı gösterilmiştir (103). Demansın en sık görülen formu olan Alzheimer hastalığında mikroglialar tarafından sentezlenen TLR'lerin önem kazandığı düşünülmüş ve TLR4'ün TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 gibi sitokinlerin düzeylerinde artışa ve mikroglial nörotoksitesiteye neden olduğu bildirilmiştir (104).

Liu ve arkadaşlarının çalışmasında (105), TLR4 taşıyan ve TLR4 ekarte edilmiş yenidoğan farelerde hiperoksinin etkisi incelendiğinde, hiperoksinin kontrol grubuna göre TLR4 taşıyan farelerde mikroglial hücre apoptozunda, reaktif oksijen radikallerinde artışa, TLR4 mRNA ve TNF- $\alpha$  mRNA artışına ve bilişsel düzeylerde bozukluğa neden olduğu gösterilmiştir; TLR4'ün hiperoksiye bağlı beyin hasarında önemli rolü olduğu yorumu yapılmıştır. Tunç ve arkadaşlarının (68) çalışmasında kafeinin yenidoğan rat akciğerinde TLR2, TLR4 ve TLR9 düzeylerine etkisi araştırılmış ve kafein alan grupta TLR 2 ve TLR4 düzeyleri azalırken, TLR9 düzeyinin arttığı saptanmıştır. Kafeinin yararlı etkileri TLR9 artışı ile ilişkilendirilerek TLR9'un antiinflamatuvar etkinlik gösterdiği ve BPD üzerinde yararlı etkilerinin olabileceği vurgulanmıştır. Çalışmamızda 26-28 haftalık yenidoğana karşılık gelen ratlardan enfeksiyondan bağımsız olarak oluşturulan astrosit hücre kültüründe bilirubin sitotoksitesinin TLR4 düzeyini, inflamatuvar mediatörler TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve total nitrat/nitrit düzeylerini arttırdığı, TLR9 düzeyini azalttığı, profilaktik ve tedavi edici olarak

uygulanan kafeinin TLR4, inflamatuvar mediatörler TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve total nitrat/nitrit düzeylerini azaltırken, TLR9 düzeyini arttırdığı saptandı.

Term bebeklerde TLR4 ekspresyonunun, doğumdan sonra intestinal mukozanın bakterilere normal adaptasyonuna izin verecek düzeylere hızla indiği, preterm barsağında ise TLR4 ekspresyonunun arttığı ve fonksiyonel olarak da aktif olduğu, ontogeni nedeniyle TLR4'ün doğumdan sonra da yüksek kaldığı bilinmektedir. Nekrotizan enterokolit riskini arttıran TLR4'ün preterm barsağında ekspresyon ve aktivitesinin yüksek olmasının nedeni, TLR4'ün intestinal epitel farklılaşmasındaki regülatör rolüyle açıklanmıştır. TLR9 agonistleri örneğin bakteriyel CpG-DNA verilmesinin intestinal mukozada TLR4 sinyalini azaltarak NEK gelişimini önlediği, probiyotik bakterilerin NEK sıklığı ve şiddetini bu yolla azalttığı yorumu yapılmış (106). TLR4, prematüre beyninde büyük çoğunlukla innate immün sistemi temsil eden mikrogliya hücre membranlarında eksprese olmakta ve mikrogliaların aktivasyonu ve fonksiyonel regülasyonuna katkı sağlamaktadır. Yenidoğan mürinlerde yapılan bir çalışmada, astrosit hücre kültüründe TLR4 ve TLR9 mRNA ekspresyonu gösterilmiştir (107). Term bebek beynine göre prematüre beyninde TLR4 ekspresyonu ve aktivasyonunun daha fazla olduğu konusunda bir çalışmaya rastlamamakla birlikte, preterm bebeklerde daha düşük bilirübin düzeylerinde nörotoksisite gelişmesi, glial hücrelerde prematürelige bağlı ekspresyonu ve fonksiyonu artan TLR4'e bağlı olabilir. Çalışmamızda astrosit hücre modelinde bilirübünün TLR4'ü arttırdığı, TLR9'u azalttığı gösterildi. Ayrıca preterm ve term bebeklerde apne tedavisi ve profilaksisinde kullanılan kafeinin, TLR4'ü, inflamatuvar sitokinleri, apoptozu azaltarak ve TLR9'u arttırarak bilirübin sitotoksisitesini inhibe ettiği saptandı. Özellikle anne sütü verilemeyen pretermelerde, erken kafein ve probiotik tedavisinin, TLR4'ü azaltarak bilirübünün olası sitotoksik etkilerine karşı beyin koruyucu etkilerinin araştırılması gerektiğini düşünüyoruz.

Bu çalışma, primer astrosit hücre kültüründe 50  $\mu$ M konsantrasyonda bilirübinle oluşturulan sitotoksisiteyi, özellikle profilaktik olmak üzere, hem profilaktik hem de tedavi edici olarak uygulanan 100  $\mu$ M kafeinin azalttığını gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışmada kafeinin bu etkiyi antisitotoksik, antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuvar ve antinitrozatif özellikleriyle gösterdiği saptandı. Yine bu çalışmada kafeinin, bilirübine bağlı sitotoksisite oluşturulan astrositlerde TLR4 inhibisyonuyla proinflamatuvar kaskadı inhibe ettiği gösterildi. Astrosit hücre kültürü modelinde, bilirübin sitotoksisitesini pek çok mekanizmayla azaltan kafeininin, düşük bilirübin düzeylerinde bile nörotoksisite gelişen pretermelerde beyin

koruyucu etkilerinin gösterilebilmesi ve gelecekte terapötik ajan olarak kullanılabilmesi için in vivo ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

## SONUÇLAR

- 1-** Astrosit hücre kültüründe 1-1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda uygulanan indirekt bilirübinin, konsantrasyonu arttıkça astrosit hücre ölümünü arttırdığı, astrosit hücrelerinin %50'sine toksik etkili olan indirekt bilirübin konsantrasyonunun ( $\text{TC}_{50}$ ) 50  $\mu\text{M}$  olduğu saptandı.
- 2-** Hücre canlılığını %100 arttıran kafein konsantrasyonu 100  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi.
- 3-** Başlangıçtan 48 saat sonra hücre canlılığının kontrol grubunda  $100.00 \pm 0.42$ 'ye ulaştığı, bilirübin grubunda azaldığı ( $39.01 \pm 0.56$ ) görüldü ( $p < 0.001$ ). Kafeinin hem profilaktik ( $83.22 \pm 0.42$ ) hem de tedavi edici ( $78.55 \pm 0.56$ ) olarak uygulanmasının hücre canlılığını arttırdığı görüldü (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).
- 4-** Apoptozisin, kontrol grubuna göre ( $4.94 \pm 1.72$ ) bilirübin grubunda ( $34.19 \pm 2.60$ ) belirgin arttığı görüldü ( $p < 0.001$ ). Kafeinin hem profilaktik ( $5.82 \pm 1.41$ ) hem de tedavi edici ( $9.21 \pm 2.56$ ) kullanılmasının apoptozisi belirgin azalttığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).
- 5-** Bilirübinin CAT aktivitesini ( $3.38 \pm 0.52$  U/mg), kontrol grubunun CAT aktivitesine ( $7.58 \pm 0.25$ ) göre belirgin azalttığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin hem profilaktik ( $12.41 \pm 2.14$  U/mg), hem tedavi edici ( $14.02 \pm 1.75$  U/mg) olarak uygulanmasının CAT aktivitesini belirgin arttırdığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).
- 6-** Bilirübinin glutasyon düzeyini ( $1.06 \pm 0.10$   $\mu\text{M}$ ), kontrol grubunun glutasyon düzeyine ( $2.82 \pm 0.21$   $\mu\text{M}$ ) göre azalttığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin profilaktik ( $2.72 \pm 0.20$   $\mu\text{M}$ ) ve tedavi edici ( $2.71 \pm 0.20$   $\mu\text{M}$ ) olarak uygulanmasıyla glutasyon düzeyinin arttığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ) ( $p < 0.001$ ).
- 7-** Bilirübinin GPx aktivitesini ( $0.89 \pm 0.10$  U/mg), kontrol grubunun GPx aktivitesine ( $6.36 \pm 0.11$ ) göre belirgin azalttığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin hem profilaktik ( $2.26 \pm 0.10$  U/mg) hem de tedavi edici ( $1.92 \pm 0.10$  U/mg) olarak uygulanmasının GPx aktivitesini arttırdığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ) ( $p < 0.001$ ).
- 8-** Bilirübinin SOD aktivitesini ( $9.06 \pm 0.19$  U/ml), kontrol grubunun SOD aktivitesine ( $20.01 \pm 0.20$  U/ml) göre belirgin azalttığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin hem profilaktik ( $11.75 \pm 0.19$  U/ml) hem de tedavi edici ( $23.41 \pm 0.21$  U/ml) olarak uygulanmasının SOD aktivitesini arttırdığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).
- 9-** Bilirübinin MDA düzeyini ( $2.19 \pm 0.14$   $\mu\text{M}$ ), kontrol grubunun MDA düzeyine ( $1.48 \pm 0.13$   $\mu\text{M}$ ) göre arttırdığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin hem profilaktik ( $1.31 \pm 0.15$   $\mu\text{M}$ ), hem de tedavi



edici ( $1.39 \pm 0.12 \mu\text{M}$ ) olarak uygulanmasının MDA düzeyini azalttığı görüldü (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).

**10-** Bilirübinin total nitrat/nitrit düzeyini ( $20.41 \pm 0.37 \mu\text{M}$ ), kontrol grubunun total nitrat/nitrit düzeyine ( $8.85 \pm 0.25 \mu\text{M}$ ) göre belirgin arttırdığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin hem profilaktik ( $7.57 \pm 0.65 \mu\text{M}$ ), hem de tedavi edici ( $9.17 \pm 0.72 \mu\text{M}$ ) olarak uygulanmasının total nitrat/nitrit düzeyini belirgin azalttığı görüldü (sırasıyla  $p < 0.001$ ) ( $p < 0.001$ ).

**11-** Bilirübinin IL-1 $\beta$  düzeyini ( $21.41 \pm 0.12 \text{ pg/ml}$ ), kontrol grubunun IL-1 $\beta$  düzeyine ( $10.46 \pm 0.13 \text{ pg/ml}$ ) göre belirgin arttırdığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin hem profilaktik ( $15.35 \pm 0.18 \text{ pg/ml}$ ), hem de tedavi edici ( $17.25 \pm 0.19 \text{ pg/ml}$ ) olarak uygulanmasının, IL-1 $\beta$  düzeyini belirgin azalttığı görüldü (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).

**12-** Bilirübinin IL-6 düzeyini ( $5.18 \pm 0.19 \text{ pg/ml}$ ), kontrol grubunun IL-6 düzeyine ( $4.27 \pm 0.16 \text{ pg/ml}$ ) göre arttırdığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin profilaktik ( $2.91 \pm 0.11 \text{ pg/ml}$ ) ve tedavi edici ( $3.30 \pm 0.12 \text{ pg/ml}$ ) olarak uygulanmasının IL-6 düzeyini azalttığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).

**13-** Bilirübinin TNF- $\alpha$  düzeyini ( $162.90 \pm 1.53 \text{ pg/ml}$ ), kontrol grubunun TNF- $\alpha$  düzeyine ( $89.88 \pm 1.76 \text{ pg/ml}$ ) göre iki kat arttırdığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin hem profilaktik ( $108.61 \pm 2.25 \text{ pg/ml}$ ), hem de tedavi edici ( $112.44 \pm 2.48 \text{ pg/ml}$ ) olarak uygulanmasının TNF- $\alpha$  düzeyini belirgin azalttığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).

**14-** Bilirübinin TLR4 düzeyini ( $5.20 \pm 0.38 \text{ ng/ml}$ ), kontrol grubunun TLR4 düzeyine ( $1.56 \pm 0.13 \text{ ng/ml}$ ) göre belirgin arttırdığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin hem profilaktik ( $3.22 \pm 0.25 \text{ ng/ml}$ ), hem de tedavi edici ( $2.10 \pm 0.17 \text{ ng/ml}$ ) olarak uygulanmasının TLR4 düzeyini belirgin azalttığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).

**15-** Bilirübinin TLR9 düzeyini ( $74.68 \pm 2.64 \text{ ng/ml}$ ), kontrol grubunun TLR9 düzeyine ( $142.21 \pm 2.98 \mu\text{M}$ ) göre belirgin azalttığı ( $p < 0.001$ ); kafeinin profilaktik ( $114.65 \pm 2.84 \text{ ng/ml}$ ) ve tedavi edici ( $94.45 \pm 2.98 \text{ ng/ml}$ ) olarak uygulanmasıyla TLR9 düzeyini arttırdığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ).

## KAYNAKLAR

1. Alpay F, Yurdakök M, Erdem G. Sarılık. TND Neonatoloji. Ankara: Alp Ofset, 2004:559-78.
2. Ostrow JD, Pascolo L, Tiribelli C. Reassessment of the unbound concentrations of unconjugated bilirubin in relation to neurotoxicity in vitro. *Pediatr Res* 2003;54:98-104.
3. Mc Donald JW, Shapiro SM, Silverstein FS, Johnston MV. Role of glutamate receptor-mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the gunn rat model. *Exp Neurol* 1998;150:21-9.
4. Ostrow JD, Pascolo L, Brites D, Tiribelli C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends Mol Med* 2004;10:65-70.
5. Silva RFM, Rodrigues CMP, Brites D. Rat cultured neuronal and glial cells respond differently to toxicity of unconjugated bilirubin. *Pediatr Res* 2002;51:535-41.
6. Gartner LM, Snyder RN, Chabon RS, Bernstein J. Kernicterus: high incidence in premature infants with low serum bilirubin concentrations. *Pediatrics* 1970;45(6):906-17.
7. Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol* 2003;29:410-21.
8. Watchko JF. Neonatal indirect hyperbilirubinemia and kernicterus. In: Gleason CA, Devaskar SU, eds. *Avery's diseases of the newborn*. 9 th Ed. Philadelphia:Elsevier Saunders, 2012;1123-42.
9. Picone S, Bedetta M, Paolillo P. Caffeine citrate: when and for how long. A literature review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25:11-4.
10. Kumral A, Yesilirmak DC, Aykan S, Genc S, Tugyan K, Cilaker S. Protective effects on

methylxanthines on hypoxia-induced apoptotic neurodegeneration and long-term cognitive functions in the developing rat brain. *Neonatology* 2010;98:128-36.

11. Back SA, Craig A, Luo NL, Ren J, Akundi RS. Protective effects of caffeine on chronic hypoxia-induced perinatal White matter injury. *Ann Neurol* 2006;60:696-705.

12. Endesfeldern S, Zaak I, Weichelt U, Bühner C, Schmitz T. Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. *Free Radic Biol Med* 2014;221–34.

13. Nobre HV, Cunha GM, de Vasconcelos LM, Magalhaes HI, Neto RN, Maia FD. Caffeine and CSC, adenosine A2A antagonist, offer neuroprotection against 6-OHDA induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochem Int* 2010;56:51-8.

14. Alvira D, Yeste-Velasco M, Folch J, Casadesus G, Smith MA, Pallas M. Neuroprotective effects of caffeine, against complex I inhibition-induced apoptosis are mediated by inhibition of the Atm/P53/E2F-1 path in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 2007;85:3079-88

15. Juarez-Mendez S, Carretero R, Martinez-Tellez R. Neonatal caffeine administration causes a permanent increase in the dendritic length of prefrontal cortical neurons of rats. *Synapse* 2006;60:450–55.

16. Lodha A, Seshia M, McMillan DD, Barrington K, Yang J, Lee SK, Shah PS. Association of early caffeine administration and neonatal outcomes in very preterm neonates. *JAMA Pediatr* 2015;169(1):33-8.

17. Schmidt B, Roberts RS, Davis P. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* 2007;357:1893–1902.

18. Doyle LW, Cheong L, Hunt RW. Caffeine and Brain Development in Very Preterm Infants. *Ann Neurol* 2010;68:734–42.

19. Chavez-Valdez R, Wills-Karp M, Ahlawat R, Cristofalo EA, Nathan A, Gaudo EB. Caffeine modulates TNF- $\alpha$  production by cord blood monocytes: The role of adenosine

receptors. *Pediatr Res*. 2009;65:203–8.

20. Dall'Igna OP, Porciuncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2a receptor blockade of betaamyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol* 2003;138:1207-9.

21. Schwarzschild MA, Xu K, Oztas E, Petzer JP, Castagnoli N, Chen JF. Neuroprotection by caffeine and more specific A2A receptor Antagonist in animal models of Parkinson's disease. *Neurology* 2003;61:55-61.

22. Tastekin A, Gepdiremen A, Ors R, Buyukokuroglu ME, Halici Z. Protective effect of L-carnitine against bilirubin-induced neuronal cell death. *Brain Dev* 2006;28:436-9.

23. Brito MA, Lima S, Fernandes A, Falcao AS, Silva RFM, Butterfield DA. Bilirubin injury to neurons: Contribution of oxidative stress and rescue by glyoursodeoxycholic acid. *Neurotoxicol* 2008;29:259-69.

24. Silva RFM, Rodrigues CMP, Brites D. Bilirubin induced apoptosis in cultured rat neural cells is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 2001;34:402-8.

25. Grojean S, Koziel V, Vert P, Daval JL. Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons. *Exp Neurol* 2000;166:334-41.

26. Zhang B, Yang X, Gao X. Taurine protects against bilirubin-induced neurotoxicity in vitro. *Brain Res* 2010;1320:159-67.

27. Almaas R, Hankø E, Mollnes TE, Rootwelt T. Dexamethasone reduces bilirubin-induced toxicity and IL-8 and MCP-1 release in human NT2-N neurons. *Brain Res* 2012;1458:12-7.

28. Brito MA, Rosa AI, Falcao AS, Fernandes A, Silva RFM, Butterfield. Unconjugated bilirubin differentially affects the redox status of neuronal and astroglial cells. *Neurobiol Dis*

2008;29:30-40.

29. Şahin Ö. Bilirubin sitotoksitesisi oluşturulan yenidoğan rat astrosit hücre kültüründe ginkgo bilobanın etkisinin araştırılması (Yan Dal Uzmanlık Tezi). Denizli: Pamukkale Üniversitesi; 2012.

30. Küçüktaşçı K. Yenidoğan rat astrositlerinde oluşturulan bilirubin nörotoksitesisine eritropoetinin etkisi (Yan Dal Uzmanlık Tezi). Denizli: Pamukkale Üniversitesi; 2013.

31. Çetinkaya M, Köksal N, Özkan H. Yenidoğan sarılıklarında tedavi yaklaşımı. Güncel Pediatri 2006;3:118-23.

32. Cohen RS, Wong RJ, Stevenson DK. Understanding neonatal jaundice: a perspective on causation. Pediatr Neonatol 2010;51:143-8.

33. Can G, Çoban A, İnce Z. Yenidoğanda sarılık. Neyzi O, Ertuğrul T. ed. Pediatri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2010:467-90.

34. Ovalı F. İndirekt hiperbilirubinemi. Dağoğlu T, Ovalı F. ed. Neonatoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2007:517-36.

35. Kaplan M, Wong RJ, Sibley E, Stevenson DK. Neonatal jaundice and liver disease. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. Fanaroff and Martin's neonatal-perinatal medicine. Diseases of the fetus and infant. 10 th ed. Philadelphia:Elsevier Mosby, 2015:1618-73.

36. Kul M, Tunç T. Neonatal kolestaz. Türkiye Klinikleri J Pediatr 2009;18:105-16.

37. Davis AR, Rosenthal P, Escobar GJ, Newman TB. Interpreting conjugated bilirubin levels in newborn. J Pediatr. 2011;158:562-5.

38. Hansen TWR. Bilirubin oxidation in brain. Mol Genet Metab 2000;71:411-7.

39. Vural M. Bilirubin nörotoksitesi. *Güncel Pediatri* 2008;1:112-3.
40. Hansen TWR. Bilirubin brain toxicity. *J Perinatol* 2001;21:48-51.
41. Brito MA, Brites D, Butterfield DA. A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes. *Brain Res* 2004;1026:33-43.
42. McDonagh AF. Controversies in bilirubin biochemistry and their clinical relevance. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;30:1-7.
43. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutasyonun rolü. *T Klin Tıp Bilimleri* 2002;22:442-8.
44. Aktaş M, Değirmenci U, Ercan SK, Tamer L, Atik U. Redükte glutasyon ölçümünde HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2005;3:95-9.
45. Shapiro SM, Sombati S, Geiger A, Rice AC. NMDA channel antagonist MK-801 does not protect against bilirubin neurotoxicity. *Neonatology* 2007;92:248-57.
46. Fernandes A, Vaz AR, Falcao AS, Silva RFM, Brito MA, Brites D. Glycoursodeoxycholic acid and interleukin-10 modulate the reactivity of rat cortical astrocytes to unconjugated bilirubin. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:789-98.
47. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996;44:959-68.
48. Bhutani VK, Johnson L. Kernicterus in the 21st century: frequently asked questions. *J Perinatol* 2009;29:20-4.
49. Ostrow JD, Pascolo L, Shapiro SM, Tiribelli C. New concepts in bilirubin encephalopathy.

Eur J Clin Invest 2003;33:988-97.

50. Çoban A. İndirekt hiperbilirubinemi tedavisi. Güncel Pediatri 2006;4:114-7.

51. Shapiro SM. Definition of the clinical spectrum of kernicterus and bilirubin-induced neurologic dysfunction (BIND). J Perinatol 2005;25:54-9.

52. Shapiro SM. Chronic bilirubin encephalopathy: diagnosis and outcome. Semin Fetal Neonatal Med 2010;15:157-63.

53. Acunaş B. Hiperbilirubinemde tedavi. Güncel Pediatri 2008;6:114-8.

54. Lanone S, Bloc S, Foresti R, Almolki A, Callebert J, Conti M. Bilirubin decreases NOS2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. FASEB J 2005;19:1890-2.

55. Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:5918-22.

56. Yılmaz Ö, Taşkıran D. Astrosit hücre kültürlerinde pH değişikliğinin yarattığı toksisite ve glutasyonun koruyucu etkisi. J Neurol Sci (Turk) 2010;22:61-8.

57. Silva RFM, Falcao AS, Fernandes A, Gordo AC, Brito MA, Brites D. Dissociated primary nevre cell cultures as models for assesment of neurotoxicity. Toxicol Lett 2006;163:1-9.

58. Aksoy M. Ansiklopedik Beslenme, Diyet ve Gıda Sözlüğü. Ankara: Hatipoğlu Yayınları, 2007: 300-1.

59. International Food Information Council Foundation Caffeine & Health: Clarifying The Controversies. Washington DC. March 2008.

60. Barone JJ, Roberst H. Caffeine consumption. Food Chem Toxicol 1996;34:119-29.

61. Julien CA, Joseph V, Bairam A. Caffeine reduces apnea frequency and enhances ventilatory long-term facilitation in rat pups raised in chronic intermittent hypoxia. *Pediatr Res* 2010;68:105-11.
62. Kassim Z, Greenough A, Rafferty GF. Effect of caffeine on respiratory muscle strength and lung function in prematurely born, ventilated infants. *Eur J Pediatr* 2009;168:1491-5.
63. Natarajan G, Botica MI, Thomas R, Aranda JV. Therapeutic drug monitoring for caffeine in preterm neonates: an unnecessary exercise? *Pediatrics* 2007;119:936-40.
64. Mohammed S, Nour I, Shabaan A, Shouman B, Abdel-Hady H, Nasef N. High versus low-dose caffeine for apnea randomized controlled trial. *Eur J Pediatr* 2015;174(7):949-56
65. Steer P, Flenady V, Shearman A. Caffeine Collaborative Study Group Steering Group. High dose caffeine citrate for extubation of preterm infants: a randomized controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89(6):499-503.
66. Ment LR, Schwartz M, Makuch RW. Association of chronic sublethal hypoxia with ventriculomegaly in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;197-203.
67. Turner CP, Yan H, Schwartz M. A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and White matter loss. *Neuroreport* 2002;12:1199-1204
68. Tunc T, Aydemir G, Karaoglu A. Toll-like receptor levels and caffeine responsiveness in rat pups during perinatal period. *Regulatory peptides* 2013;182:41-4.
69. Supcun S, Kutz P, Pielemeier W, Roll C. Caffeine increases cerebral cortical activity in preterm infants. *J. Pediatr.* 2010;156:490-1.
70. Schmidt B, Anderson PJ, Doyle LW. Survival Without disability to age 5 years after neonatal caffeine therapy for apnea of prematurity. *JAMA* 2012;307:275-82



71. McCarthy KD, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980;85:890-902.
72. Cole R, De Vellis J. A dissection and tissue culture manual of the nervous system. In: Shahar A, de Vellis J, Vernadakis A, Haber B, eds. A dissection and tissue culture manual of the nervous system. 1st ed. New York: Wiley-Liss 1989:121-33.
73. Silva RF, Rodrigues CM, Brites D. Rat cultured neuronal and glial cells respond differently to toxicity of unconjugated bilirubin. *Pediatr Res* 2002;51:535-41.
74. Gultekin F, Patat S, Akca H, Akdogan M, Altuntas I. Melatonin can suppress the cytotoxic effects of chlorpyrifos on human HepG2 cell lines. *Hum Exp Toxicol* 2006;25:47-55.
75. Maisels MJ, McDonagh AF. Phototherapy for neonatal jaundice. *N Engl J Med* 2008;358:920-8.
76. Schwarz HP, Haberman BE, Ruddy RM. Hyperbilirubinemia. Current guidelines and emerging therapies. *Pediatr Emer Care* 2011;27:884-9.
77. Hameed NN, Na'Ma AM, Vilms R, Bhutani VK. Severe neonatal hyperbilirubinemia and adverse short-term consequences in Baghdad, Iraq. *Neonatology* 2011;100(1):57-63.
78. Johnson L, Bhutani VK. The clinical syndrome of bilirubin-induced neurologic dysfunction. *Semin Perinatol* 2011;35:101-13.
79. Arun Babu T, Bhat BV, Joseph NM. Association between peak serum bilirubin and neurodevelopmental outcomes in term babies with hyperbilirubinemia. *Indian J Pediatr* 2012;79:202-6
80. Genc S, Genc K, Kumral A, Baskin H, Ozkan H. Bilirubin is cytotoxic to rat oligodendrocytes in vitro. *Brain Res* 2003;985:135-41.

81. Kumral A, Genc S, Genc K, Duman N, Tatli M, Sakizli M. Hyperbilirubinemic serum is cytotoxic and induces apoptosis in murine astrocytes. *Biol Neonate* 2005;87:99-104.
82. Dore S, Snyder SH. Neuroprotective action of bilirubin against oxidative stress in primary hippocampal cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1999;890(1):167-72.
83. Becerir C, Kılıç I, Sahin O, Ozdemir O, Tokgün O, Ozdemir B. The protective effect of docosahexaenoic acid on the bilirubin neurotoxicity. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2013;28:801-7.
84. Geiger AS, Rice AC, Shapiro SM. Minocycline blocks acute bilirubin-induced neurological dysfunction in jaundiced Gunn rats. *Neonatology* 2007;92:219-26.
85. Li CY, Shi HB, Ye HB, Song NY, Yin SK. Minocycline cannot protect neurons against bilirubin-induced hyperexcitation in the ventral cochlear nucleus. *Exp Neurol* 2012;237:96-102.
86. Yossuck P, Kraszpulski M, Salm AK. Perinatal corticosteroid effect on amygdala and hippocampus volume during brain development in the rat model. *Early Hum Dev* 2006;82:267-72
87. Nock ML. Tables of normal values. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. *Fanaroff and Martin's neonatal-perinatal medicine. Diseases of the fetus and infant*. 10 th ed. Philadelphia:Elsevier Mosby, 2015:1817-36
88. Aranda JV, Gormon W, Bergsteinsson H, Gunn T. Efficacy of caffeine in treatment of apnea in the low-birth-weight infant. *J Pediatr* 1977;90:467-72.
89. Brito MA, Vaz AR, Silva SL, Falcão AS, Fernandes A, Silva RF. N-methyl-aspartate receptor and neuronal nitric oxide synthase activation mediate bilirubin-induced

neurotoxicity. *Mol Med* 2010;16:372-80.

90. Marret S, Delpech B, Girard N, Leroy A, Maingonnat C, Menard JF. Caffeine decreases glial cell number and increases hyaluronan secretion in newborn rat brain cultures. *Pediatr Res* 1993;34:716-9.

91. Kang SH, Lee YA, Won SJ, Rhee K, Gwag BJ. Caffeine- induced neuronal death in neonatal rat brain and cortical cell cultures. *NeuroReport* 2002;13:1945-50.

92. Desfrere L, Olivier P, Schwendimann L, Verney C, Gressens P. Transient inhibition of astrocytogenesis in developing Mouse brain following postnatal caffeine exposure. *Pediatr Res* 2007;62:604-9.

93. Keskin F. Ratlarda bilirubin ile oluşturulan nörotoksisitede oksidatif stresin rolü ve L-karnitinin koruyucu etkisi (Tıpta Uzmanlık Tezi). Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2008.

94. Sies H. Oxidative stres: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82:291-5.

95. Aydoğdu N, Kanter M, Erbaş H, Kaymak K. Kadmiyuma bağlı karaciğer hasarında taurin, melatonin ve asetilsisteinin nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidanlar üzerindeki etkileri. *EMJ* 2007;29:89-96.

96. Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin Chim Acta* 2000;295:141-54.

97. Mukhopadhyay S, Mondal A, Poddar MK. Chronic administration of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Indian J Exp Biol* 2003;41(4):283-9.

98. Sun L, Tian X, Gou L, Ling X, Wang L, Feng Y, Liu Y. Beneficial synergistic effects of concurrent treatment with theanine and caffeine against cerebral ischemia-reperfusion injury

in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2013;91(7):562-9.

99. Devasagayam TP, Kamat JP, Mohan H, Kesavan PC. Caffeine as an antioxidant; inhibition of lipid peroxidation induced by ROS. *Biochim Biophys Acta* 1996;1282(1):63–70.

100. Abreu RV, Silva-Oliveira EM, Moraes MFD, Pereira GS, Moraes-Santos T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;99(4):659-64.

101. Valdez RC, Ahlawat R, Wills-Karp M, Nathan A, Ezell T, Gauda EB. Correlation between serum caffeine levels and changes in cytokine profile in a cohort of preterm infants *J Pediatr* 2011;158(1):57-64.

102. Vaz AR, Silva SL, Barateiro A, Fernandes A, Falcão AS, Brito MA. Pro-inflammatory cytokines intensify the activation of NO/NOS, JNK1/2 and caspase cascades in immature neurons exposed to elevated levels of unconjugated bilirubin. *Exp Neurol* 2011;229:381-90.

103. Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke* 2008;39:1314-20.

104. Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:947-56.

105. Liu Y, Jiang P, Du M, Chen K, Chen A, Wang Y. Hyperoxia-induced immature brain injury through the TLR4 signaling pathway in newborn mice. *Brain res* 2015;1610:51-60.

106. Hackam DJ, Good M, Sodhi CP. Mechanisms of gut barrier failure in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors throw the switch. *Semin pediatr surg* 2013;22(2):76-82.

107. Bowman CC, Rasley A, Susanne L, Tranguch, Marriott I. Cultured astrocytes Express

Toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 2003;43:281-91.