

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

**YENİDOĞAN RATLARDA OLUŞTURULAN ASTROSİT
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE BİLİRÜBİN NÖROTOKSİSİTESİNE
REKOMBİNANT ERİTROPOETİNİN ETKİSİ**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ
DR. KAZIM KÜÇÜKTAŞCI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HACER ERGİN**

DENİZLİ-2014

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

**YENİDOĞAN RATLARDA OLUŞTURULAN ASTROSİT
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE BİLİRÜBİN NÖROTOKSİSİTESİNE
REKOMBİNANT ERİTROPOETİNİN ETKİSİ**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ
DR. KAZIM KÜÇÜKTAŞCI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HACER ERGİN**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 26.11.2012 tarih ve 08 sayılı kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2014

Prof. Dr. Hacer Ergin danışmanlığında Dr. Kazım Küçüktaşçı tarafından yapılan “Yenidoğan Ratlarda Oluşturulan Astrosit Hücre Kültüründe Bilirubin Nörotoksitesine Rekombinant Eritropoetinin Etkisi” başlıklı tez çalışması 02.01.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Neonatoloji Bilim Dalı’nda YAN DAL UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN : Prof. Dr. Aziz POLAT



ÜYE : Prof. Dr. Hacer ERGİN



ÜYE : Doç. Dr. Özmert MA ÖZDEMİR



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

02 / 01 / 2014

Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı



TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Neonatoloji Bilim Dalı'nda geçen yan dal uzmanlık eğitimimde katkı ve emekleri geçen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Hacer Ergin, Doç. Dr. Özmert MA Özdemir, Prof. Dr. İlknur Kılıç, Prof. Dr. Aziz Polat, Prof. Dr. Dolunay Gürses, Doç. Dr. Selçuk Yüksel, Doç. Dr. Yasemin Işık Balcı, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Doğan'a,

Tez aşamasında her konuda desteğini ve yardımını benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Hakan Akça ve tezimin istatistiksel analizinde yardımcı olan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ahmet Ergin'e,

Tezimin her aşamasında yardımcı olan ve destekleyen Onur Tokgun'a,

Birlikte çalıştığım Uzm. Dr. Özlem Şahin'e, tüm asistan ve hemşire arkadaşlara,

Her zaman manevi desteklerini aldığım sevgili eşim Deniz Küçüktaşçı'ya, kızım Nehir Küçüktaşçı'ya ve sevgili annem Saniye Küçüktaşçı'ya, sevgili babam Muharrem Küçüktaşçı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Kazım Küçüktaşçı

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
ÖZET.....	XIII
İNGİLİZCE ÖZET.....	XV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
BİLİRÜBİN METABOLİZMASI.....	2
YENİDOĞANDA HİPERBİLİRÜBİNEMİ.....	5
Akut Bilirubin Ensefalopatisi.....	8
Kernikterus.....	8
BİLİRÜBİN NÖROTOKSİSİTESİNİN PATOGENEZİ.....	10
Eksitotoksisite.....	11
Mitokondri.....	12
Hücre İçi Kalsiyum Dengesi.....	12
Nöronal Apoptozis.....	12
İnflamasyon.....	13

Oksidatif stres.....	13
DENEYSEL TEDAVİ ÇALIŞMALARI.....	13
BİLİRÜBİN NÖROTOKSİSİTESİNİN	
DEĞERLENDİRİLMESİNDE HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	14
ERİTROPOETİN.....	15
GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA.....	51
SONUÇLAR.....	65
KAYNAKLAR.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

A₀:	Sıfırncı saatteki absorbans değeri
A₄₈:	48. saatteki absorbans değeri
ATP:	Adenozin trifosfat
BAER:	<i>Brainstem auditory evoked response</i>
BDG:	Bilirubin diglukronid
BDNF:	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BİND:	Bilirubinun indüklediği nörolojik disfonksiyon
BMG:	Bilirubin monoglukronid
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
BPD:	Bronkopulmoner displazi
cGMP:	Siklik guanozin monofosfat
CO:	Karbonmonoksit
CREB:	<i>Ca²⁺/cAMP-response element-binding</i>
DMEM/F12:	<i>Dulbecco's Eagle Medium/F12</i>
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EEG:	Elektroensefalografi
Epo:	Eritropoetin
ERK:	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FDA:	<i>Food and drug administration</i>
GPx:	Glutasyon peroksidaz
GSH:	Redükte glutasyon

GSSG:	Okside glutatyon
HBSS:	<i>Hanks Buffered Salt Solution</i>
HİE:	Hipoksik iskemik ensefalopati
HİF:	Hipoksik indüklenbilir faktör
IFN-γ:	İnterferon-gama
IL-1β:	İnterlökin-1 beta
IL-6:	İnterlökin 6
IL-18:	İnterlökin 18
JAK-2:	<i>Janus-tirozin kinaz-2</i>
JNK1/2:	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LDH:	Laktat dehidrojenaz
LPS:	Lipopolisakkarit
MAP:	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAPK:	<i>Mitogen-activated-protein-kinase</i>
MCP-1:	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDA:	Malondialdehit
MDR1:	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
MR:	Manyetik rezonans
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit
Mrp1:	<i>Multidrug resistance-associated protein 1</i>
NADP:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NEK:	Nekrotizan enterokolit

NF-κB:	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NMDA:	N-metil-D-aspartat
NO:	Nitrik oksit
NOS:	Nitrik oksit sentetaz
Pgp:	P-glikoprotein
PI(3)K:	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
rHuEpo:	Rekombinant insan eritropoetini
SLCO_{1B1}:	<i>Solute carrier organic anion transporter 1B1</i>
SOD:	Süperoksit dismutaz
SPSS:	<i>Statistical packages for social sciences</i>
SSS:	Santral sinir sistemi
STAT-5:	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TBARS:	<i>Thiobarbituric acid-reactive substance</i>
TC₅₀:	Hücrelerin %50' sine toksik konsantrasyon
TNF-α:	Tümör nekrozis faktör-alfa
TNFR-1:	Tümör nekrozis faktör reseptörü-1
TUNEL:	<i>Deoxynucleotidyl (TdT)-mediated dUTP nick end labeling</i>
UDPGT:	Üridildifosfat glukronil transferaz
UGT1A1:	Üridil difosfoglukronil transferaz 1A1

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Bilirubin metabolizması.....	4
Şekil 2 Hemden bilirubin oluşumu.....	5
Şekil 3 (A,B,C) Beyin dokusunun elde edilmesi ve mekanik olarak parçalanması...21	21
Şekil 4 (A,B) Faz kontrast mikroskobu primer nöron hücre kültürü.....	21
Şekil 5 (A,B) Faz kontrast mikroskobu primer astrosit hücre kültürü.....	22
Şekil 6 (A,B) 96 kuyucuklu plaklar ve kuyucuklu plaklardaki astrosit hücreleri.....	24
Şekil 7 Bilirubin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı.....	27
Şekil 8 Epo konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı.....	28
Şekil 9 Grupların 72. saatte hücre canlılığı.....	29
Şekil 10 Grupların 24. saatte apopitozis yüzdeleri.....	31
Şekil 11 TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Kontrol grubu (x40).....	32
Şekil 12 TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Bilirubin grubu (x40).....	32
Şekil 13 TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Epo grubu (x40).....	33
Şekil 14 TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Epo + bilirubin grubu (x40).....	33
Şekil 15 TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Bilirubin + Epo grubu (x40).....	34
Şekil 16 Grupların katalaz aktiviteleri.....	35
Şekil 17 Grupların glutasyon düzeyi.....	37
Şekil 18 Grupların GPx aktiviteleri.....	39
Şekil 19 Grupların SOD aktiviteleri.....	40

Şekil 20 Grupların total nitrat/nitrit düzeyleri.....	42
Şekil 21 Grupların IL-1 β düzeyleri.....	43
Şekil 22 Grupların IL-6 düzeyleri.....	45
Şekil 23 Grupların TNF- α düzeyleri.....	47
Şekil 24 Grupların LDH aktiviteleri.....	49
Şekil 25 Grupların MDA düzeyleri.....	50

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1 Grupların hücre canlılığındaki değişim yüzdeleri.....	29
Tablo 2 Astrosit hücrelerinde apoptozisin değerlendirilmesi.....	31
Tablo 3 Grupların katalaz aktiviteleri.....	35
Tablo 4 Grupların glutatyon düzeyleri.....	37
Tablo 5 Grupların GPx aktiviteleri	39
Tablo 6 Grupların SOD düzeyleri.....	40
Tablo 7 Grupların total nitrat/nitrit düzeyleri	41
Tablo 8 Grupların IL-1 β düzeyleri.....	43
Tablo 9 Grupların IL-6 düzeyleri.....	45
Tablo 10 Grupların TNF- α düzeyleri.....	47
Tablo 11 Grupların LDH aktiviteleri.....	49
Tablo 12 Grupların MDA düzeyleri.....	50

ÖZET

Yenidoğan ratlarda oluşturulan astrosit hücre kültüründe bilirubin nörotoksisitesine rekombinant eritropoetin etkisi

Dr. Kazım KÜÇÜKTAŞCI

Yenidoğanlarda halen önemli bir problem olan bilirubin nörotoksisitesinin hücresel ve moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Fizyolojik düzeylerde indirekt bilirubin oksidatif strese karşı koruyucu iken; orta-ağır hiperbilirubinemi oksidatif ve nitrozatif stres, lipid peroksidasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ve ekstraselüler glutamat birikimini tetikleyerek sinir hücresinde nekroz veya apoptozise, klinik olarak akut bilirubin ensefalopatisi veya kernikterusa yol açabilmektedir. Eritropoetin (Epo), antiapoptotik, antiinflamatuvar, antioksidan, antinitrozatif, anjiojenik ve nörotrofik mekanizmalarla nöronları sitotoksisiteden korumaktadır. Ancak hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisiteye Epo'nun etkisi henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada primer astrosit hücre kültürü oluşturulan yenidoğan ratlarda bilirubin nörotoksisitesine Epo'nun etkisi araştırıldı.

Çalışmamızda bir günlük Wistar albino ratlardan modifiye Cole ve De Vellis yöntemi ile elde edilen astrosit hücre kültürü kullanıldı. Astrosit hücrelerinin %50'sine toksik etkili olan indirekt bilirubin konsantrasyonu (TC₅₀) 50 µM, hücre canlılığını %100 arttıran Epo konsantrasyonu 2.5 IU/ml olarak saptandı. Bilirubin toksisitesine bağlı görülen apoptozis TUNEL boyama yöntemiyle değerlendirildi. İndirekt bilirubinden dört saat önce ve sonra Epo uygulanan astrosit hücre kültüründe 24 saat sonra apoptozis, katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesi, glutatyon, malondialdehid (MDA), total nitrat/nitrit, intelökin (IL)-1β, IL-6 ve TNF-α düzeyi, 72 saat sonra hücre canlılığı değerlendirildi. Bilirubin grubunda, apoptozis oranının kontrol grubundan 50 kat fazla arttığı; hücre canlılığının %75 azaldığı saptandı. Profilaktik ve tedavi edici Epo uygulaması, bilirubin indüklediği apoptozisi, total nitrat/nitrit, IL-6, TNF-α düzeyini azaltırken; hücre canlılığı, katalaz, GPx aktivitesi ve glutatyon, IL-1β düzeyini arttırdı. Profilaktik Epo, LDH aktivitesini arttırırken; tedavi edici Epo LDH

aktivitesini azalttı. Gruplar arasında SOD ve MDA düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık yoktu.

Bu çalışmada, ilk kez profilaktik ve tedavi edici olarak uygulanan Epo'nun, antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuvar ve antinitrozatif özellikleri ile bilirubin nörotoksitesine karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterildi.

Anahtar kelimeler: Bilirubin, eritropoetin, nörotoksite, yenidoğan

SUMMARY

The effect of recombinant erythropoietin on bilirubin neurotoxicity in astrocyte cell culture of neonatal rats

Dr. Kazım KÜÇÜKTAŞCI

Cellular and molecular mechanism of bilirubin neurotoxicity, which is still an important problem of newborns, is not exactly known. While indirect bilirubin in physiological level is against oxidative stress; moderate-severe hyperbilirubinemia can cause necrosis or apoptosis in neurons, and cause clinically acute bilirubin encephalopathy or kernicterus, by inducing oxidative stress, lipid peroxidation, proinflammatory cytokine releasing and extracellular glutamate deposition. Erythropoietin (Epo) can protect the neuron cells from cytotoxicity by antiapoptotic, anti-inflammatory, antioxidant, antinitrosative, angiogenic and neurotrophic mechanisms. However, the effect of Epo on neurotoxicity caused by hyperbilirubinemia has not been known yet. In this study, the effect of Epo on bilirubin neurotoxicity in newborn rats' primer astrocytes cell culture is investigated.

In our study, astrocyte cell cultures of one-day-old Wistar albino rats were used, which were obtained from modified Cole and De Vellis method. The indirect bilirubin concentration that has toxic effect on 50% of astrocyte cells (TC₅₀) was detected as 50 µM and Epo concentration that increase cell viability as 100% was found 2.5 IU/ml. Apoptosis due to bilirubin toxicity was evaluated by TUNEL staining technique. After and before four hours bilirubin incubation Epo treatment was administered. In astrocyte cell cultures, apoptosis, catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), lactate dehydrogenase (LDH) activities, glutathione, malondialdehyde (MDA), total nitrate/nitrite, interleukin (IL)-1β, IL-6 and TNF-α levels were investigated after 24 hours of bilirubin incubation and also cell viability after 72 hours was evaluated. In bilirubin group, it was detected that cell viability decreased in 75% and that apoptosis rate increased in fifty times more than the control group. Although prophylactic and therapeutic Epo application decreased apoptosis, total nitrate/nitrite, IL-6, and TNF-α levels induced by bilirubin, it increased cell viability, catalase and GPx activities, glutathione and

IL-1 β levels. While prophylactic Epo increased LDH activity; therapeutic Epo decreased it. There was not any significantly difference in between the groups in terms of SOD and MDA levels.

In this study, it was the first time shown that prophylactic and therapeutic Epo had protective effects on bilirubin neurotoxicity because of antiapoptotic, antioxidant, antiinflammatory and antinitrosative properties.

Key words: Bilirubin, erythropoietin, neurotoxicity, newborn

GİRİŞ

Yenidoğanların çoğunda yaşamın ilk bir haftasında görülen indirekt hiperbilirubinemi, fetal eritrositlerin yıkımının artması, karaciğere albumin taşınması ve konjugasyonda yetersizlik nedeniyle görülmektedir. Genellikle iyi seyirli olmasına rağmen, tedavi edilmeyen veya çok yüksek hiperbilirubinemisi olan yenidoğanlarda akut bilirubin ensefalopatisi veya kernikterus gelişebilmektedir (1). İndirekt bilirubin, fizyolojik veya hafif yüksek konsantrasyonlarda antioksidan etki gösterirken; orta-ağır konsantrasyonlarda santral sinir sistemi (SSS)'inde nöron hasarına yol açmaktadır (2). Bilirubinün nörotoksik etkisi, in vitro ve in vivo olarak yapılan birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir. Hücre membranı lipid akışkanlığında, protein yapısında, taşıyıcı sistemlerinde bozulma, fosfolipidlerinde asimetri kaybına bağlı permeabilite artışı ve sitokrom c salınımı, ekstraselüler glutamat artışı, mitokondriyal enerji yetersizliği, kalsiyum bağlayan proteinlerin ekspresyonunda anormallik, inflamatuvar sitokin ve nitrik oksit artışı ve oksidatif stres gibi mekanizmalar ile bilirubinün nörotoksik etkisi açıklanmaya çalışılmıştır (2-12).

Eritropoetin (Epo), eritropoetide rol alan hemapoetik bir hormon ve büyüme faktörüdür. Eritropoetin ve reseptörünün başka dokularda da gösterilmesinden sonra eritropoetiz dışında farklı etkilerinin olabileceği düşünülmüştür. Birçok çalışmada Epo'nun antiapoptotik, antiinflamatuvar, antioksidan, antinitrozatif, nörotrofik, anjiojenik ve antiepileptik özellikleriyle nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir (13,14). Son yıllarda klinik uygulamasına da geçilmiş olup; yan etki gözlenmemiştir.

Yenidoğanlarda indirekt hiperbilirubineminin önlenmesi ve tedavisi için ursodeoksikolik asit, L-karnitin, minosiklin, glukoursodeoksikolik asit, taurin, deksametazon, dokosaheksaenoik asit ve ginkgo biloba ile deneysel çalışmalar yapılmışsa da, hiçbiri klinik uygulamaya girmemiştir (15-24). Nöroprotektif etkileri bilinen Epo'nun hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksositeye etkisi ise araştırılmamıştır. Bu çalışmada, bilirubin nörotoksitesisi oluşturulan yenidoğan rat astrosit hücre kültüründe Epo'nun nöroprotektif etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

BİLİRÜBİN METABOLİZMASI

Bilirubin, hemoglobinin oksijen taşıyan komponenti olan hemin katabolizması sonucu oluşmaktadır. Bilirubinün %85'i eritrositlerin yıkımından, %15'i myoglobin, katalaz, peroksidaz, sitokrom, guanil siklaz ve nitrik oksit sentaz gibi hemoproteinlerin yıkımından ortaya çıkmaktadır. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve oksijen eşliğinde hem oksijenaz tarafından alfa-metan köprüsü kırılarak hem halkası açılmakta; sonuç olarak biliverdin ve karbonmonoksit (CO) oluşurken; demir açığa çıkmaktadır. Demir tekrar kullanıma girerken; CO akciğerlerden atılmakta, biliverdin, biliverdin redüktaz enzimi ile bilirubine dönüşmektedir (Şekil 1,2). Hemoglobinin 1 gramından 34 mg bilirubin ortaya çıkmaktadır (25).

Bilirubin, üç tek karbon köprüsüyle birbirine bağlanmış dört pirol halkasından oluşmaktadır. Bilirubin IX α olarak da adlandırılan bu moleküldeki IX terimi, protoporfirin IX kaynaklı olduğunu, α terimi ise kapalı protoporfirin halkasının α karbon köprüsünde açık olduğunu belirtmektedir. Ortadaki karbon köprüsü, orta iki pirol halkasına tek olarak bağlanırken, yanlardaki iki karbon köprüsü ise diğer iki pirol halkasına çift bağla bağlanmaktadır. Bu çift bağlarda iki farklı konfigürasyon olup; bunlardan birine Z, diğerine E denir. Ana molekül olan hemde, bu çift bağlar Z konumunda olduğu için bilirubin de 4Z, 15Z bilirubin IX α adını almaktadır. Bu molekülün üç boyutlu yapısında, bütün polar gruplar molekül içinde bulunduğundan hidrofobik ve lipofilik bir özellik kazanmaktadır. Membranlardan geçişi kolaylaştıran bu özellik, intrauterin dönemde plasenta yoluyla temizlenmeyi sağlarken; postnatal dönemde kan-beyin bariyerini kolayca geçebilmesine ve zararlı etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bilirubinün bu zararlı etkilerini azaltmanın bir yolu albumine bağlanmasıdır (26).

İndirekt bilirubin 0.01 mg/dl'den daha az çözünürlükle birlikte pH'ı 7.4 olan suda hemen hemen hiç çözünmez. Her bir erişkin albumini en az iki bilirubin bağlamaktadır. İlk molekül ikinciye göre daha sıkı bağlanmaktadır. Her bir gram albumin ortalama 7-8 mg/dl indirekt bilirubin bağlamaktadır. Fizyolojik olarak

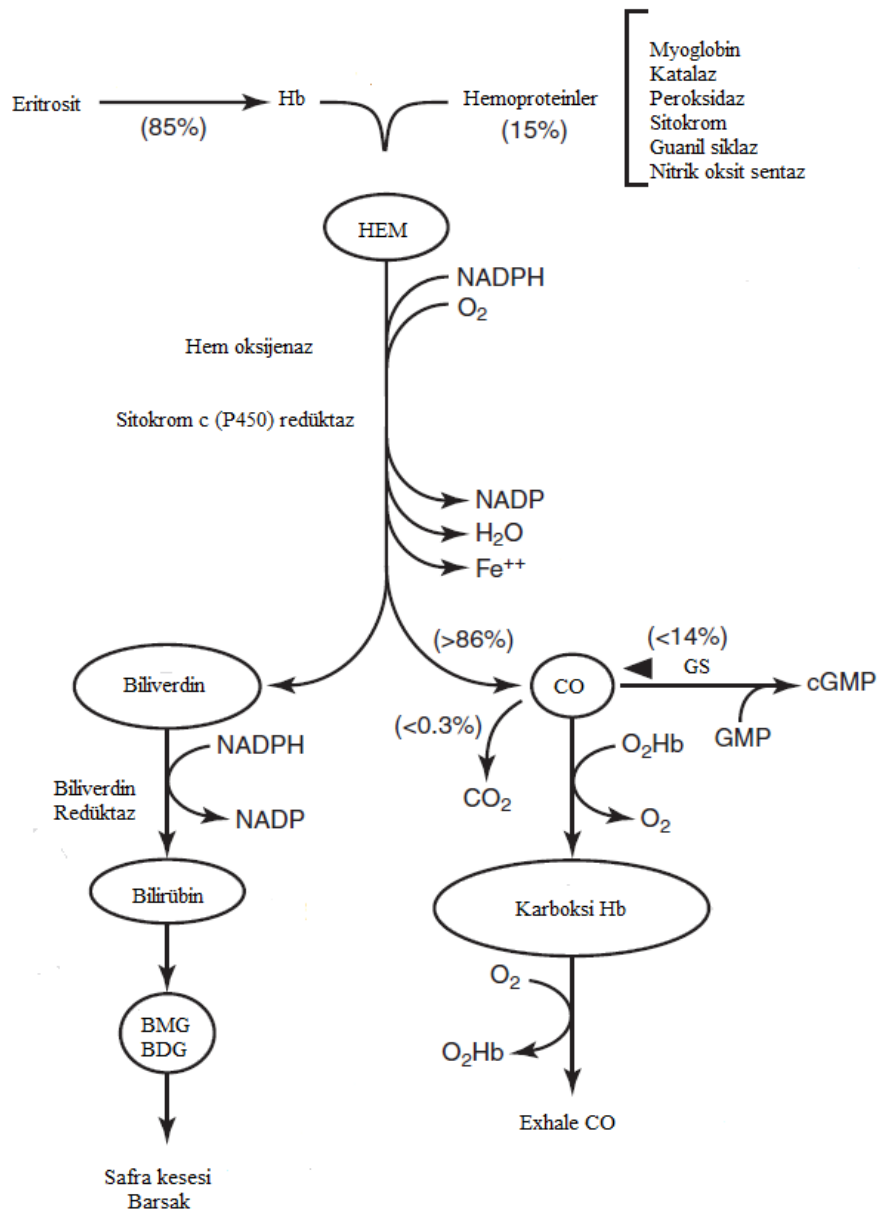
yenidoğanların plazması, erişkin veya büyük çocuklara göre bilirübini daha az bağlama kapasitesine sahiptir. Bu durum yenidoğan serum albumin konsantrasyonunun ve bağlama kapasitesinin düşük olmasından kaynaklanmaktadır (25).

Bu şekilde karaciğere taşınan bilirubin orada glukronik asit ile konjuge hale gelince suda çözünürlüğü artmakta ve membranlardan atılması kolaylaşmaktadır. Dolaşıma geçen bilirubinün büyük bir bölümü hızlı bir şekilde albumine bağlanmaktadır. Bilirubin serumda dört değişik halde bulunabilir:

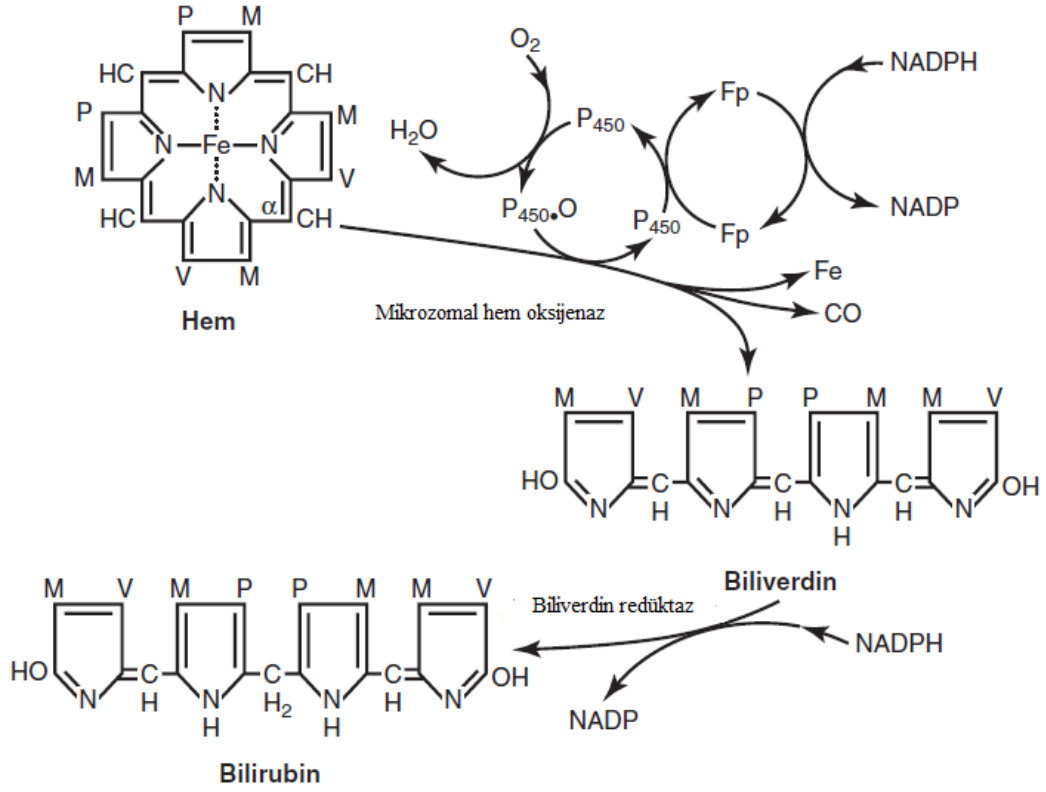
1. Albumine bağlı konjuge olmamış bilirubin
2. Albumine bağlanmamış serbest bilirubin
3. Konjuge bilirubin (safra ve böbrek yoluyla atılabilir)
4. Albumine kovalan bağlı konjuge bilirubin (delta bilirubin)

Bilirubin analizi sırasında delta bilirubin ölçülemez. Konjuge bilirubin direkt bilirubin olarak ölçülürken; albumine bağlı ve serbest olan konjuge olmamış bilirubinün tamamı indirekt bilirubin olarak ölçülür. Karaciğere gelen albumine bağlı bilirubin, karaciğer hücre yüzeyinde albuminden ayrılmakta ve membran reseptörlerine bağlanmaktadır. Hepatosit içine geçen bilirubin ligandin veya Y protein adı verilen intraselüler reseptöre bağlanarak düz endoplazmik retikuluma taşınır. Hepatosit içindeki bir diğer reseptör olan Z proteininin bilirubin afinitesi zayıftır. Yenidoğanlardaki ligandin düzeyi, erişkinlere nazaran düşüktür ancak bu düşüklüğün klinik önemi bilinmemektedir. Düz endoplazmik retikuluma gelen bilirubin, üridildifosfat glukronil transferaz (UDPGT) enzimi yardımıyla suda eriyen iki glukronil grubunun eklenmesi ile mono ve diglukronid şekline dönüşür. Yenidoğanlarda monoglukronid şekli daha fazla meydana gelir. Yenidoğanda UDPGT düzeyleri düşüktür, ancak doğumdan sonra ister prematüre olsun ister term olsun bütün bebeklerde enzimin aktivitesi hızlı bir şekilde artmakta ve 1-2 hafta içinde erişkin düzeye ulaşmaktadır. Glukronidle konjugasyon, bilirubin atılımının %90'ını oluşturur. Kalan bilirubin ise glukoz, ksiloz, taurin gibi başka maddelerle konjuge olarak veya oksidasyon, hidrosilasyon veya redüksiyon reaksiyonlarına girerek suda erir hale gelmekte ve atılmaktadır. Konjuge bilirubin kanaliküler membrandan bir taşıyıcı yardımı ile safra içine atılmaktadır. Enerji gerektiren bu

işlem sonunda safra kanalındaki bilirubin konsantrasyonu, hepatosit içindekinin 100 katına kadar ulaşmaktadır. Bağırsağa geçen konjuge bilirubin tekrar emilmez ancak konjuge olmamış bilirubin safra tuzları, fosfolipidler, kolesterol, tiroksin ve diğer bazı maddeler ile birlikte enterohepatik dolaşıma girmektedir. Bilirubinün monoglukronid ve diglukronid formları stabil moleküller olmadığı için bağırsaktaki alkali ortamda non-enzimatik olarak, mukozaya yüzeyindeki α -glukronidaz ile de enzimatik olarak hemen konjuge olmamış bilirubin haline dönüşmekte ve yaklaşık %25'i duodenum ve kolondan emilerek karaciğere geri dönmektedir (26).



Şekil 1. Bilirubin metabolizması (25 No'lu kaynaktan alınmıştır).



Şekil 2. Hemden bilirubin oluşumu (25 No'lu kaynaktan alınmıştır).

Yaşamın birinci günü bilirubin üretimi erişkinlere göre 2-3 kat daha fazla olup; ortalama 8-10 mg/kg/gün'dür. Bilirubin üretimi postnatal ilk iki günde hızlıca azalmaya başlamaktadır. Yenidoğanlarda bilirubin üretiminin artışı birkaç mekanizmayla açıklanabilir. Eritrosit ömrü erişkinlere göre daha kısadır (70-90 gün). Oldukça büyük olan hemopoetik havuzdan salınan hem miktarı ve sitokrom çevrimi artmıştır. Barsaktan bilirubin emiliminin artması da katkı sağlamaktadır (25).

YENİDOĞANDA HİPERBİLİRÜBINEMİ

Sarılık, yenidoğanlarda en sık karşılaşılan sorunlardan birisidir. Epidemiyolojik çalışmalar, term bebeklerin yaklaşık %60'ında, pretermilerin %80'inde yaşamın ilk haftasında klinik olarak sarılık geliştiğini göstermiştir (27).

Total bilirubin düzeyi 5-6 mg/dl'ye ulaşana kadar yenidoğanın cildinde sarılık görülmemektedir. Büyük çocuk ve erişkinlerde ise total bilirubin 2 mg/dl'ye ulaştığında cilt ve sklerada sarılık görülmektedir. Yenidoğan sarılıkları, bilirubininin cinsine göre indirekt hiperbilirubinemi (konjuge olmamış bilirubin) ve direkt

hiperbilirubinemi (konjuge olmuş bilirubin) olarak ikiye ayrılır. Yenidoğanda en sık görülen tip indirekt hiperbilirubinemidir. İnsanlarda unkonjuge hiperbilirubinemi, yaş ne olursa olsun indirekt bilirubin ≥ 2 mg/dl olması olarak tanımlanmaktadır. Konjuge hiperbilirubinemi ise direkt bilirubin >1.5 mg/dl olması veya total bilirubin $\%10$ 'undan fazlasını oluşturmasıdır (25).

Yenidoğanlarda indirekt hiperbilirubinemi nedenleri (28):

A. Hepatik bilirubin yükünün artması

1. Hemolitik hastalık-eritrosit membran defektleri
 - a. Herediter sferositoz
 - b. Eliptositozis
 - c. Stomatositozis
 - d. Piknositozis
2. Hemolitik hastalık-eritrosit enzim bozuklukları
 - a. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz eksikliği
 - b. Pirüvat kinaz eksikliği
3. Hemolitik hastalık-hemoglobinopati
 - a. Alfa talassemi
 - b. Gama talassemi
4. Hemolitik hastalık-immün aracılı (pozitif direkt coombs testi)
 - a. Rh izoimmünizasyonu
 - b. ABO uygunsuzluğu
 - c. Minör kan grubu uygunsuzluğu
5. Enterohepatik bilirubin sirkülasyonunun artması
 - a. İntestinal obstruksiyon, pilor stenozu
 - b. İleus, mekonyum tıkaçı, kistik fibrozis
 - c. Anne sütü ile beslenme
6. Ekstravasküler kan (örn. Sefal hematom)
7. Polistemi

B. Hepatik bilirubin klirensinin azalması

1. Prematürite
2. Hormon eksikliği

- a. Hipotiroidizm
- b. Hipopitüitarizm
3. Hepatik bilirubin alımının bozulması
 - a. Patent duktus venozus
 - b. SLCO₁B₁ gen polimorfizmi
4. Bilirubin konjugasyon bozuklukları-UGT1A1 gen varyantları
 - a. Crigler-Najjar sendromu tip 1
 - b. Crigler-Najjar sendromu tip 2 (Arias hastalığı)
 - c. Gilbert sendromu
5. Artmış enterohepatik sirkülasyon
 - a. İntestinal obstruksiyon, pilor stenozu
 - b. İleus, mekonyum tıkaçı, kistik fibrozis
 - c. Anne sütü ile beslenme

Bilirubin, membran lipidlerine kolayca bağlanabilen antioksidan bir maddedir. Membran peroksidasyonunu önleyerek zararlı etkilerden koruyabilme kapasitesine sahiptir. Ancak yüksek düzeylerdeki indirekt bilirubin nöronal fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Düşük düzeylerde hücreler için yararlı bir madde iken; yüksek miktarlarda ağır nöronal hasara neden olabilmektedir. Bu nedenle yenidoğanlar için uygun ve güvenilir bilirubin düzeyi bilinmemektedir (25).

Anlamli bilirubin yüksekliği görülen yenidoğanlarda indirekt bilirubinün nöronlara penetre olması nedeniyle nöronal fonksiyon bozukluğu ve ölüm görülebilmektedir. Bilirubinün indüklediği nöronal disfonksiyon (BİND)'in akut şekli, akut bilirubin ensefalopatisi olarak tanımlanmaktadır. Akut bilirubin ensefalopatisinin sonucunda ortaya çıkan kernikterus, BİND'in kronik şekli olarak tanımlanmıştır (25). Bilirubin toksisitesine daha duyarlı olan beyin bölgeleri serebellum (özellikle purkinje hücreleri), derin serebellar nukleus, dördüncü ventrikülün tabanındaki nukleus, bazal ganglion, hipokampus ve kranial sinir nukleusu (özellikle kohlear nukleus)'dur (29).

Akut Bilirubin Ensefalopatisi

Bilirubin toksisitesi başlangıçta geçici ve geri dönüşlü olup; total bilirubin artışıyla birlikte letarji, orta indirekt hiperbilirubinemili (10-20 mg/dl) yenidoğanlarda *brainstem auditory evoked response* (BAER) testinde dalga değişiklikleri görülmektedir. Bu değişiklikler bilirubindeki spontan azalma veya exchange transfüzyonla düzelmektedir. Anormal BAER testi sekizinci kraniyal sinir hasarının göstergesidir. BİND'in erken dönemlerinde manyetik rezonans (MR)'de sinyal değişiklikleri görülebilmektedir. Sonuç olarak anormal BAER testi, normal otoakustik emisyon testi, MR'de hipokampüsün medial lobu ve globus pallidusta fokal değişikliklerin gözlenmesi akut bilirubin ensefalopatisi lehine değerlendirilmektedir (25).

Kernikterus

Akut bilirubin ensefalopatisi erken dönemde saptanamazsa veya tedavi edilmezse, kalıcı nörolojik bozukluğa gidış gözlenir. Kernikterus terimi beyinde bilirubin toksisitesinin patolojik bulguları olarak tanımlanmıştır. Yaşayan hastaların bazal ganglion, hipokampal korteks, subtalamik çekirdek ve serebellumdaki nöronlarda nekroz ve sarıya boyanma görülmüş; serebral korteks genellikle korunmuştur. Kernikteruslu bebeklerin yaklaşık yarısında otopsi sonucunda bilirubin toksisitesinin ektranöral lezyonları (renal tübül, intestinal mukoza ve pankreas hücrelerinde nekroz, gastrointestinal kanama) gözlenmiştir.

Kernikterus aynı zamanda ensefalopati kliniğinin kötüleşmesi olarak da tanımlanmıştır. Term yenidoğanlarda kernikterus üç fazda görülmektedir. Birinci fazda zayıf emme, hipotoni ve duyu azalma belirtileri vardır. İkinci fazda ise ateş, retrokolik, hipertoni ve opistotonus gözlenir. Üçüncü fazda tiz sesle ağlama, işitme ve görme bozuklukları, zayıf beslenme, konvülsiyon ve atetoz görülmektedir. Kernikterusun uzun dönemdeki klasik belirtileri koreatetoid serebral palsy, yukarı bakış paralizisi, sensörinöral işitme kaybı ve dental displazidir. Zeka genellikle korunmaktadır.

Preterm bebeklerde ise kernikterusun spesifik belirtileri gözlenmez. Term bebeklere göre daha düşük düzeylerde bilirubin beyin dokusuna girebilmektedir.

Pretermelerde SSS'nin bilirubin ile boyanması açık olarak kernikterusu göstermez. Kernikteruslu term yenidoğanların yaklaşık %50'sinde mortalite görülürken, preterm bebeklerde bu oran daha yüksektir.

Beyin dokusuna bilirubinün geçiş mekanizmaları

1. Bilirubin üretiminin normal kapasitenin üzerinde olması
2. Albumin ve diğer proteinlerin bilirubin bağlama kapasitesindeki değişiklikler
3. Kan-beyin bariyerinin bozulmasına sekonder bilirubine SSS'nin geçirgenliğinin artması

Hasta term ve preterm bebeklerde serum albumin düzeyi ve albuminin bilirubini bağlama kapasitesi düşük olduğundan; bu bebeklerde sağlıklı term bebeklere göre daha düşük bilirubin düzeylerinde kernikterus görülme riski daha yüksektir. pH, 7.4'ün altına düştüğü zaman albuminin bilirubini bağlama kapasitesi azalmaktadır. Asidozun artmasıyla bilirubinün çözünürlüğü azalmaktadır. Sepsis ve hipoksemide artan serbest yağ asitleri, intravenöz olarak verilen lipidler, sulfisoksazol, indometazin ve salisilatlar albumine bağlanmak için bilirubin ile yarışmakta ve serumdaki serbest/bağlı bilirubin oranı artmaktadır. Hızlı verilen ampisilin, medikasyonlarda koruyucu amaçlı bulunan benzil alkol de bilirubinün albumine bağlanmasını inhibe etmektedir. Hipertonik serum, menenjit ve hipoksemide SSS'nin bilirubine geçirgenliği artarken; kan-beyin bariyerinde bulunan fosforile glikoprotein SSS'ye bilirubinün geçişini sınırlandırdığı gösterilmiştir (25).

Hiperbilirubinemik yenidoğanların bakımında son yıllardaki gelişmelere rağmen bilirubin toksisitesi, halen önemli bir problem olarak devam etmektedir. Geniş çaplı yapılan çalışmalarda, tedavi uygulanmayan düşük düzeyde hiperbilirubinemili term bebeklerin ileriki yaşlarında güç fark edilen kognitif ve motor nörolojik sekel geliştiği bildirilmiştir (30). Rh hemolitik hastalığı olan term bebeklerde maksimum serum bilirubin düzeyiyle kern ikterus arasındaki ilişki 1954 yılında Mollison ve Cutbush tarafından rapor edilmiştir. Bilirubin düzeyi 19-24 mg/dl, 25-29 mg/dl, 30-40 mg/dl olan hastalarda kern ikterus gelişme riski sırasıyla %8, %33 ve %73 olarak bulunmuştur (31). Orta derecede hiperbilirubinemili (13.7-

26 mg/dl) term yenidoğanların 12. aydaki değerlendirmelerinde minör nörolojik disfonksiyonların saptandığı bildirilmiştir (32). Bilirubin düzeyi 19 mg/dl'den yüksek olan bebeklerde otizm, dikkat eksikliği ve gelişim geriliği görülebileceği bildirilmiştir (33).

Nöronal hücre hasarı 660 nM gibi düşük bilirubin düzeylerinde görülmekte ve doz arttıkça hasar artmaktadır. Düşük bilirubin düzeylerinde nöronlarda apoptozis görülürken, orta-ağır düzeylerde nekroz gelişmektedir. Nöronal hasarın büyüklüğünde bilirubine maruziyet süresi de önemlidir (34). Rat astrositlerinde in vitro olarak yapılan bir çalışmada dört saat gibi kısa süreli bilirubin uygulamasının apoptozis ve nekroza yol açtığı gösterilmiştir (35). Serbest bilirubinün nörotoksosite için eşik düzeyi 71-770 nM olarak bulunmuştur (36).

BİLİRÜBİN NÖROTOKSİTESİNİN PATOGENEZİ

Bilirubin ATP bağımlı taşıyıcılar olan P-glikoprotein (Pgp) ve *multidrug resistance-associated protein 1* (Mrp1) aracılığıyla kan beyin bariyerini geçerek hücre içine girmektedir. Yaşamın erken döneminde bu iki proteinin düşük düzeyde eksprese olması SSS'ye bilirubin girişinin engellenmesinde kritik öneme sahiptir. Hücre içine giren bilirubin glutasyon dengesini bozmakta, endotelial nitrik oksit sentetaz (NOS) ekspresyonunu arttırarak nitrit üretimine ve sitokin salınımına neden olmaktadır. Oksidatif stres ile Mrp1, astrositlerden okside glutasyonun salınımına aracılık etmektedir (1).

Bilirubine bağlı nöron hasarının patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Hasar öncelikle membran kaynaklı olup; nörotoksosite kaskatı plazma, mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarından başlamaktadır. Membranlardan hücre içine hızlıca difüze olan bilirubin, membran polaritesi ve akışkanlığını arttırarak nöron membran yapısını bozmaktadır. Benzer etkiler astrosit ve eritrosit membranında da görülmektedir. Membran akışkanlığındaki artış sonucunda fosfatidilserin hücre dışına çıkarken; bu durum fagositik tanınmaya izin vermektedir. Bilirubin maruziyeti sonucunda MgATPaz ve Na-K ATPaz aktiviteleri azalmakta; hücre içi kalsiyum düzeyi artmaktadır. Bununla birlikte bilirubin kalsiyum kanallarının açılmasını da indüklemektedir. Tüm bu olayların sonucunda hücre parçalanmakta; eritrositler de

hemolize olmaktadır. Bilirübin maruziyetine bağlı görülen *Ca²⁺/cAMP-response element-binding* (CREB) fosforilasyonu, nöronal NOS'un indüklenmesi ve nitrik oksit (NO) üretimi nörondaki kalsiyum artışına bağlıdır. *Extracellular signal regulated kinase* (ERK1/2) ve *Jun N-terminal kinase* (JNK1/2) fosforilasyonu, NOS/NO yolu aracılığıyla olmaktadır (34).

Nörotoksistide en önemli üç mekanizma nöronal eksitotoksiste (glutamatın aşırı salınımı ve geri alımının bozulması), mitokondriyal enerji yetersizliği ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasıdır. Hücre içi kalsiyum artışı proteolitik enzim salınımını, apoptozis ve nekroz gelişimini tetiklemektedir (34).

Eksitotoksiste

Bu konudaki çalışmalar glutamat ve N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörü üzerine odaklanmıştır. McDonald ve arkadaşları (6), hiperbilirübinemik ratlarda NMDA tip glutamat kanallarının MK-801 ile bloke edilmesiyle bilirübin toksisitesinin histolojik bulgularının azaldığını göstermişlerdir. İn vitro yapılan bir başka deneysel çalışmada, 250-5000 nM dozda uygulanan bilirübinin nöron canlılığını azalttığı ve NMDA reseptör antagonisti olan MK-801'in bu etkiyi engellediği bildirilmiştir (7). İndirekt bilirübin, nöronlara glutamat alımını bozmakta; ayrıca SSS'nin bilirübine duyarlı bölgelerinde glutamat reseptör ekspresyonunu arttırmaktadır (34).

NMDA kanallarının açılması eksitotoksik hasarın karakteristik olaylarını başlatmaktadır. Öncelikle, glutamat reseptörünün aktive olmasıyla hücre içi sodyum ve klor düzeyi artmakta ve hücre şişmektedir. Hücreye kalsiyum girmesiyle kalsiyuma bağlı enzimler aktive olmakta ve bunun sonucunda hücre ölümüne yol açan apoptozis ve nekroz gelişmektedir. Hiperbilirübinemi ile eksitotoksistenin nasıl geliştiği tam olarak bilinmemektedir. İn vitro yapılan nöron kültüründe, hücre içi enerji düzeyinin azalmasının eksitotoksik nöron hasarının öncüsü olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca indirekt bilirübin, protein kinaz C'yi inhibe ederek glutamatın nörotoksik etkisine katkıda bulunmaktadır (34).

Ağır hiperbilirübinemili hastaların akut döneminde yaptırılan MR spektroskopide glutamat ve glutamin/kreatin oranının arttığı gösterilmiştir (37).

Mitokondri

Hiperbilirubinemik ratlarda yapılan çalışmalarda, fosfokreatin ve adenozin trifosfat (ATP) düzeylerinin azalmasıyla birlikte laktat/pirüvat oranının arttığı; buna sekonder mitokondriyal elektron zincir fonksiyon bozukluğunun görüldüğü bildirilmiştir. Bilirubin, mitokondri membranını direkt olarak etkileyerek lipid polaritesi, akışkanlığı ve proteini bozmaktadır. Sonuçta membran permeabilitesini ve mitokondriyal depolarizasyonu artmakta; parçalanmış mitokondriden sitokrom-c açığa çıkmaktadır. Kaspaz-3 aktivasyonu ve Bax translokasyonunun tetiklenmesi sonucunda apoptozis ile hücre ölümü gerçekleşmektedir (34).

Hücre İçi Kalsiyum Dengesi

Eksitotoksitenin tetiklenmesiyle hücre içine kalsiyum girişi artmakta; hücre içindeki depolardan kalsiyum salınmakta ve hücre içindeki kalsiyumun tamponlanma kapasitesi bozulmaktadır. Hücre içinde kalsiyumun artmasıyla proteaz, endonükleaz gibi enzimlerin aktive olması, serbest radikal yapımının artması sonucu apoptozis ve nekroz ile hücre ölümü gerçekleşmektedir (34).

Nöronal Apoptozis

Kernikterustaki ilk ve subakut nöropatolojik değişiklikler piknotik nükleus, nükleer dansitede artıştır. Bu dönemde inflamasyon yoktur ve bulgular apoptozis ile uyumludur. Birçok çalışmada bilirubine bağlı sitotoksitede apoptozisin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bilirubinin indüklediği bu programlı hücre ölümü kaspaza bağlı mitokondriyal yolak aracılığıyla gerçekleşmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, hücre yüzeyinden nükleusa sinyal iletimini sağlayan *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*'nin bilirubine bağlı nöronal hücre ölümüyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. ATP bağımlı taşıyıcılar olan Mrp1 ve *multidrug resistance protein 1 (MDR1; P-glikoprotein)* apoptoziste önemli rol oynamaktadır. Glutasyon-S-transferaz, hücre içi sinyal iletimini düzenleyerek ve bilirubinin hücre içine alımını sağlayarak apoptozise yol açmaktadır (34).

İnflamasyon

Beynin dengesi bozulduğunda astrositlerin aktive olmasıyla nitrik oksit, nöropeptid ve sitokinler üretilmektedir. Sitokinler beyin hasarına verilen hücrel cevapta anahtar rol oynamaktadır. Sitokin üretimi ilk 24 saatte en fazla olup; inflamasyondan sonraki ilk 3-6 saatte pik yapmakta; yapım 24 saatten sonra da devam etmektedir. Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve interlökin-1 β (IL-1 β) ilk salgılanan sitokinlerdir. Bu sitokinler oteregülatuar feedback etki ile anti-inflamatuar sitokinlerin sentezini uyarmaktadır (2).

Çalışmalarda indirekt bilirübünün nöron, astrosit ve mikroglialardan TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırdığı, interlökin-6 (IL-6) gibi antiinflamatuvar sitokinlerin salınımını baskıladığı gösterilmiştir. TNF- α reseptör 1 (TNFR1), MAPK, ERK1/2 aracılığıyla, *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B)'nin aktivasyonu ve lipopolisakkaritin varlığı ile bu etkilerin potansiyelize edildiği düşünülmektedir (34,38).

Oksidatif Stres

Redox sisteminin bozulmasıyla lipid peroksidasyonunda ve reaktif oksijen radikallerinin üretiminde artış görülmektedir. Bilirübine bağlı beyin hasarında oksidatif stresin önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bilirübünün serbest radikal oluşumunu, protein oksidasyonunu ve lipid peroksidasyonunu arttırarak sinaptosomal membran sisteminde oksidatif strese yol açtığı gösterilmiştir. Bu olaylar redükte glutatyon (GSH)/okside glutatyon (GSSG) oranının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (3). Bir başka çalışmada, bilirübine bağlı nöronal hasarda nitrit, nitrik oksit üretiminin ve nöronal nitrik oksit sentaz ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (11).

DENEYSEL TEDAVİ ÇALIŞMALARI

Literatürde bilirübine bağlı nörotoksisiteyi önlemek amaçlı uygulanan birkaç ilaç bulunmaktadır. Ratlarda oluşturulan primer astrosit ve nöron hücre kültüründe bilirübine bağlı apoptozisin ursodeoksikolik asit tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir (15). L-karnitin glutamat ve NMDA reseptörünü inhibe ederek, kalsiyum

akışını önleyerek ve antioksidan etkisiyle bilirübine bağlı nöronal hücre ölümüne karşı koruyucu etkinlikte olduğu gösterilmiştir (16). Bu konuda denenen diğer ilaç minosiklidir. Ancak minosiklinin nörotoksisiteye etkisine dair sonuçlar çelişkilidir (17-18). Glukoursodeoksikolik asitin antioksidan etkiyle bilirübine bağlı nöronal hasarı önlediği gösterilmiştir (19). Taurinin hücre içi kalsiyum düzeyini azaltarak nöronal apoptozisi engellediği ve yenidoğan sarılığında nöronal hasarı önleyebileceği veya tedavi edebileceği düşünülmüştür (20). Yenidoğan domuzlarda yapılan bir çalışmada, bilirübine bağlı görülen işitsel nörotoksisitenin tedavisinde taurinin kullanılabilirliği bildirilmiştir (21). Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, deksametazonun, bilirübünün indüklediği sitokin salınımını inhibe ederek nörotoksisiteye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (22,23).

BİLİRÜBİN NÖROTOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE HÜCRE KÜLTÜRÜ

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. Hücre kültürlerinde toksik maddelere bağlı gelişen sitotoksisite, apoptozis ve nekroz değerlendirilebilmektedir. Nekrozun değerlendirilmesinde hücre içi enzim olan laktat dehidrojenaz (LDH) kullanılmaktadır (39).

İndirekt bilirübünün nöral hücrelere toksik etkisi hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Astrositlere göre glutasyon düzeyi daha düşük olduğundan; nöronlar bilirübünün toksik etkisine daha duyarlıdır. Bilirübin maruziyetinde nöronlarda astrositlere kıyasla reaktif oksijen türleri, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu daha fazla olmaktadır. Nöronlarda hasar daha çok geri dönüşümsüzken, astrositlerdeki hasar geçici veya geri dönüşlüdür. Nöronlara göre hücre ölümüne daha az duyarlı olması nedeniyle bilirübin ensefalopatisinin patogenezinin anlaşılmasında astrositler daha önemli gibi görünmektedir (1,40).

ERİTROPOETİN

Fransız bilim adamları Carnot ve DeFlandre, ilk kez 1906 yılında eritrositlerin üretimini düzenleyen ve “hemopoetin” adını verdikleri humoral faktörden bahsetmişlerdir. Hjort, 1936 yılında kanaması olan anemik tavşanlardan aldığı serumu normal tavşana verdiğinde retikülositozun uyarıldığını göstermiştir. Reissmann, 1950 yılında düşük oksijenli ortamda ve normal havada soluyan her iki rat grubunda retikülositozun geliştiğini, hemoglobinin arttığını ve kemik iliği hiperplazisinin oluştuğunu göstermiştir. Bu çalışmalar Epo'nun araştırılmasına merak uyandırmış; Epo'nun primer üretim yerinin böbrek olduğu bulunmuştur (41). İlerleyen dönemde Epo'nun fetusta primer, erişkinde ise sekonder üretim yerinin karaciğer olduğu anlaşılmıştır (42). Koury (43), 1988 yılında Epo'nun böbrekte peritübüler interstisyel hücrelerde üretildiğini göstermiştir. Miyake ve arkadaşları (44), 1977 yılında aplastik anemili hastaların idrarından insan Epo'sunu elde etmişlerdir. Lin ve Jacobs (45,46), 1985 yılında Epo genini klonlayıp, rekombinant Epo'yu ilk olarak anemili hastalarda uygulamışlardır. Eschbach ve arkadaşları (47), 1987 yılında son dönem böbrek hastalığı olan hastalarda görülen aneminin tedavisinde rekombinant insan eritropoetini (rHuEpo) uygulamışlardır. rHuEpo, 1989 yılında kronik böbrek yetmezlikli hastalarda insanlarda kullanımı için FDA (Food and Drug Administration) onayı almıştır.

Epo, esas olarak eritroid öncü hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını uyararak ve apoptozisi inhibe ederek eritropoezde rol alan, 30.4 kDa ağırlığında glikoprotein yapıda bir hormondur. Epo'yu kodlayan gen yedinci kromozom üzerinde yer almakta ve 3000 baz çifti içermektedir. Dört intron ve beş ekzonlu 193 amino asitli bir moleküldür. Salınımı sırasında 28 aminoasit ayrıldığından; matür protein 165 aminoasit içermektedir. Genin transkripsiyon hızı, oksijen bağımlı bir mekanizma ile kontrol edilmektedir. Sentezlendiği hücreden serbestleşirken glikolizasyonu eritropoetinin biyolojik aktivitesi için önemli olup; antijenitesini sağlamaktadır. İnsanda normal Epo serum konsantrasyonu 10-30mu/ml (1-7pmol/l), endojen üretim hızı 2-4 u/kg/gündür (48,49). Epo mesajcı ribonükleik asit (mRNA)'sı karaciğer, dalak, beyin, akciğer ve testiste saptanmıştır. Epo reseptörü, 484 aminoasitten oluşan 60 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. Beyin, retina, kalp,

karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek, düz kas hücresi, myoblast, damar endoteli, lenfoid doku, adrenal bez, barsak ve plasentada Epo reseptörü saptanmıştır (50). Epo'nun salınımı hipoksi, anemi ve oksijen duyarlılık yolları ile uyarılmaktadır. Hipoksi, Epo gen transkripsiyonunda artışa yol açmaktadır. Hipoksiyle indüklenen faktör (HIF) ve hepatik nükleer faktör-4, Epo'nun salınımı için spesifik uyaranlardır (51).

Uzun yıllar preterm bebeklerde, prematüre anemisinin önlenmesi ve tedavisinde rHuEpo güvenilir bir şekilde intravenöz veya subkutan formda kullanılmıştır. Prematüre bebeklere rHuEpo verilmesinden sonra 96 saat içinde retikülositoz görülmekte, hemoglobin 5-7 günde yükselmeye başlamaktadır. Subkutan kullanımı daha etkili olup; intravenöz kullanımı ile idrarla kaybedildiği gösterilmiştir (52). rHuEpo tedavisi ile hemoglobinin günler sonra yükseldiği için, erken flebotomi kayıplarına bağlı anemide transfüzyonları azaltmazken; daha geç dönemdeki transfüzyonları azalttığı, ancak engellemediği görülmüştür (53). Erken (<7 gün) ve geç rHuEpo tedavisini araştıran çalışmalar yapılmıştır. En son yapılan Cochrane analizinde erken rHuEpo tedavisinin, evresine bakılmaksızın prematüre retinopatisi riskini arttırdığı sonucuna varılmıştır. Halen ne erken ne de geç rHuEpo tedavisi önerilmemektedir (54).

Yıllarca Epo'nun yalnızca eritroid öncü hücrelerini etkilediğine inanılırken; son çalışmalarda Epo ve reseptörünün başka dokularda da gösterilmesinden sonra Epo'nun farklı etkilerinin olabileceği düşünülmüştür. Son yıllarda Epo'nun nöroprotektif etkisini gösteren birçok çalışma yapılmış, Alzheimer, kalp yetmezliği ve kalp transplantasyonunda denenmiştir. Epo'nun sinir sisteminde oksidatif, metabolik, nörotoksik ve eksitotoksik stresi azaltarak nöronal hasarı azalttığı hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (14,55). Epo asıl astrositlerde üretilirken; oligodentrosit, endotelyal hücre, nöron ve mikroglialarda da üretildiği gösterilmiştir. Beyinde üretim ve salınım yerleri hipokampus, internal kapsül, korteks ve orta beyindir. Epo üretimi özellikle hipoksi durumunda üst düzeye çıkmaktadır (13,55). Anemik stres, insülin salınımı, insülin benzeri büyüme faktörü, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 Epo ve reseptörünün ekspresyonunu arttırmaktadır (55).

Epo, reseptörüne bağlandığı zaman reseptör dimerizasyonuna, *Janus-tirozin-kinaz-2* (JAK-2)'nin otofosforilasyonuna ve JAK-2 reseptörünün aktivasyonuna neden olmaktadır. JAK-2 aktivasyonu MAPK, PI(3)K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) ve STAT-5 (*signal transducers and activators of transcription 5*)'in fosforilasyonuna yol açmaktadır. Bu yollar, Epo'nun nöroprotektif etkisinde kritik öneme sahiptir. Epo, ayrıca JAK-2 ve NF-κB arasındaki sinyal sistemi aracılığıyla kortikal nöronları eksitotoksiste ve NO'nun indüklediği apoptozisten korumaktadır. NF-κB, Akt-1 (*protein kinaz B*) aktivasyonu, Bad fosforilasyonu ve Bcl-xL upregülasyonu ile nöronlarda apoptotik etki göstermektedir. Akt-1 aktivasyonu, mitokondriyal membranı stabilize ederek ve sitokrom c salınımını önleyerek nöronların yaşamasını sağlamaktadır. Mitokondriden sitokrom c salındığı zaman hücre ölümüne sebep olan kaspazlar aktive olmaktadır. Bu da deoksiribonükleik asit (DNA) parçalanmasına ve membran fosfatidilserin kalıntılarının oluşmasına neden olmaktadır. Epo, Akt-1 aktivasyonunu artırarak DNA parçalanmasını ve nöronal membran fosfatidilserin maruziyetini önlemektedir (14).

Epo'nun nöroprotektif etkisindeki asıl mekanizma apoptozisi inhibe etmesidir. Ayrıca anti-inflamatuar, antioksidan, anjiyojenik, antiepileptik ve nörotrofik özelliğiyle de nöroprotektif etkiye sahiptir (13).

Epo'nun anti-apoptotik özelliğinin en çok araştırıldığı mekanizma, Bcl-2 gen ailesinin modülasyonudur. Epo, anti-apoptotik gen Bcl-xL'nin ekspresyonunu sürekli artırırken; pro-apoptotik gen Bax ve DP5'in ekspresyonunu azaltmakta ve Bcl:Bax oranını anti-apoptotik tarafa kaydırmaktadır (56). Epo'nun nöroprotektif etkisi için anti-apoptotik bir faktör olan NF-κB'nin aktivasyonu gereklidir. NF-κB, apoptozisi inhibe eden protein ailesinin ekspresyonunu uyararak, ayrıca Bcl-xL'yi direkt aktive ederek apoptozisi önlemektedir (13). Ayrıca Epo'nun hipokampal hücrelerde, spesifik reseptörü olan TrkB'yi aktive ederek BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) üretimini ve mRNA ekspresyonunu uyardığı yakın zamanda gösterilmiştir (57). Nöronlardaki BDNF ekspresyonu, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının ve kalsiyum duyarlı transkripsiyon faktör olan *CREB protein'in* aktivasyonunu indüklemektedir. Hücre içi kalsiyum artışı nöronlarda Epo'yu uyaran ilk olaylardan biri olup; nöroprotektif etki için kritik basamaktır. İntraselüler

kalsiyum artışı NFκB, PI(3)K/Akt, MAPK ve STAT-5 aktivasyonunu modüle etmektedir (14).

Birçok çalışmada Epo'nun anti-inflamatuar etkinliği gösterilmekle birlikte, bu etkinin gerçek mekanizması bilinmemektedir. Epo'nun endotel hücreler boyunca lökosit göçünü azaltabileceği ve iskemiye karşı endotel hücrelerin direncini arttırdığı düşünülmüştür (58). Otoimmün ensefalomyelit oluşturulan fare modelinde, Epo tedavisinin inflammatuar infiltrasyonu ve demyelinizasyonu azaltarak fonksiyonel nörolojik iyileşme sağladığı rapor edilmiştir (59). Epo'nun, inme modeli oluşturulan ratların iskemik beyinlerinde monosit kemoatraktant protein-1, TNF-α ve IL-6 düzeyini azalttığı gösterilmiştir (60). Oligodentrosit kültürü oluşturulan deneysel bir araştırmada, interferon gama (IFN-γ) ve lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen sitotoksositeye karşı Epo'nun koruyucu etkisinin olduğu belirtilmiştir (61).

Epo'nun nörotrofik etkisi aksonal büyüme, dentritik dallanma, elektriksel aktivitenin uyarılması ve hücre içi kalsiyum ve nörotransmitter sentez ve salınımının düzenlenmesinden ibarettir (62). Ayrıca Epo'nun plastisite, sinaptik bağlantı ve hafızayla ilişkili nöronal ağın aktivitesini düzenleyerek fonksiyonel sonuçları düzelttiği gösterilmiştir (63).

Epo'nun nöronlara direkt etkisinin yanında, yeni damar oluşumunu sağlayarak beyin perfüzyonunu düzelttiği ve nöroprotektif etkisini gösterdiği belirtilmiştir. Damarsal fonksiyona Epo'nun potansiyel rolü, hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Standart anjiyogenik bir incelemede ratların aortik halkasındaki mikrovasküler dallanmayı arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca Epo'nun endotel hücre kültüründe vasküler fonksiyon, sinyal iletimi ve enerji transferiyle ilişkili genlerin ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (64,65). Aynı zamanda Epo'nun beyinde de anjiyogenik etkisinin olduğu bulunmuştur. Epo'nun beyindeki kapiller endotel hücrelerde doz bağımlı mitojenik etkili olduğu gösterilmiştir (66). Epo endotel öncü hücrelerin çoğalmasını, matrix metalloproteinaz-2'nin üretimini, vasküler bölgeye endotel hücrelerin göçünü ve kapiller damarların oluşumunu uyarmaktadır (67).

Epo'nun antioksidan etkisi birkaç mekanizmayla görülmektedir. Epo, oksidatif strese sinyal iletim yollarında rol alan JAK2, protein kinaz B, NFκB gibi molekülleri kontrol altında tutmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi sitozolik antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırarak lipid peroksidasyonu inhibe etmektedir. Ayrıca Epo, NO'nun aracılık ettiği serbest radikalleri ve onların toksisitesini azaltmaktadır (68).

İn vivo ve in vitro çalışmalarda Epo'nun nörogenez etkisi gösterilmiştir. Hipoksi iskemiden sonra verilen Epo tedavisinin doku onarımı, revaskülarizasyon sağlayarak nörovasküler remodeling oluşturduğu ve nörodavranışsal sonuçları iyileştirdiği belirtilmiştir (69).

Yakın zamanda yapılan deneysel çalışmalarda Epo'nun anti-epileptojenik etkisinin olduğu ve konvülziyonun indüklediği nöral hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (70). Epo'nun ayrıca anormal elektroensefalografi (EEG) bulgularını da anlamlı olarak düzelttiği bulunmuştur (71).

Birçok mekanizmayla nöroprotektif etkinliği ortaya konmuş olan Epo'nun astrositlerde bilirubin nörotoksitesine etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmada, astrosit hücre kültürü oluşturulan yenidoğan ratlarda bilirubin nörotoksitesine Epo'nun etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 26.11.2012 tarih ve 08 sayı ile onayı alınan bu deneysel çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bir günlük ve ağırlıkları 5-8 gr olan yenidoğan Wistar-albino ratlardan elde edilen primer astrosit hücre kültürlerinde Haziran-Ekim 2013 tarihleri arasında yapıldı. Primer astrosit hücre kültürünün elde edilmesi için tek anneden doğan bir günlük 10 rat yavrusu 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, Epo grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 2.5 IU/ml Epo (*GenScript Cat No: Z02975-1, 860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA*) 24 saat süreyle uygulandı.

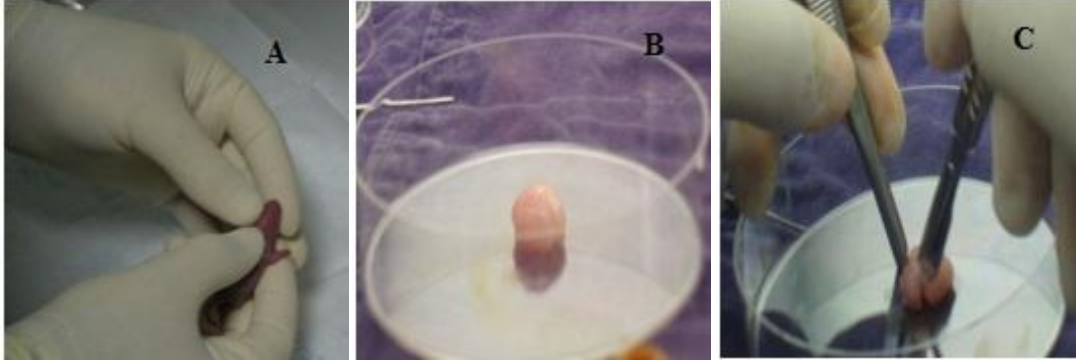
Grup IV, Epo + Bilirubin grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 2.5 IU/ml Epo eklendikten dört saat sonra 50 µM bilirubin ilave edilip 24 saat süreyle uygulandı.

Grup V, Bilirubin + Epo grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 50 µM bilirubin eklendikten dört saat sonra 2.5 IU/ml Epo ilave edilip 24 saat süreyle uygulandı.

Astrosit Hücre Kültürünün Hazırlanması

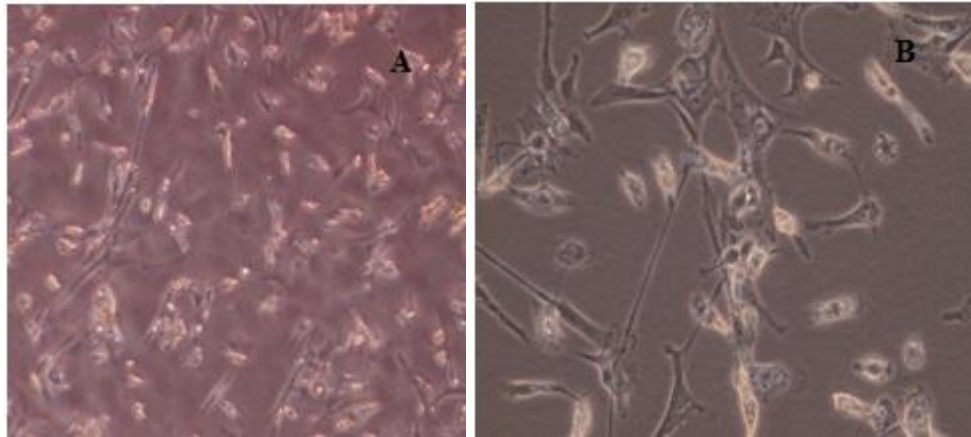
Astrosit primer hücre kültürü %95'in üzerinde saflıkta astrosit hücrelerinin elde edildiği kanıtlanmış olan McCarthy ve de Vellis yöntemlerinden modifiye edilerek hazırlanmış Cole de Vellis yöntemi ile literatürde tanımlandığı gibi hazırlandı (72,73). Steril koşullarda bir günlük rat yavrularına anestezik madde uygulanmadan servikal dislokasyon ile dekapitasyon işlemi yapıldı. 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 3), jöle kıvamına gelene kadar HBSS ile yıkandı. Trypsin 500 µl (Trypsin/EDTA, 100 ml, %0.05/%0.02, Biochrom, Berlin, Germany), DNaz-I 50 µl (DNase I recombinant, RNase-free, 10 U/µl, Roche, Mannheim, Germany) eklenip 37 °C'de %5 CO₂ 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 4).



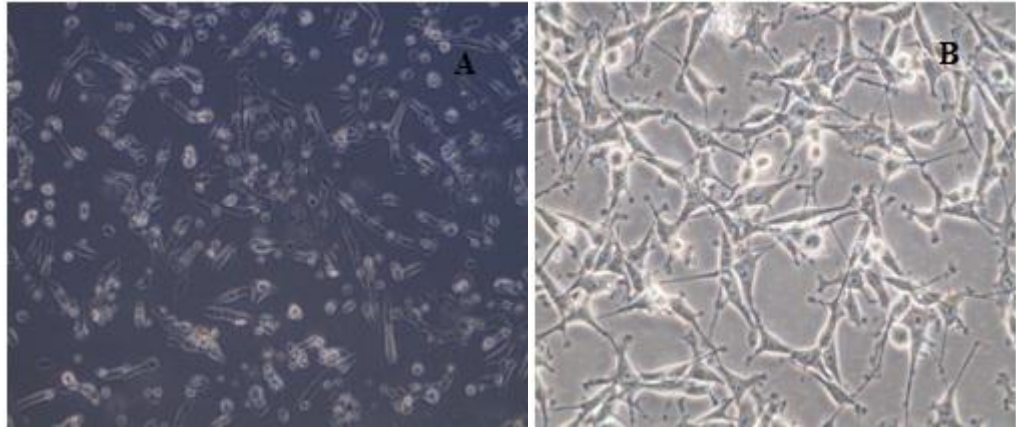
Şekil 3 (A,B,C). Beyin dokusunun elde edilmesi ve mekanik olarak parçalanması.

Primer nöron hücre kültürleri 37°C'de %5 CO₂ 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 4. Faz kontrast mikroskobu 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 CO₂ 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 CO₂ 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 kabınının 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 kültürününün devamı sağlandı ve değişik pasajlara ait astrosit hücre kültürleri kullanıldı (72,73) (Şekil 5).



Şekil 5. 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 (36,40).

Eritropoetinin Hazırlanması

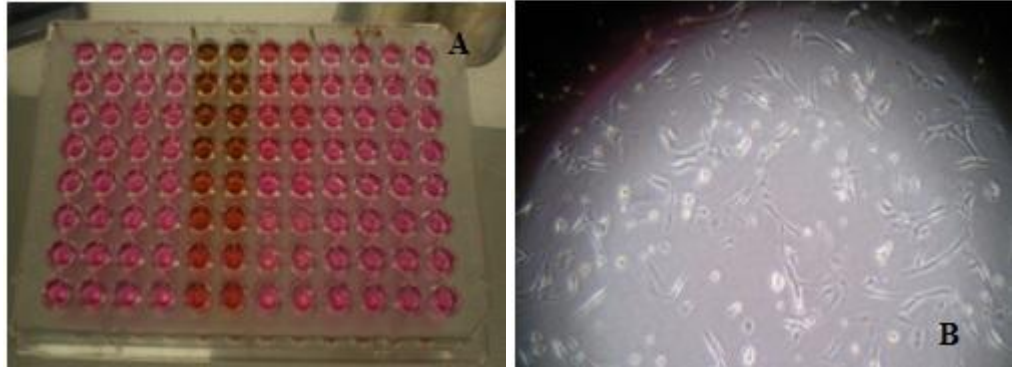
Astrosit hücre kültüründe kullanılan ve bir mililitresinde 1000 IU etken madde içeren Epo stok solüsyonu hazırlandı.

Bilirubin ve Epo Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Astrosit hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 3×10^4 hücre/100 µl astrosit besiyeri içerisinde olacak şekilde ekildikten 24 saat sonra faz kontrast mikroskopunda incelenerek hücrelerin varlığı ve canlılıkları değerlendirildi (Şekil 6). Kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılıp her kuyucukta 100 µl olacak şekilde astrosit besiyeri eklendikten sonra sıfıncı saat olarak kabul edildi. Sıfıncı 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, 600 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 30 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1 µM, 0.5 µM indirekt bilirubin eklendi. Yine her konsantrasyon için altışar kuyucuk olacak şekilde sırasıyla 100 IU/ml, 50 IU/ml, 25 IU/ml, 10 IU/ml, 5 IU/ml, 2.5 IU/ml, 1 IU/ml, 0.8 IU/ml, 0.5 IU/ml, 0.3 IU/ml, 0.05 IU/ml Epo eklendi. Kuyucuklardaki sıvı miktarını 100 µl'ye tamamlayacak şekilde astrosit besiyeri ilave edildi. Plaklar 37°C'de %5 CO₂ 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 eritropoetin konsantrasyonu belirlendi.

Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Astrosit hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 100 µl astrosit besiyeri içerisinde 3×10^4 hücre olacak şekilde ekilip; 72 saat sonra kuyucuklar faz kontrast mikroskopunda incelenerek hücrelerin varlığı ve canlılıkları değerlendirildi. Kuyucuklar kontrol, bilirubin, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo 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 karanlık ortamda 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 nem içeren 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 (74,75).



Şekil 6. A: 96 kuyucuklu plaklar;

B: Kuyucuklu plaklardaki astrosit hücreleri (x40).

Apopitozisin Belirlenmesi

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

Kontrol, bilirubin, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo grupları kültür kaplarında 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 nem içeren karanlık ortamda 48 saat inkübe edildikten sonra astrosit besiyeri aspire edildi. Hücreler serum fizyolojik ile yıkanıp tekrar aspire edildi. Tripsin ile hücreler tabandan kaldırıldı ve astrosit besiyeri ile yıkanarak hücrelerin tabandan tamamen kalkması sağlandı. Falcon 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 – 20⁰C’de beş dakika bekletildi. Distile su ile yıkanan lam üzerine TdT solüsyonu eklendikten sonra 37⁰C’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. Lamalara 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 (76).

Parametrelerin Aktivite ve Düzey Ölçümü

Katalaz aktivitesi ölçümü için *CAT Assay Kit* (Cayman, katalog no 707002), SOD aktivitesi ölçümü için *SOD Assay Kit* (Cayman, katalog no 706002), LDH aktivitesi ölçümü için *LDH Cytotoxicity Assay Kit* (Cayman, katalog no 10008882), total nitrat/nitrit düzeyi ölçümü için *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit* (Cayman, katalog no 780001), glutasyon düzeyi ölçümü için *Glutathione Assay Kit* (Cayman, katalog no 703002), GPx aktivitesi ölçümü için *Colorimetric Assay for Cellular Glutathione Peroxidase* kit (OxisResearch, katalog no 21017), MDA düzeyi ölçümü için *Colorimetric Assay For Lipid Peroxidation* (OxisResearch, katalog no 21012), TNF- α düzeyi ölçümü için *Human TNF alpha ELISA Kit* (Boster, katalog no EK0525), IL-1 β düzeyi ölçümü için *Human IL-1 beta ELISA Kit* (Boster, katalog no EK0392) ve IL-6 düzeyi ölçümü için *Human IL-6 ELISA Kit* (Boster, katalog no EK0410) kitleri kullanılarak protokoller uygulandı.

İstatistiksel Analiz

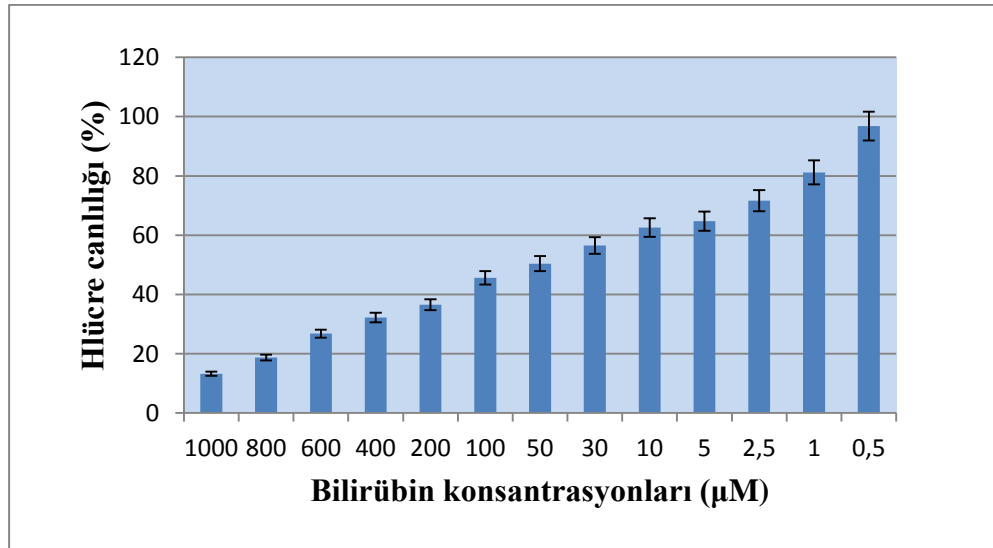
Tüm veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Çalışma grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirlemede non-parametrik testler Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Verilerin bilgisayarda hesaplanmasında *statistical packages for social sciences* (SPSS) (SPSS for Windows 17.0; SPSS,

Chicago, Illinois, A.B.D) yazılım programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Bilirubin ve Epo Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

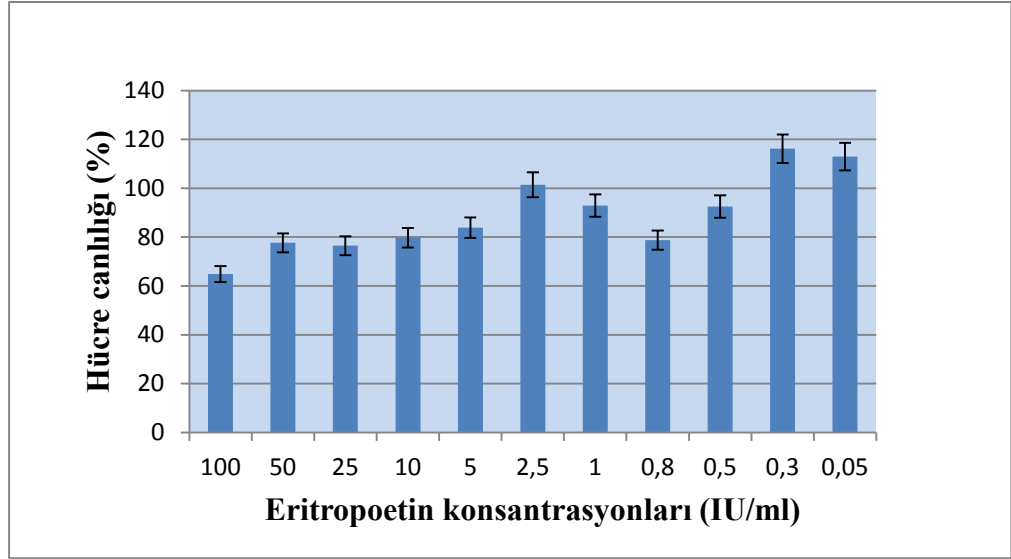
Farklı konsantrasyonlarda (1000 μM 'den 0.5 μM 'e kadar) bilirubin uygulandıktan 72 saat sonra % olarak hücre canlılığı belirlendi. Bilirubin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı 1000 μM : % 13.2, 800 μM : % 18.7, 600 μM : % 26.7, 400 μM : % 32.2, 200 μM : % 36.5, 100 μM : % 45.6, 50 μM : % 50.3, 30 μM : % 56.4, 10 μM : % 62.5, 5 μM : % 64.7, 2.5 μM : % 71.6, 1 μM : % 81.1 ve 0.5 μM : % 96.8 saptandı (Şekil 7). Bilirubin konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı azaldı. Astrosit hücrelerinin %50'sine toksik etkili olan bilirubin konsantrasyonu (TC_{50}) 50 μM olarak saptandı. Sitotoksisite, apoptozis değerlendirilmesinde, katalaz, SOD, GPx, LDH aktivite ölçümünde ve glutatyon, MDA, total nitrit/nitrat, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzey ölçümünde 50 μM konsantrasyonu kullanıldı.



Şekil 7. Bilirubin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı.

Farklı konsantrasyonlarda (100 IU/ml'den 0.05 IU/ml'ye kadar) Epo uygulandıktan 72 saat sonra % olarak hücre canlılığı belirlendi. Epo konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı 100 IU/ml: % 64.8, 50 IU/ml: % 77.6, 25 IU/ml: % 76.4, 10 IU/ml: % 79.7, 5 IU/ml: % 83.8, 2.5 IU/ml: % 101.4, 1 IU/ml: % 92.9, 0.8 IU/ml: % 78.6, 0.5 IU/ml: % 92.5, 0.3 IU/ml: % 116.2 ve 0.05 IU/ml: % 112.9 saptandı (Şekil 8). Hücre canlılığını % 100 arttıran Epo değeri 2.5 IU/ml olarak belirlendi. Sitotoksisite, apoptozis değerlendirilmesinde, katalaz, SOD, GPx,

LDH aktivite ölçümünde ve glutasyon, MDA, total nitrit/nitrat, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzey ölçümünde 2.5 IU/ml Epo konsantrasyonu kullanıldı.



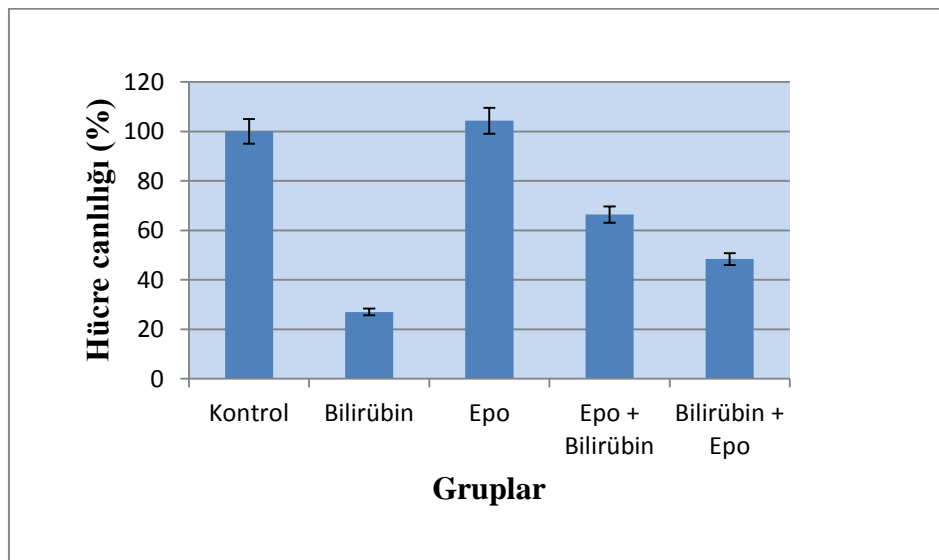
Şekil 8. Epo konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı.

Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Grupların başlangıçtaki hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek; 72. saatte hücre canlılığı yeniden değerlendirildi. Hücre canlılığı 72. saatte kontrol grubunda % 100.00 ± 0.50 iken, bilirubin grubunda % 27.05 ± 0.26 , Epo grubunda % 104.43 ± 0.63 , Epo + bilirubin grubunda % 66.62 ± 1.91 , bilirubin + Epo grubunda % 48.34 ± 5.07 bulundu. Bilirubin grubunda hücre canlılığı en düşük olup; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bilirubin grubunda hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0.000$). Hücre canlılığı Epo grubunda % 104.43 ± 0.63 olup; bilirubin grubuyla karşılaştırıldığında Epo grubunda hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı (sırasıyla $p=0.000$ ve $p=0.62$). Epo, Epo + bilirubin ve bilirubin + Epo gruplarında hücre canlılığındaki artış, bilirubin grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.001$, $p=0.018$). Epo + bilirubin ile bilirubin + Epo grupları karşılaştırıldığında, Epo'nun profilaktik verilmesinin, tedavi edici amaçla verilmesine göre hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı arttırdığı görüldü ($p=0.015$) (Tablo 1, Şekil 9).

Tablo 1. Grupların hücre canlılığındaki değişim yüzdeleri.

72. saatteki hücre canlılığı (%)	
Gruplar	(Ort ± SD)
Kontrol	100.00 ± 0.50
Bilirubin	27.05 ± 0.26
Epo	104.43 ± 0.63
Epo + Bilirubin	66.62 ± 1.91
Bilirubin + Epo	48.34 ± 5.07
İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Epo)	0.62
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.001
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.003
(Bilirubin) - (Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.001
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.018
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.002
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.015



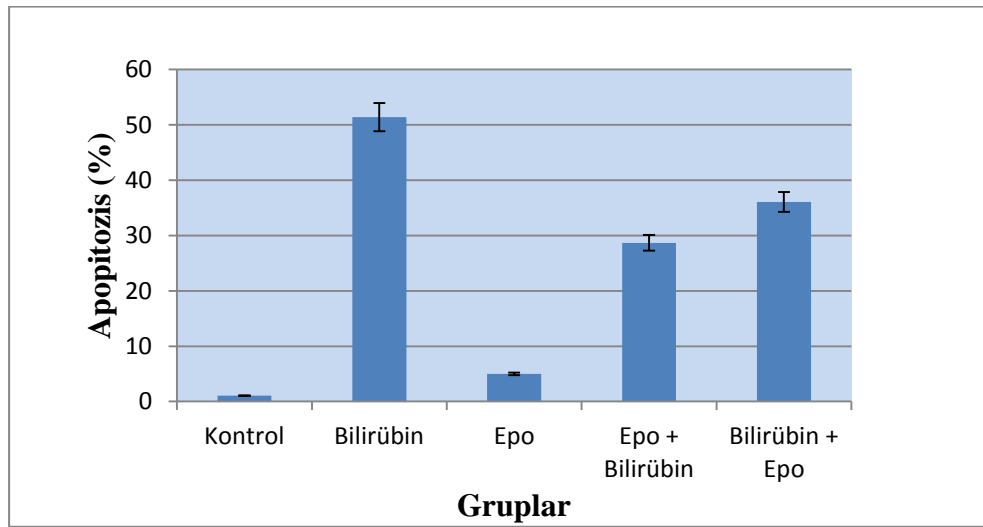
Şekil 9. Grupların 72. saatte hücre canlılığı.

Apopitozisin Değerlendirilmesi

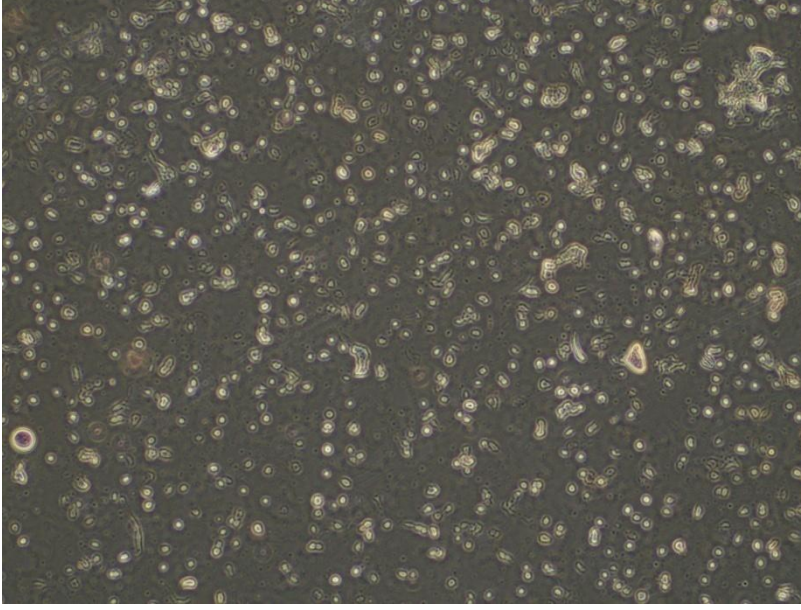
Gruplarda astrosit hücrelerinde apopitozis 24. saatte değerlendirildi (Şekil 11-15). Apopitozis, kontrol grubunda % 1.04 ± 0.11 , bilirubin grubunda % 51.10 ± 1.15 , Epo grubunda % 5.03 ± 0.07 , Epo + bilirubin grubunda % 28.72 ± 0.29 , bilirubin + Epo grubunda % 36.13 ± 0.42 saptandı. Apopitozis kontrol grubunda en düşük, bilirubin grubunda en yüksekti. Diğer gruplarla karşılaştırıldığında, kontrol grubunda apopitozis düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.009$). Kontrol, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo gruplarıyla karşılaştırıldığında, bilirubin grubunda apopitoz artışı istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.001$). Epo grubundaki apopitozis Epo + bilirubin ve bilirubin + Epo gruplarından düşük olup; bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$). Epo + bilirubin grubundaki apopitozis, bilirubin + Epo grubuna göre daha düşük olup ($p=0.000$); profilaktik Epo'nun tedavi amacıyla kullanılan Epo'dan daha etkili olduğu görüldü (Tablo 2, Şekil 10).

Tablo 2. Astrosit hücrelerinde apoptozisin değerlendirilmesi.

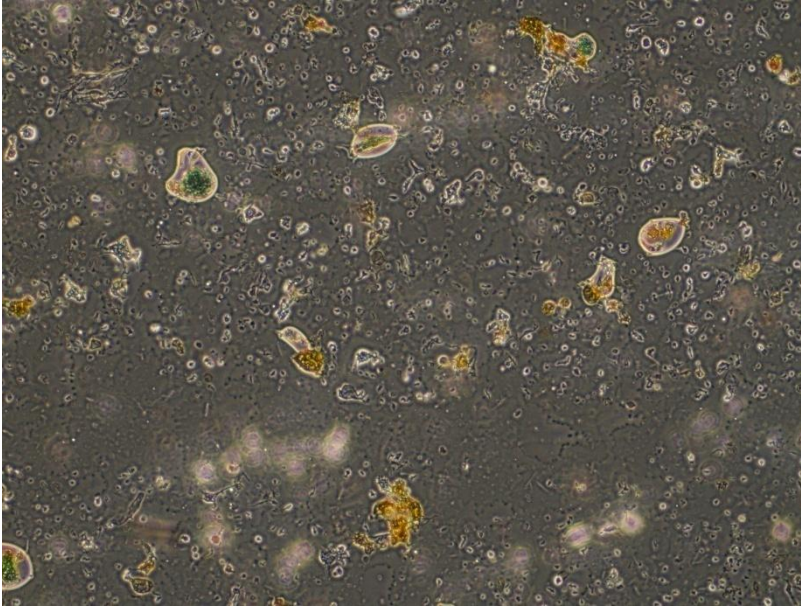
24. saatte apoptozis (%)	
Gruplar	(Ort ± SD)
Kontrol	1.04 ± 0.11
Bilirubin	51.10 ± 1.15
Epo	5.03 ± 0.07
Epo + Bilirubin	28.72 ± 0.29
Bilirubin + Epo	36.13 ± 0.42
İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Epo)	0.000
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.001
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.000



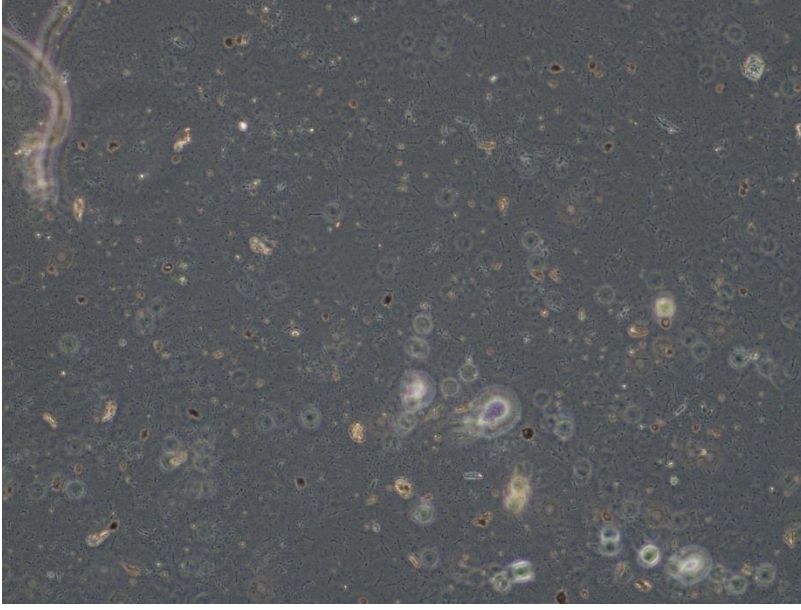
Şekil 10. Grupların 24. saatte apoptozis yüzdeleri.



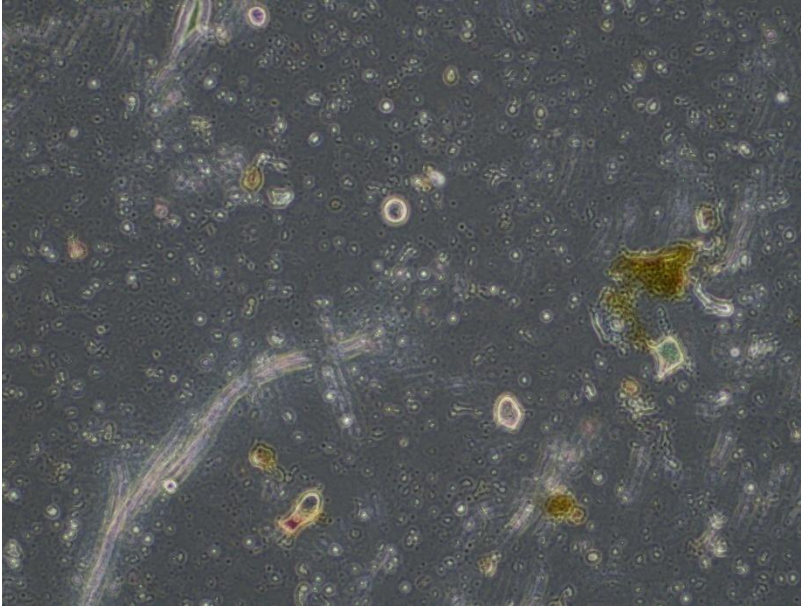
Şekil 11. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Kontrol grubu (x40).



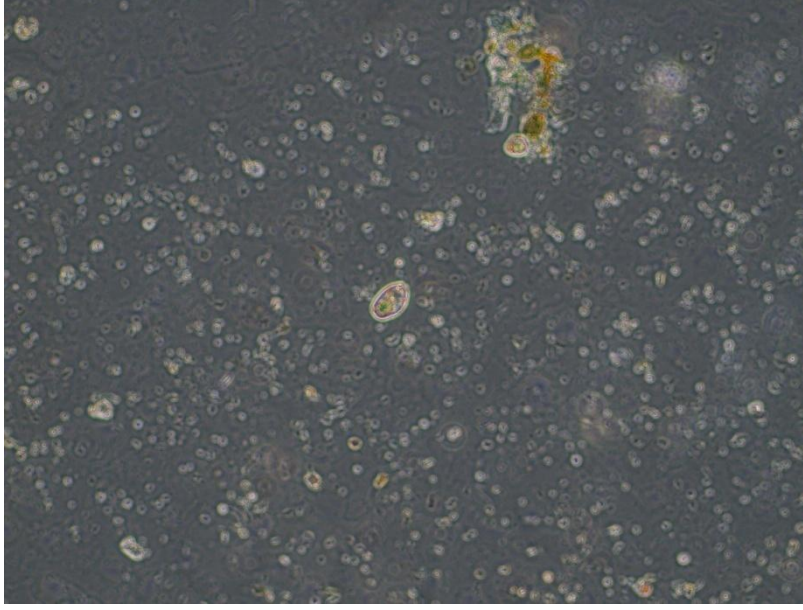
Şekil 12. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Bilirubin grubu (x40).



Şekil 13. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Epo grubu (x40).



Şekil 14. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Epo + bilirubin grubu (x40).



Şekil 15. TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Bilirubin + Epo grubu (x40).

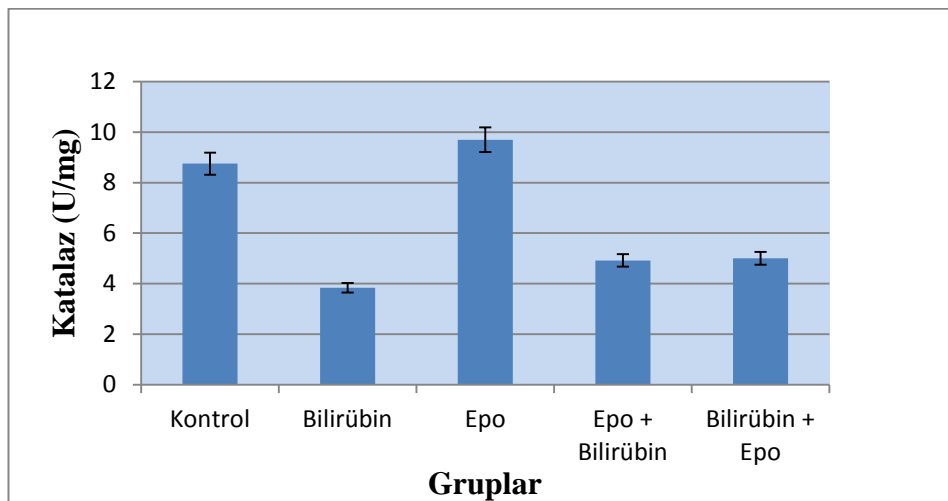
Katalaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Grupların katalaz aktivitesi 24. saatte değerlendirildi. Katalaz aktivitesi kontrol grubunda 8.74 ± 0.15 U/mg, bilirubin grubunda 3.83 ± 0.12 U/mg, Epo grubunda 9.69 ± 0.17 U/mg, Epo + bilirubin grubunda 4.91 ± 0.23 U/mg, bilirubin + Epo grubunda 5.00 ± 0.24 U/mg saptandı. Epo grubunda katalaz aktivitesi kontrol grubundan daha yüksek olup; istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0.002$). Bilirubin grubunda katalaz aktivitesinin diğer gruplardan daha düşük olduğu görüldü ve kontrol, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo grubu ile karşılaştırıldığında bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.005$, $p=0.005$). Epo grubunda katalaz aktivitesi Epo + bilirubin ve bilirubin + Epo grubundan yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$). Bilirubin + Epo ve Epo + bilirubin grupları arasında katalaz aktivitesi bakımından fark saptanmadı ($p=0.66$) (Tablo 3, Şekil 16).

Tablo 3. Grupların katalaz aktiviteleri.

Gruplar	Katalaz aktivitesi (U/mg) (Ort ± SD)
Kontrol	8.74 ± 0.15
Bilirubin	3.83 ± 0.12
Epo	9.69 ± 0.17
Epo + Bilirubin	4.91 ± 0.23
Bilirubin + Epo	5.00 ± 0.24

İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Epo)	0.002
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.005
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.005
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.66



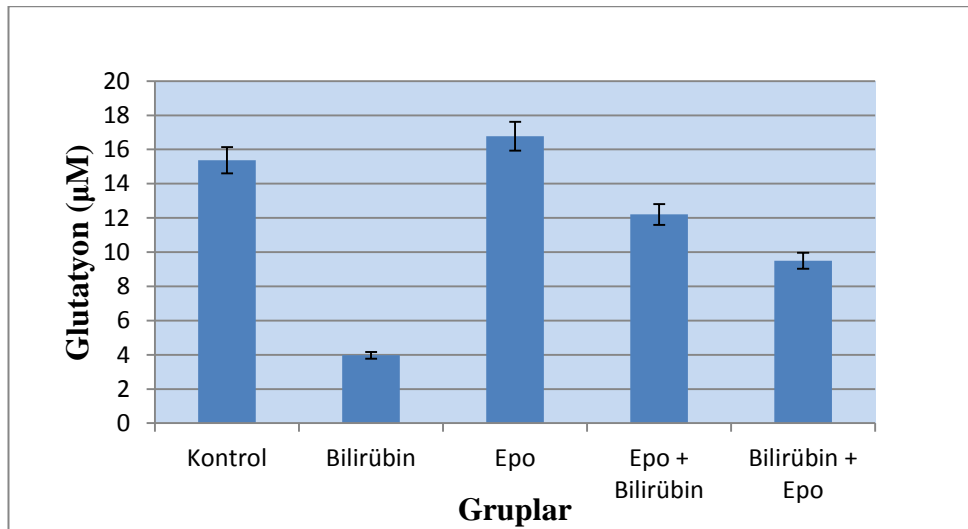
Şekil 16. Grupların katalaz aktiviteleri.

Glutasyon Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların glutasyon düzeyi 24. saatte değerlendirildi. Glutasyon düzeyi kontrol grubunda $15.35 \pm 0.34 \mu\text{M}$, bilirubin grubunda $3.96 \pm 0.16 \mu\text{M}$, eritropoetin grubunda $16.76 \pm 0.24 \mu\text{M}$, eritropoetin + bilirubin grubunda $12.20 \pm 0.05 \mu\text{M}$, bilirubin + eritropoetin grubunda $9.49 \pm 0.29 \mu\text{M}$ saptandı. Epo grubunda glutasyon düzeyi kontrol grubundan daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0.006$). Bilirubin grubunda glutasyon düzeyinin diğer gruplardan düşük olduğu görüldü ve kontrol, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$). Epo grubunda glutasyon düzeyi Epo + bilirubin ve bilirubin + Epo grubundan yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.000$). Epo + bilirubin grubunda glutasyon düzeyi, bilirubin + Epo grubundan yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.003$) (Tablo 4, Şekil 17).

Tablo 4. Grupların glutasyon düzeyleri.

Glutasyon düzeyi (μM)	
Gruplar	(Ort \pm SD)
Kontrol	15.35 \pm 0.34
Bilirubin	3.96 \pm 0.16
Epo	16.76 \pm 0.24
Epo + Bilirubin	12.20 \pm 0.05
Bilirubin + Epo	9.49 \pm 0.29
İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Epo)	0.006
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.003
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.001
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.003



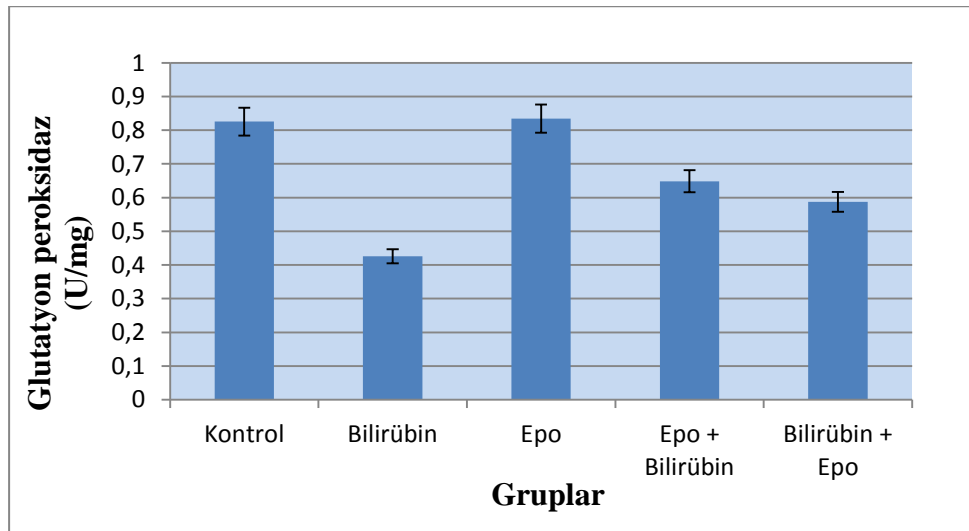
Şekil 17. Grupların glutasyon düzeyi.

Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Grupların GPx aktivitesi 24. saatte değerlendirildi. Glutasyon peroksidaz aktivitesi kontrol grubunda 0.82 ± 0.01 U/mg, bilirubin grubunda 0.42 ± 0.03 U/mg, Epo grubunda 0.83 ± 0.01 U/mg, Epo + bilirubin grubunda 0.64 ± 0.02 U/mg, bilirubin + Epo grubunda 0.58 ± 0.02 U/mg saptandı. Epo grubunda GPx aktivitesi kontrol grubundan yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.28$). Bilirubin grubunda GPx aktivitesi diğer gruplardan daha dūşüktü ve kontrol, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.002$). Epo grubunda GPx aktivitesi Epo + bilirubin ve bilirubin + Epo gruplarından daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.001$). Epo + bilirubin grubunda GPx aktivitesi, bilirubin + Epo grubundan yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.04$) (Tablo 5, Şekil 18).

Tablo 5. Grupların GPx aktiviteleri.

Glutasyon peroksidaz aktivitesi (U/mg)	
Gruplar	(Ort ± SD)
Kontrol	0.82 ± 0.01
Bilirubin	0.42 ± 0.03
Epo	0.83 ± 0.01
Epo + Bilirubin	0.64 ± 0.02
Bilirubin + Epo	0.58 ± 0.02
İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.001
(Kontrol) - (Epo)	0.28
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.003
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.001
(Bilirubin) - (Epo)	0.001
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.001
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.002
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.002
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.001
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.04



Şekil 18. Grupların GPx aktiviteleri.

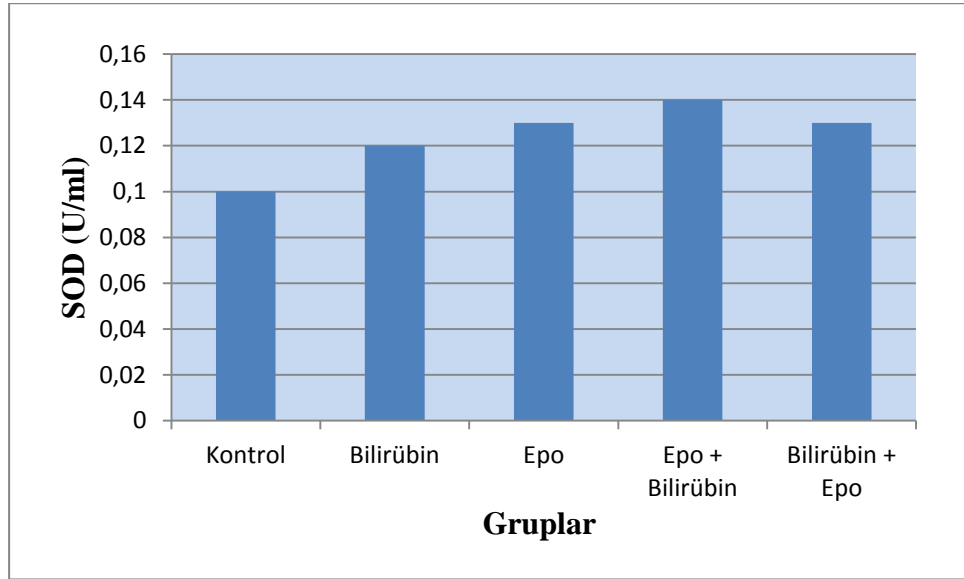
Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Süperoksit dismutaz aktivitesi 24. saatte değerlendirildi. Grupların SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 6, Şekil 19).

Tablo 6. Grupların SOD aktiviteleri.

Gruplar*	SOD düzeyi (U/ml)
	(Ort \pm SD)
Kontrol	0.10 \pm 0.05
Bilirubin	0.12 \pm 0.08
Epo	0.13 \pm 0.04
Epo + Bilirubin	0.14 \pm 0.05
Bilirubin + Epo	0.13 \pm 0.02

*Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).



Şekil 19. Grupların SOD aktiviteleri.

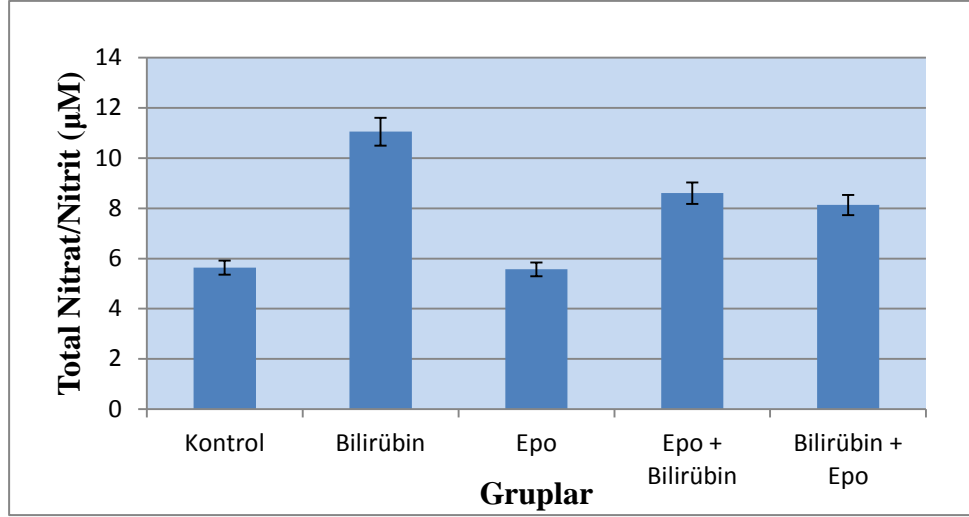
Total Nitrat/Nitrit Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların total nitrat/nitrit düzeyi 24. saatte değerlendirildi. Total nitrat/nitrit düzeyi kontrol grubunda $5.63 \pm 0.62 \mu\text{M}$, bilirubin grubunda $11.05 \pm 0.93 \mu\text{M}$, eritropoetin grubunda $5.56 \pm 0.22 \mu\text{M}$, eritropoetin + bilirubin grubunda 8.60 ± 0.61

μM , bilirubin + eritropoetin grubunda $8.13 \pm 0.91 \mu\text{M}$ saptandı. Epo grubunda total nitrat/nitrit düzeyi kontrol grubundan düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.84$). Bilirubin grubunda total nitrat/nitrit düzeyinin kontrol, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo gruplarından istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görüldü (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.007$, $p=0.007$, $p=0.013$). Epo grubunda total nitrat/nitrit düzeyi Epo + bilirubin ve bilirubin + Epo grubundan düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.025$, $p=0.014$). Epo + bilirubin ve bilirubin + Epo grupları arasında total nitrat/nitrit düzeyleri bakımından istatistiksel bir fark saptanmadı ($p=0.41$) (Tablo 7, Şekil 20).

Tablo 7. Grupların total nitrat/nitrit düzeyleri.

Total Nitrat/Nitrit düzeyi (μM)	
Gruplar	(Ort \pm SD)
Kontrol	5.63 ± 0.62
Bilirubin	11.05 ± 0.93
Epo	5.56 ± 0.22
Epo + Bilirubin	8.60 ± 0.61
Bilirubin + Epo	8.13 ± 0.65
İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.001
(Kontrol) - (Epo)	0.84
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.01
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.006
(Bilirubin) - (Epo)	0.007
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.007
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.013
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.025
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.014
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.41



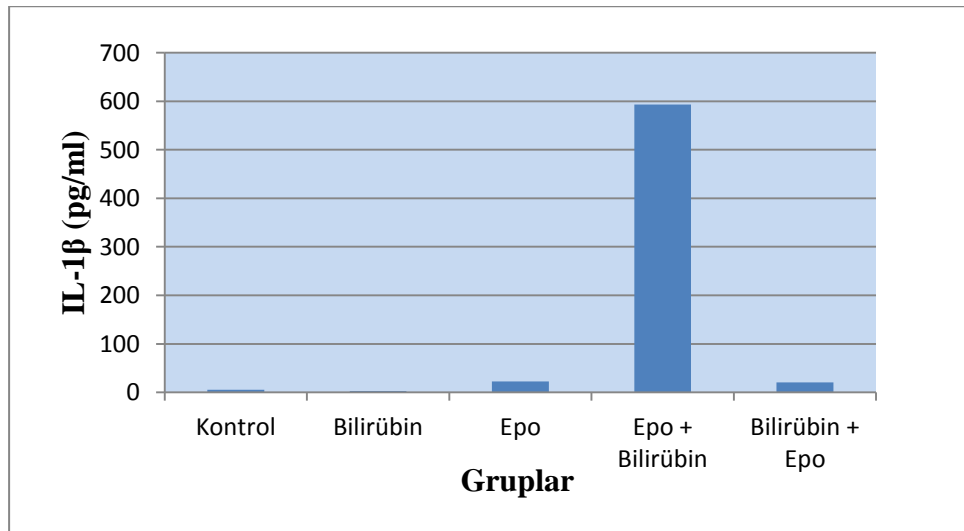
Şekil 20. Grupların total nitrat/nitrit düzeyleri.

İnterlökin-1 β Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların IL-1 β düzeyi 24. saatte değerlendirildi. IL-1 β düzeyi kontrol grubunda 5.19 ± 0.04 pg/ml, bilirubin grubunda 2.95 ± 0.05 pg/ml, Epo grubunda 22.85 ± 0.19 pg/ml, Epo + bilirubin grubunda 593.60 ± 2.97 pg/ml, bilirubin + Epo grubunda 20.47 ± 0.82 pg/ml saptandı. Kontrol grubunda IL-1 β düzeyi Epo grubundan düşük olup; istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.000$). Bilirubin grubunda IL-1 β düzeyinin diğer gruplardan düşük olduğu görüldü ve kontrol, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$). Epo + bilirubin grubunda IL-1 β düzeyi Epo ve bilirubin + Epo gruplarından yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$) (Tablo 8, Şekil 21).

Tablo 8. Grupların IL-1 β düzeyleri.

Gruplar	IL-1 β düzeyi (pg/ml)
	(Ort \pm SD)
Kontrol	5.19 \pm 0.04
Bilirubin	2.95 \pm 0.05
Epo	22.85 \pm 0.19
Epo + Bilirubin	593.60 \pm 2.97
Bilirubin + Epo	20.47 \pm 0.82
İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Epo)	0.000
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.032
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.000



Şekil 21. Grupların IL-1 β düzeyleri.

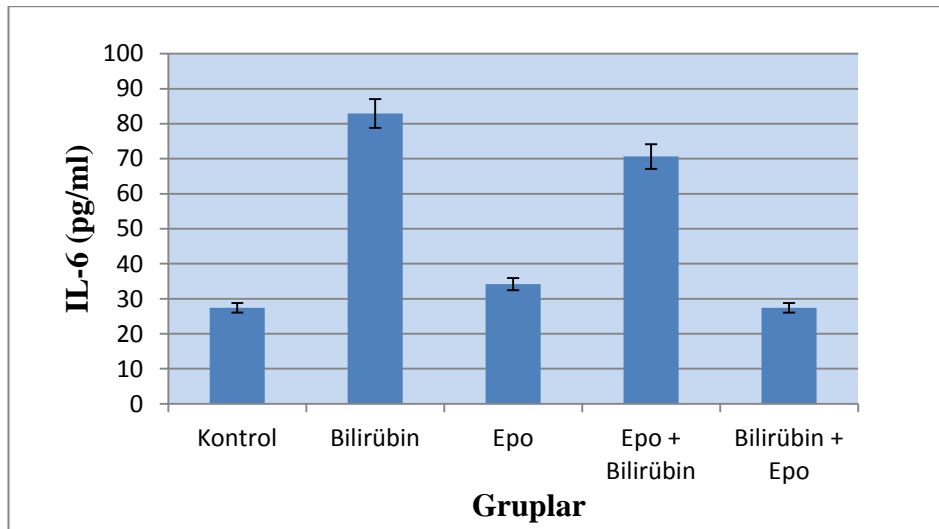
İnterlökin-6 Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların IL-6 düzeyi 24. saatte değerlendirildi. IL-6 düzeyi kontrol grubunda 27.38 ± 0.46 pg/ml, bilirubin grubunda 82.92 ± 1.68 pg/ml, Epo grubunda 34.20 ± 2.66 pg/ml, Epo + bilirubin grubunda 70.64 ± 0.50 pg/ml, bilirubin + Epo grubunda 45.35 ± 1.12 pg/ml saptandı. Kontrol grubunda IL-6 düzeyi Epo grubundan düşük olup; istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.044$). Bilirubin grubunda IL-6 düzeyinin diğer gruplardan yüksek olduğu görüldü ve kontrol, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.004$, $p=0.000$). Epo grubunda IL-6 düzeyi Epo + bilirubin ve bilirubin + Epo gruplarından düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.01$). Bilirubin + Epo grubunda IL-6 düzeyi, Epo + bilirubin grubundan düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.000$) (Tablo 9, Şekil 22).

Tablo 9. Grupların IL-6 düzeyleri.

Gruplar	IL-6 düzeyi (pg/ml) (Ort ± SD)
Kontrol	27.38 ± 0.46
Bilirubin	82.92 ± 1.68
Epo	34.20 ± 2.66
Epo + Bilirubin	70.64 ± 0.50
Bilirubin + Epo	45.35 ± 1.12

İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Epo)	0.044
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.004
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.001
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.01
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.000



Şekil 22. Grupların IL-6 düzeyleri.

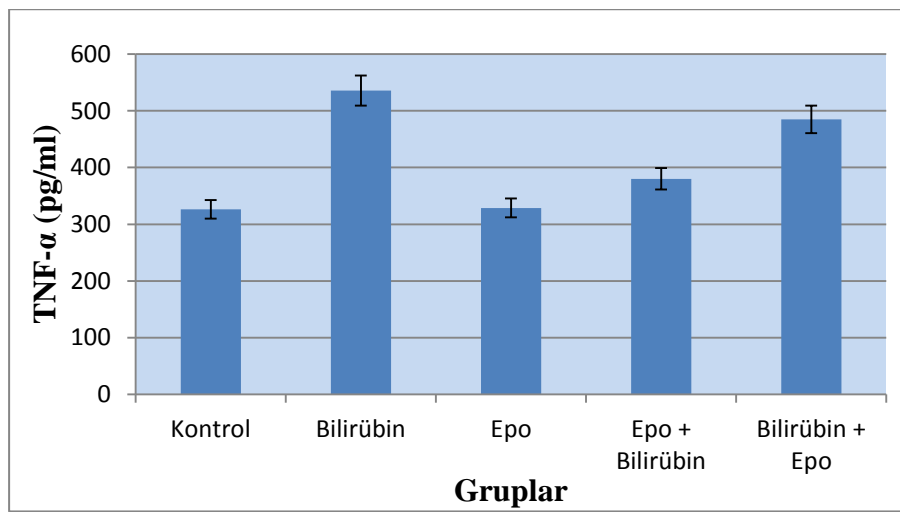
Tümör Nekrozis Faktör- α Düzeyinin Değerlendirilmesi

Grupların TNF- α düzeyi 24. saatte değerlendirildi. TNF- α düzeyi kontrol grubunda 326.30 ± 3.23 pg/ml, bilirubin grubunda 535.73 ± 3.04 pg/ml, Epo grubunda 328.74 ± 1.82 pg/ml, Epo + bilirubin grubunda 380.07 ± 5.07 pg/ml, bilirubin + Epo grubunda 484.72 ± 2.03 pg/ml saptandı. Kontrol grubunda TNF- α düzeyi Epo grubundan düşüktü, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.33$). Bilirubin grubunda TNF- α düzeyinin diğer gruplardan yüksek olduğu görüldü ve kontrol, Epo, Epo + bilirubin, bilirubin + Epo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$). Epo grubundaki TNF- α düzeyi Epo + bilirubin ve bilirubin + Epo grubundan düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.000$). Epo + bilirubin grubundaki TNF- α düzeyi, bilirubin + Epo grubundan düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.000$) (Tablo 10, Şekil 23).

Tablo 10. Grupların TNF- α düzeyleri.

Gruplar	TNF-α düzeyi (pg/ml) (Ort \pm SD)
Kontrol	326.30 \pm 3.23
Bilirubin	535.73 \pm 3.04
Epo	328.74 \pm 1.82
Epo + Bilirubin	380.07 \pm 5.07
Bilirubin + Epo	484.72 \pm 2.03

İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Epo)	0.33
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.000
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.001
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.000



Şekil 23. Grupların TNF- α düzeyleri.

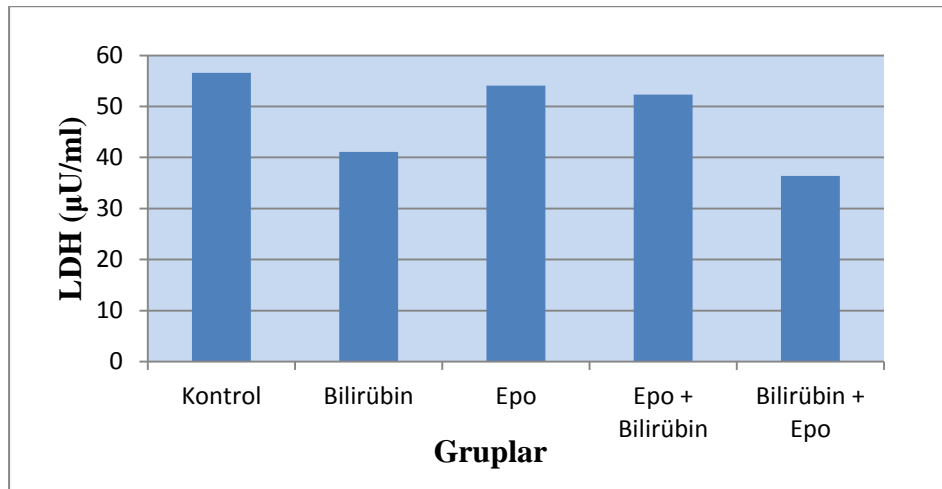
Laktat Dehidrojenaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Grupların LDH aktivitesi 24. saatte değerlendirildi. LDH aktivitesi kontrol grubunda 56.02 ± 0.50 $\mu\text{U/ml}$, bilirubin grubunda 41.73 ± 0.58 $\mu\text{U/ml}$, Epo grubunda 54.59 ± 1.01 $\mu\text{U/ml}$, Epo + bilirubin grubunda 52.62 ± 1.08 $\mu\text{U/ml}$, bilirubin + Epo grubunda 36.48 ± 0.74 $\mu\text{U/ml}$ saptandı. Kontrol grubunda LDH aktivitesi bilirubin grubundan yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.000$). Epo ve Epo + bilirubin gruplarındaki LDH aktivitesi bilirubin grubundan yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.001$). Bilirubin + Epo grubundaki LDH aktivitesi bilirubin grubundan düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.001$). Epo + bilirubin grubundaki LDH aktivitesi, bilirubin + Epo grubundan yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.000$). Profilaktik Epo'nun LDH aktivitesini arttırdığı ($p=0.001$); tedavi edici Epo'nun ise LDH aktivitesini azalttığı görüldü ($p=0.001$). (Tablo 11, Şekil 24).

Tablo 11. Grupların LDH aktiviteleri.

LDH aktivitesi ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	
Gruplar	(Ort \pm SD)
Kontrol	56.02 \pm 0.50
Bilirubin	41.73 \pm 0.58
Epo	54.59 \pm 1.01
Epo + Bilirubin	52.62 \pm 1.08
Bilirubin + Epo	36.48 \pm 0.74

İkili Gruplar	p değerleri
(Kontrol) - (Bilirubin)	0.000
(Kontrol) - (Epo)	0.09
(Kontrol) - (Epo + Bilirubin)	0.07
(Kontrol) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo)	0.000
(Bilirubin) - (Epo + Bilirubin)	0.001
(Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.001
(Epo) - (Epo + Bilirubin)	0.08
(Epo) - (Bilirubin + Epo)	0.000
(Epo + Bilirubin) - (Bilirubin + Epo)	0.000



Şekil 24. Grupların LDH aktiviteleri.

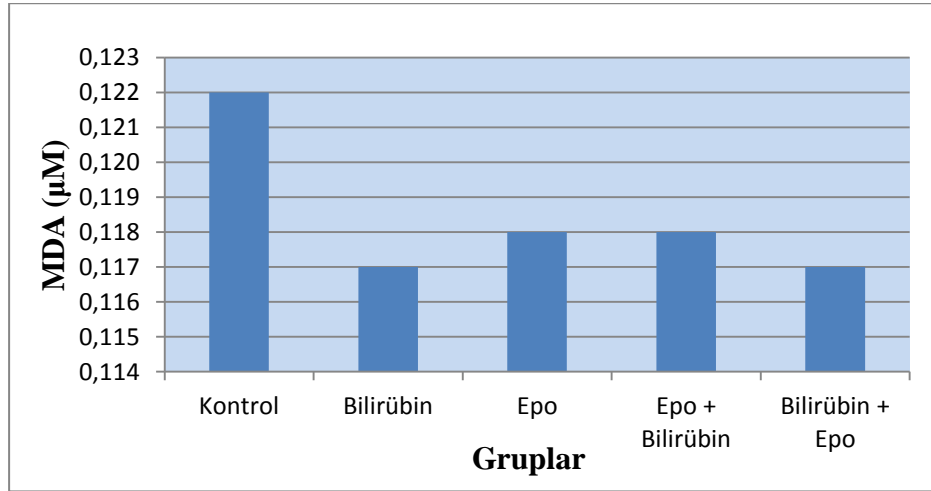
Malondialdehit Düzeyinin Değerlendirilmesi

Malondialdehit düzeyi 24. saatte değerlendirildi. Grupların MDA düzeyi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 12, Şekil 25).

Tablo 12. Grupların MDA düzeyleri.

Gruplar*	MDA düzeyi (μM)
	(Ort \pm SD)
Kontrol	0.122 \pm 0.006
Bilirubin	0.117 \pm 0.008
Epo	0.118 \pm 0.005
Epo + Bilirubin	0.118 \pm 0.005
Bilirubin + Epo	0.117 \pm 0.008

*Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).



Şekil 25. Grupların MDA düzeyleri.

TARTIŞMA

İndirekt hiperbilirubinemi, ekstrauterin hayata adaptasyon döneminde çoğu yenidoğanda karşılaşılan ve genellikle tedavi gerektirmeden kendiliğinden düzelen fizyolojik bir durumdur. Fetal eritrosit ömrünün kısa olmasına bağlı eritrosit yıkımının ve bilirubin üretiminin artması, hem yıkım ürünleri atılım mekanizmasının gelişmemiş olması ve UDPGT enzim aktivitesinin düşüklüğü indirekt hiperbilirubinemiye yol açmaktadır (77). Annenin emzirme eğitimi tamamlanmadan bebeğin hastaneden erken taburcu edilmesi, taburculuktan sonra düzenli ve yakın bilirubin takibi yapılmaması durumunda bilirubin düzeyi çok yükselebilir. Hiperbilirubinemi tedavi edilmediğinde, bilirubin düzeyine bağlı olarak minör nörolojik hasar, akut bilirubin ensefalopatisi, kernikterus ve hatta ölüm görülebilmektedir (75).

Ağır hiperbilirubinemik yenidoğanlarda, beynin belirli bölgelerinde bilirubinün birikmesiyle geçici veya kalıcı işitsel, motor ve mental fonksiyon bozukluğuyla sonuçlanan bilirubin ensefalopatisi gelişebilir (78). Kronik bilirubin ensefalopatisi olarak tanımlanan kernikterusun insidansı tam olarak bilinmemekle birlikte; günümüzde daha az görülmektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da kernikterus görülme sıklığının 100000 canlı doğumda 1-1.4 olduğu tahmin edilmektedir (79). Serebellum, purkinje hücreleri, derin serebellar nukleus, dördüncü ventrikül zeminindeki nukleus, bazal ganglion, hipokampus ve kraniyal sinir nukleusları (özellikle 8. sinir) bilirubin toksisitesine en duyarlı olan beyin bölgeleridir. Kernikterus koreatetoid serebral palsy, sensörinöral işitme kaybı, yukarı bakış paralizisi ve dental enamel displazi ile karakterizedir. Kernikteruslu term bebeklerin MR görüntülemesinde globus pallidus, talamus ve hipokampusta sinyal şiddetinde artış görülmüştür (6). Akut bilirubin ensefalopatisi ve kernikterusun önlenmesinde yakın ve bireysel bilirubin takibinin yapılması anahtar rol oynamaktadır.

İndirekt bilirubin, yüksek düzeylerde kalıcı nöral hasara yol açtığı kanıtlanmış bir nörotoksindir. Total bilirubin düzeyi, vücudun nöroprotektif savunma sistemini aştığında hücrel hasar görülür. Bu nedenle, indirekt bilirubinün hangi düzeyde nörotoksik olduğu kesin olarak bilinmemektedir (80). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, pik serum bilirubin düzeyinin ≥ 22 mg/dl olmasının kötü nörogelişimsel sonuç için bağımsız bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (81).

İndirekt bilirübinin sudaki çözünürlüğü çok düşük olup %99.9'u çok sıkı olarak albumine bağlı bulunmaktadır. Plazmada bulunan ve albumine bağlı olmayan serbest bilirübin, kan-beyin bariyerini geçerek nörotoksositeye neden olmaktadır. Serbest bilirübinin çoğunluğu nötral diasit olup, hücre membranlarından pasif olarak geçebilmektedir. Hücre membranlarından geçişin yavaş olması nedeniyle serbest bilirübin düzeyinin yüksekliği kadar, yüksek bilirübin düzeyleriyle karşılaşma süresi de nörotoksosite açısından önemli bir faktördür (78).

Bilirübin toksisitesinde esas hedef nöral ve glial hücrelerdir. Astrositler, kan-beyin bariyeri oluşumunu sağlayan, nöronlara metabolik destek veren, beyinde enerji dengesini düzenleyen, fagositik, immün ve detoksifikasyon görevi olan glial hücrelerdir. Önceki çalışmalarda astrositlerin, indirekt bilirübini kandan nöronlara taşıyan asıl hücreler oldukları gösterilmiştir. Kan-beyin bariyerinin hasarında bilirübine ilk maruz kalan hücreler astrositler olduğundan; birçok çalışmada bilirübinin toksik etkisini göstermek için astrosit hücre kültürü kullanılmıştır (82). Bilirübinin nöral hücrelere toksik etkisi hem in vivo hem de in vitro olarak daha önce gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, bilirübin toksisitesine nöronların astrositlere göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Sonuçta bilirübin ensefalopatisinin patogenezinin anlaşılmasında astrositlerin esas role sahip olduğu anlaşılmıştır (40). Ayrıca astrositlerin nöronlara göre hücre içi glutatyon deposu daha fazladır. Daha çok antioksidan enzim sistemine sahip olması nedeniyle astrositler, nöronlara göre oksidatif hasara daha dirençlidirler (75). Biz de çalışmamızda bilirubinin toksik etkisini değerlendirmek için astrositleri kullandık.

Serbest bilirübin, <70 nM düzeyinde iken SSS hücrelerini oksidatif hasara karşı korurken; bilirübin düzeyi 71-770 nM'ye ulaştığında nörotoksik etki görülmektedir. Bilirübinin eşik değerinin bu kadar geniş bir aralıkta olması, hücre fonksiyonları ve maturasyonunun, kültürde bekleme sürelerinin ve uygulanan metodların farklı olmasından kaynaklanabilmektedir (36). Çalışmamızda indirekt bilirübini sırasıyla 1000 µM, 800 µM, 600 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 30 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1 µM, 0.5 µM konsantrasyonlarda uyguladık ve TC₅₀ değerini 50 µM olarak saptadık. Diğer çalışmalara benzer şekilde bilirübin

konsantrasyonu arttıkça hücre ölüm oranının arttığı bizim çalışmamızda da gösterildi (23,24,36,82).

Literatürde, günümüze kadar bilirubin nörotoksitesini önlemek amacıyla deneysel olarak uygulanan birkaç ilaç çalışması bulunmaktadır (15-24). Bu ilaçlardan taurinin, profilaktik olarak uygulandığında hücre içi kalsiyum dengesini düzenleyerek, apoptozisi inhibe ederek, nöron gelişimi ve hücre canlılığını aktive ederek bilirubin nörotoksitesinde koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir (20). Ursodeoksikolik asitin glial ve nöronal hücrelerde bilirubine bağlı gelişen apoptozisi inhibe ettiği bildirilmiştir (15). Geiger ve arkadaşları (17), ratlarda bilirubin nörotoksitesi oluşturulmadan önce uygulanan minosiklinin antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkisiyle nörotoksiteyi ve BAER bozukluğunu engellediğini rapor etmişlerdir. Ancak Li ve arkadaşları (18), yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada, minosiklinin ventral kohlear nukleus nöronlarında bilirubine bağlı hipereksitasyonu inhibe etmediğini belirtmişlerdir. Bilirubine bağlı işitsel nörotoksitenin değerlendirildiği in vivo bir çalışmada, taurinin hücre içi kalsiyum girişini ve eksitotoksiteyi engelleyerek ototoksiteye karşı etkili olduğu gösterilmiştir (21). Almaas ve arkadaşları (22), deksametazonun bilirubine bağlı IL-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) salınımını inhibe ederek bilirubin nörotoksitesine karşı koruyucu etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Primer astrosit hücre kültüründe bilirubinün nörotoksik etkisini önlemek için profilaktik olarak verilen dokosaheksaenoik asitin hücre canlılığını arttırdığı, apoptozisi azalttığı, antioksidan enzimleri (SOD, katalaz, GPx) arttırdığı belirtilmiştir (23). Şahin ve arkadaşlarının çalışmasında (24), hem profilaktik hem de tedavi edici olarak uygulanan ginkgo bilobanın bilirubin sitotoksitesini ve apoptozisi azalttığı gösterilmiştir.

En çok umut veren nöroprotektif ajanlardan birisi olan Epo'nun son on yılda nöroprotektif etki mekanizmaları tanımlanmış olup; asıl mekanizma apoptozisi inhibe etmesidir. Diğer mekanizmalar antiinflamatuvar, antioksidan, anjiojenik, nörogenezis, antiepileptik ve nörotrofik etkiye sahip olmasıdır. Epo'nun nöroprotektif etkisi hem in vivo, hem in vitro birçok çalışmada gösterilmiştir. Hipoksik iskemik ensefalopati (HİE), periventriküler lökomalazi ve hiperoksik beyin hasarındaki nöroprotektif rolü araştırılmıştır (13). Beyin hasarından sonra Epo ve

reseptörünün, ayrıca BOS'ta Epo düzeyinin arttığı görülmüştür (83). Epo'nun etkisi doz ve zaman bağımlı olup; nöroprotektif etki için yüksek doz (1000-30000 Ü/kg) uygulanması üzerinde durulmuştur. Epo'nun, sadece sistemik olarak yüksek dozlarda (5000 Ü/kg) verilmesinden sonra beyinde saptanması nedeniyle, yenidoğan ratların beyin ve plazmasında yüksek doz Epo'nun farmakokinetiği doğrulanmıştır. Düşük (1000 Ü/kg) ve tekrarlanan dozda Epo uygulaması ile anlamlı nöroprotektif etki saptanamamıştır. En fazla nöroprotektif etki 5000 Ü/kg üç doz ve 30000 Ü/kg tek doz uygulamalarında görülmüştür (13). Hücre kültürü deneylerinde Epo'nun nöroprotektif doz aralığının 0.1-1 IU/ml olduğu gösterilmiştir. Epo dozunun ≥ 10 IU/ml olması halinde toksik olduğu belirtilmiştir. Weber ve arkadaşları (84), orta düzeyde hipoksik ortam (%10 O₂, %85 N₂, %5 CO₂) düzenleyerek yaptıkları deneysel bir çalışmada, yüksek dozda (40 IU/ml) Epo'nun nöron hasarını daha da arttırdığını göstermişlerdir. Liu ve arkadaşlarının in vitro çalışmasında (85), hipoksiden altı saat önce ve altı saat sonra uygulanan Epo'nun, maksimum nöron hücre canlılığını sağlayan doz aralığı 0.1-1 IU/ml olarak saptanmış. Bu çalışmada, 0.001 IU/ml'den düşük ve 10 IU/ml'den yüksek Epo dozlarının hücre canlılığına etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Bir başka hücre kültürü çalışmasında, hipoksiden sonra uygulanan 1 ve 10 IU/ml dozundaki Epo'nun hücre canlılığını artırıcı etkilerinin benzer olduğu; 100 IU/ml dozundaki Epo'nun ise hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (86). Biz bu çalışmada farklı dozlarda Epo'nun astrosit hücrelerine etkisini araştırdık. Epo'yu 100 IU/ml, 50 IU/ml, 25 IU/ml, 10 IU/ml, 5 IU/ml, 2.5 IU/ml, 1 IU/ml, 0.8 IU/ml, 0.5 IU/ml, 0.3 IU/ml, 0.05 IU/ml dozlarında astrosit hücre kültürü ortamına uyguladık ve 2.5 IU/ml dozunda %100 hücre canlılığı elde ettik.

NMDA aracılıklı eksitotoksik beyin hasarı oluşturulan farelere, hasardan bir saat sonra verilen Epo'nun eksitotoksositeye karşı nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, tek veya tekrarlayan dozlarda 5000 Ü/kg Epo uygulanmış ve etkilerinin aynı olduğu görülmüştür. Epo'nun terapötik pencere aralığının eksitotoksik hasarı takiben 1-4. saatler arası olduğu belirtilmiştir (87).

Hipoksik-iskemik beyin hasarı serebral palsi, mental retardasyon, öğrenme bozukluğu ve epilepsiye yol açan önemli bir durumdur. Perinatal asfiksiye bağlı bu

kronik sekelleri önlemek amacıyla, hipoksiden hemen sonra verilen 1000 Ü/kg Epo'nun uzun dönem spatial hafıza defisitini ve nörodavranışsal beceriyi iyileştirdiği gösterilmiştir (88). Mikati ve arkadaşları (89), hipoksik bırakılan ratlara uyguladıkları 1000 Ü/kg Epo'nun konvülsiyon hassasiyetini azalttığını ve antiepileptik özelliğini saptamışlardır.

Yakın zamanda yapılan iki çalışmada HİE'li hastaların tedavisinde hipotermi ve Epo kombinasyonu denenmiştir. Fan ve arkadaşları (90), hipoksi-iskemi oluşturdukları ratlara, hipotermiden hemen ve 24, 48 saat sonra 5000 Ü/kg dozunda Epo vermişler. Kombine tedavinin sensörimotor fonksiyonları %26 oranında iyileştirdiği; ancak beyaz cevher hasarına etkili olmadığı görülmüştür. Diğer çalışmada, hipotermi tedavisine ek olarak hipoksi-iskemiden hemen, 24 saat ve bir hafta sonra Epo 1000 Ü/kg dozunda uygulanmış ve kombine tedavinin histolojik ve sensörimotor fonksiyonlara yararlı etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (91). Özellikle preterm bebeklerde olmak üzere oksijen toksisitesinin kötü nörolojik sonuçlara yol açtığı bilinmektedir. Hiperoksinin indüklediği apoptozisin oksidatif stres, proinflamatuvar sitokin artışı, nörotrofin ekspresyonunun azalması, nörotrofin yolak aktivasyonunun azalması ve beyinde hücre büyümesiyle ilişkili proteinler, nöronal migrasyon/morfoloji ve sinaptik aktivitedeki değişiklikler ile bağlantılı olduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (92). Epo, NF-κB ve PI(3)K sinyal iletim yolları ile Akt-1 aktivasyonuna yol açmaktadır. Akt-1 aktive olduğunda mitokondriyal membranlar stabilize olmakta, sitokrom c salınımı önlenmekte ve kaspaz 1,3,8 aktivitesi bloke olmaktadır (93). Bir çalışmada, 20000 Ü/kg dozunda verilen Epo'nun, hiperoksi uygulanan ratlarda apoptozise karşı nöroprotektif etkili olduğu saptanmıştır. Epo'nun kaspaz-2,3,8'i azalttığı, beyindeki proteom değişikliklerini inhibe ettiği, oksidatif stresi azalttığı, nörotrofik faktörleri arttırdığı belirtilmiştir (92). Başka bir çalışmada, 1000 Ü/kg beş gün süreyle uygulanan Epo'nun hiperoksiye bağlı nöronal hücre ölümünü, apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (94).

Nöronlara direkt etkisinin yanı sıra, Epo'nun yeni damar oluşumunu sağlayarak beyin perfüzyonunu artırıcı özelliği de bulunmaktadır. Epo ve reseptörünün damar fonksiyonu üzerine etkisi, in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Anjiyojenik

incelemelerde Epo'nun mikrovasküler dallanmayı arttırdığı ifade edilmiştir. Ayrıca endotelial hücre kültüründe vasküler fonksiyon, sinyal iletimi ve enerji transferiyle ilişkili genlerin ekspresyonunu arttırdığı da gösterilmiştir. Beyin kapiller endotel hücrelerinde, Epo'nun doz bağımlı mitojenik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Epo endotel öncüsü hücrelerin proliferasyonu, matrix metalloproteinaz-2 üretimi, vasküler alanlara endotelial hücre göçü ve kapiller damar oluşumunu uyarmaktadır (13). İn vivo olarak iskemik strok oluşturulan yenidoğan ratlarda, iskemiden bir saat sonra 5000 Ü/kg dozunda, üç gün süreyle verilen Epo'nun, nörovasküler tamiri sağladığı ve iskemiden 21 gün sonrasına kadar devam ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, Epo'nun nöron ve mikrodamar sayısını artırıcı etkisinin günler-haftalarca sürdüğü belirtilmiştir (95). Tümör hücrelerinde de Epo reseptörlerinin saptanması nedeniyle, Epo kullanımının tümör gelişimine sebep olabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan prelinik ve klinik çalışmaların sonuçları, tümör anjiogenezinde Epo'nun rolünün olmadığını göstermiştir (13).

Patogenezinde inflamasyonun merkezi rol oynaması nedeniyle, BPD'de Epo uygulaması birkaç çalışmada denenmiştir. Hiperoksi uygulanan ratlara postnatal 4-5-6. günlerde 3000 Ü/kg Epo'nun uygulandığı bir çalışmada, myeloperoksidaz ve TNF- α gibi inflamatuvar mediatörlerin azaldığı, alveol ve septa sayısının arttığı, fibrozisin azaldığı gösterilmiştir (96). Hiperoksiye maruz bırakılan ve BPD modeli oluşturulan yenidoğan ratlara postnatal üç ve beşinci günlerde 400 Ü/kg dozunda verilen Epo'nun alveol yüzey alanını ve sekonder krest sayısını arttırdığı gösterilmiştir. Antiapoptotik, antioksidan, anjiogenik ve fibrozisi azaltan etkileri nedeniyle hiperoksik akciğer hasarında Epo tedavisinin kullanılabilmesi belirtilmiştir (97).

Gastrointestinal sistemin büyüme gelişmesinde rolü olması, barsaklarda reseptörünün bulunması ve antiinflamatuvar, antiapoptotik ve trofik özellikleri nedeniyle nekrotizan enterokolit (NEK)'te de Epo'nun etkinliği araştırılmıştır. NEK modeli oluşturulan ratlarda, 750 Ü/kg haftada üç gün olacak şekilde iki hafta süreyle uygulanan Epo'nun NO'yu azaltarak NEK'te etkili olduğu bildirilmiştir (98). Epo'nun enterositlerin bariyer fonksiyonunu koruyarak NEK insidansını azaltabileceği rapor edilmiştir (99). Yüksek doz (5000 Ü/kg) Epo uygulanan in vivo

bir çalışmada, Epo'nun intestinal epitel hücre villüsünde apoptozisi azalttığı, enterosit proliferasyonu ve migrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (100).

Sepsiste hızlı bir sitokin, kemokin, prostaglandin ve NO üretimi olduğu bilinmektedir. Mikroskopik düzeyde ise oksijen dağıtımı ve tüketimi arasındaki ilişkide bozulma, mikrodolaşımda defekt, hücrel metabolik yollarda bozukluk görülmektedir. Bu değişiklikler kan-beyin bariyerini bozmakla birlikte; SSS'de oksidatif stres, enerji metabolizmasında bozukluk ve apoptozise yol açmaktadır. Sepsise bağlı beyin fonksiyonlarında görülen bozulmayı önlemek amacıyla yapılan bir çalışmada Epo'nun lipid peroksidasyonu azalttığı, katalaz ve SOD'u arttırdığı gösterilmiştir (101).

Birçok deneysel çalışmadan sonra Epo'nun klinik uygulamasına geçilmiştir. İlk olarak Ledbetter ve arkadaşları (102), 500-1250 gr ağırlığında doğan ve evre 2-3 NEK tanısı konulan 483 preterm hastaya 200 Ü/kg/gün intravenöz (iv) infüzyon veya 400 Ü/kg/gün aşırı subkutan olarak 14 gün Epo tedavisi vermişlerdir. NEK gelişmeden önce uygulanan Epo grubunda (Epo grubu) NEK insidansının %4.6, Epo tedavisi verilmeyen veya NEK geliştikten sonra Epo verilen grupta (kontrol grubu) ise %10.8 olduğu görülmüştür. Juul ve arkadaşları (103), ≤ 28 hafta ve ≤ 1000 gr preterm bebeklere hayatın ilk gününden itibaren üç gün süreyle 500, 1000, 2500 Ü/kg iv Epo tedavisi uygulamışlardır. Nöroprotektif düzeye 1000 ve 2500 Ü/kg dozu ile ulaşıldığı ve yan etki görülmediği bildirilmiştir. Orta-ağır HİE'li 167 term hastayı içeren bir çalışmada, Epo'nun nöroprotektif etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada, postnatal <48 saatte, 52 hastaya 300 Ü/kg, 31 hastaya 500 Ü/kg dozunda, gün aşırı, iki hafta süreyle Epo tedavisi verilmiştir. On sekiz aylıkken değerlendirilen hastalarda ölüm veya orta-ağır derecede sakatlık görülme oranı kontrol grubunda %43.8 iken; Epo grubunda %24.6 saptanmıştır. Epo'nun iki dozu arasında fark görülmezken; orta derecede HİE'li hastalarda yararının olduğu sonucuna varılmıştır (104). Yine HİE'li hastalara doğumdan sonra ilk altı saat içinde 2500 Ü/kg dozunda subkutan Epo tedavisi verilen bir başka çalışmada; Epo verilen grupta konvülsiyonun daha az, EEG'de düzelmenin daha fazla olduğu, NO düzeyinin anlamlı olarak azaldığı, postnatal altıncı ayda nörolojik bozukluk ve hastaneye tekrar yatışın daha az görüldüğü ancak kraniyal MR bulgularında anlamlı farklılığın olmadığı saptanmıştır

(71). Rayjada ve arkadaşları (105), postnatal dört haftadan önce Epo tedavisi verilen preterm hastalarda, BPD insidansının daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Erişkinlerde uygulanan Epo tedavisine bağlı hipertansiyon, konvülsiyon, tromboz, polistemi, anti-Epo antikörlerine sekonder eritrosit aplazisi ve ölüm görüldüğü belirtilmiştir. Yenidoğanlarda yapılan prospektif randomize çalışmalarda, iki haftadan birkaç aya kadar, 35-750 Ü/kg dozunda uygulanan Epo tedavilerinin hiçbirinde strok, tromboz, kanama ve ölüm riskinde artış rapor edilmemiştir (13).

Yukarıda bahsedildiği gibi birçok hastalıkta etkinliği gösterilen, klinik uygulamasına da başlanan ve yan etkisi görülmeyen, antisisitotoksik, antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuvar, antinitrözatif etkilerinden yola çıkarak; bilirubin nörotoksitesisi oluşturduğumuz primer astrosit hücre kültürü deneyimizde Epo'yu kullandık.

Bilirubin nörotoksitesisinin altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar yıllardır süren araştırmalara rağmen hala tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte; birçok mekanizma ile açıklanmaya çalışılmıştır. Hücre zarının yapısında bozulma ve fosfolipid asimetri kaybı gibi morfolojik değişiklikler, mitokondri zarı ve sinir hücrelerinde lipid akıcılığının, protein sıralanmasının ve redoks dengesinin bozulması ile mitokondrial şişme ve geçirgenlik artışı, hücre enerji metabolizmasında bozulma, Na-K ATPaz gibi hücre zarı taşıma sistemlerinin bozulması, glutamat salınım ve geri alımının bozulmasına bağlı eksitotoksisite, artmış oksidatif stres, NO ve inflamasyon sonucunda hücre nekroz ya da apoptoz ile ölüme gitmektedir (2-12).

Gelişmekte olan nöronlara bilirubin maruziyeti nöronal hipoplazi/atrofi, hücre ölümü, arborizasyonda azalma ve gelişimde duraklamaya yol açmaktadır (80). Bilirubine bağlı toksisite hücrenin şişmesi, vakuol formasyonunun oluşması, plazma membran bütünlüğünün bozulması ve hücre içi bileşiklerin dışarıya salınmasıyla karakterizedir (15). Nöronal hücre ölümünde asıl mekanizma kalsiyum dengesinin bozulmasıdır. Sarılıklı gunn ratlarda bilirubin, kalsiyum ve kalmodulin bağlı protein kinaz-2 (CaM kinaz 2) aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (106). CaM kinaz-2 nörotransmitter salınımı, kalsiyumu düzenleyen iyon iletkenliğindeki değişim, nöron iskelet dinamikleri gibi birçok önemli nöronal fonksiyonlarda rol

oyunmaktadır (107). Plazma membran hasarı, enzimlerin salınımı, glutamat alımının bozulması, mitokondriyal membran hasarı ve hücrel enerji metabolizmasının bozulması sonucunda apoptozis ve nekroz gelişerek hücre ölümü gerçekleşmektedir (108). Çalışmamızda bilirübine bağlı apoptotik hücre ölümü TUNEL boyama yöntemiyle değerlendirildi. Astrosit hücre kültüründe 50 µM konsantrasyonda indirekt bilirübünün, kontrol grubuna göre yaklaşık 50 kat fazla apoptozis oluşturduğu ve 2.5 IU/ml konsantrasyonda Epo'nun profilaktik ve tedavi edici olarak kullanılması ile apoptozisin azaldığı saptandı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, bilirübünün hücre canlılığını yaklaşık %75 oranında azalttığı; profilaktik ve tedavi edici olarak uygulanan Epo'nun hücre canlılığını arttırdığı gösterildi. Hücre ölümünün değerlendirilmesinde canlı olmayan hücrelerden salınmış olan LDH aktivitesi de kullanılabilir. Toksik maruziyetten sonra apoptotik hücrelerin sayısına paralel olarak LDH salınımında artış beklenmektedir (9). Önceki çalışmalarda MAPK ileti yolunun, farklı stimuluslar ile astrosit hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak Fernandes ve arkadaşları (109), bilirübin uyguladıkları astrosit rat kültürü çalışmasında beklenenin aksine bir sonuca ulaşmışlardır. Bu çalışmada MAPK ailesinin üç alt grubu olan JNK1/2, ERK1/2 ve p38 kinazın spesifik inhibitörlerini kullanmışlardır. Profilaktik olarak verdikleri JNK1/2 ve ERK1/2 inhibitörlerinin LDH salınımını azalttığı; p38 kinaz inhibitörünün ise LDH salınımını 1.9 kat arttırdığı; p38 inhibitörünün dozu arttırıldığında LDH miktarının daha da arttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak, profilaktik uygulanan Epo'nun LDH düzeyini 1.2 kat arttırdığını gördük. Profilaktik Epo'nun, p38 kinaz yolağını kullanarak LDH düzeyini arttırmış olabileceğini düşündük.

Bilirübünün sitotoksik ve apoptotik etkisinin yanında; eksitotoksite, oksidatif stres, inflamasyon, nitrozatif etkiyle de nöronal hasar yaptığı birçok çalışmada gösterilmiştir.

Bilirübin, mitokondride oksidatif fosforilasyonu inhibe etmektedir. Hücrede enerjinin azalması ve mitokondride elektron transportunun inhibisyonu sonucunda nöronal membranlar depolarize olmaktadır. NMDA kanallarının açılması kolaylaşmakta ve NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasıyla eksitotoksik hasar ortaya

çıkılmaktadır. Glutamatın artışıyla birlikte hücreye kalsiyum, sodyum, klor ve su girişinin artmasıyla hücre şişmekte; organeller parçalanmakta; membran bütünlüğü bozulmakta; apoptozis ve nekroz gelişmektedir. Bu mekanizma üzerine farklı sonuçlar bildirilmiştir (6,7,110). Mc Donald ve Grojean'ın yaptığı iki ayrı çalışmada (6,7), NMDA kanal antagonisti olan MK-801'in bilirubin nörotoksitesine karşı koruyucu etkili olduğu gösterilirken; Shapiro ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (110), ise MK-801'in nöroprotektif etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Yazarlar, çalışma sonucunda bilirubin nörotoksitesinin NMDA reseptör aktivasyonu aracılığıyla olmadığını, diğer mekanizmalar üzerinde durulması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Oksidatif stres, prooksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması sonucu reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkması olarak tanımlanmıştır. Aerobik organizmalar serbest radikalleri yok edecek antioksidan sistemlere sahiptirler. Antioksidanlar SOD, katalaz, GPx, vitamin A-C-E, beta karoten, lipoik asit ve glutatyondur. Mitokondrinin enerji üretim mekanizmasına verilen herhangi bir hasar ve antioksidan sistemin zayıflamasına neden olan bir durum reaktif oksijen türlerinin birikmesiyle sonuçlanır. Bu da lipid, protein, polisakkaridlerin oksidasyonu ve DNA hasarına yol açar (111). Düşük düzeylerde antioksidan özellikte olan bilirubin yüksek düzeylerde oksidatif etkinlikte olduğu görülmüştür. Bilirubin kortikal sinaptozom membranında lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve serbest radikalleri arttırarak oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir. Bu olaylar GSH/GSSG oranının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (3). Bilirubine maruz kalan nöronlarda NADPH ve sistein azalmasına sekonder GSH'de azalma görülmektedir. Hücresel GSH'nin öncüsü olan N-asetil sistein verilen ratlarda, bilirubin indüklediği oksidasyonun azaldığı gösterilmiştir (75). Glukoursodeoksikolik asit, redoks mekanizmasındaki değişiklikleri ortadan kaldırarak bilirubine bağlı nöron hasarını önlemektedir (19). Ayrıca glukoursodeoksikolik asitin, bilirubin zararlı etkisinden nöron plastisitesini koruduğu, bilirubine bağlı NO ve glutamat salınımını azaltarak apoptozisi önlediği de yakın zamanda bildirilmiştir (10). Hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda hasardan sonra uygulanan 1000 Ü/kg Epo'nun lipid peroksidasyon indeksi olan TBARS'ı azalttığı, glutatyon peroksidazı arttırdığı ancak SOD'a etki etmediği görülmüştür. Epo, lipid peroksidasyonu inhibe

ederek ve eritrositlerde GPx aktivitesi ile sitozolik katalazı düzenleyerek oksidatif hasara karşı koruyucu etki göstermektedir (68). Etanol verilerek beyin hasarı oluşturulan in vivo bir çalışmada, etanolden 24 saat sonra uygulanan 1000 Ü/kg Epo'nun nöron sayısını arttırdığı, apoptozisi azalttığı, GPx'i arttırdığı, SOD'u etkilemediği görülmüştür (112). Hiperoksiye bağlı oksidatif stres oluşturulan rat beyinde, 20000 Ü/kg dozunda verilen Epo'nun 12-48. saatte redükte glutatyon düzeyini anlamlı olarak arttırdığı, okside glutatyonu azalttığı; 24-48. saatte MDA düzeyini anlamlı olarak azalttığı rapor edilmiştir. Epo'nun, hiperoksinin indüklediği beyin hasarında oksidatif stresi azaltarak koruyucu etkili olduğu sonucuna varılmıştır (113). Bizim çalışmamızda da Epo'nun katalaz, GPx aktivitesini ve glutatyon düzeyini arttırdığı; ancak SOD ve MDA düzeyine anlamlı etkisinin olmadığı görüldü. İskemi-reperfüzyon modeli ile akciğer hasarı oluşturulan ratlarda yapılan erişkin deneyinde, Epo'nun dozu arttırıldığında MDA düzeyine etkisinin olmadığı gösterilmiştir (114). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, tauroursodeoksikolik asit, pirazolinominosiklin ve minosiklinin lipid peroksidasyonu azalttığı, ancak minosiklin dışındaki diğer iki ilacın bilirubin nörotoksitesini önlemediği saptanmış ve lipid peroksidasyonun bilirubin nörotoksitesinde primer mekanizma olmadığı belirtilmiştir (115). Epo'nun lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyine etkili olmamasının, uygulama zamanı ve dozdan kaynaklanabileceğini düşündük.

Önceki çalışmalarda bilirubinün nöron, astrosit ve mikroglialardan MAPK ve NF-κB sinyal yolunun aktivasyonu ile TNF-α, IL-1β, IL-6 gibi proinflatuar sitokinlerin salınımına neden olduğu gösterilmiştir. TNF-α, hem nörotoksik hem de nöroprotektif, IL-1β nörotoksik, IL-6 nöroprotektif etki göstermektedir. TNF-α, TNFR1 ile, IL-1β ise IL-1 reseptörü aracılığıyla etkili olmaktadır (38). Fernandes ve arkadaşları (9), lipopolisakkarit ve bilirubin ile inflamasyon oluşturdukları astrosit kültüründe TNF-α ve IL-1β'nin arttığını, IL-6'nın azaldığını belirtmişlerdir. Astrositler SSS'nin inflamasyona verdiği cevapta anahtar rol oynayan hücrelerdir. İnflatuar uyarıdan sonraki 3-6 saat içinde astrositler tarafından sitokin üretimi başlamakta ve 24 saatte maksimum düzeye ulaşmaktadır (2). Beyin dokusu, hasara immün yanıt göstererek cevap vermekte ve inflammatuar mediatörler salınmaktadır. IL-1β ve TNF-α ilk salgılanan sitokinler olup; mikroglia, astrosit ve nöronlar tarafından sentezlenmekte ve sekrete edilmektedir. IL-1β düzeyi hasardan 6-12 saat

sonra pik yapmaktadır (1,2). Hipoksik-iskemik hasardan 24 saat sonra, 5 Ü/g dozunda üç gün süreyle uygulanan Epo'nun lökosit infiltrasyonunu ve IL-1 β düzeyini azalttığı, TNF- α 'yı etkilemediği gösterilmiştir (116). Fernandes ve arkadaşlarının in vitro rat çalışmasında (2), bilirubin uygulandıktan 15 dk gibi kısa bir sürede TNFR1'in saptandığı, 1. ve 12. saatte pik yaptığı görülmüştür. Aynı çalışmada TNF- α 'nın bilirubin uygulanmasından iki saat sonra arttığı ve 24. saate kadar bu artışın devam ettiği belirtilmiştir. IL-1 β düzeyinin ise 4. saatten sonra artmaya başladığı ve 24. saate kadar devam ettiği görülmüştür. IL-1 β ve TNF- α 'nın aksine, IL-6'nın daha geç olarak 18. saatte pik yaptığı belirtilmiştir. Antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın dört saatlik bilirubin maruziyetinden sonra suprese olduğu gösterilmiştir. Bunun tersine, daha uzun süreli bilirubin uygulanmasının IL-6 sekresyonunu önemli derecede arttırdığı ifade edilmiştir. IL-6'nın geç salınımının, bilirubin direkt etkisinden ziyade, artmış olan IL-1 β ve TNF- α nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Hipoksik-iskemik hasardan 24 saat sonra, 5 Ü/g dozunda üç gün uygulanan Epo'nun lökosit infiltrasyonunu ve IL-1 β düzeyini azalttığı, TNF- α 'yı etkilemediği gösterilmiştir (116). Serebral iskemiden hemen sonra verilen 5000 Ü/kg Epo'nun IL-6, TNF- α ve MCP-1'i azalttığı bildirilmiştir (60). Bir başka çalışmada, Epo'nun, hiperoksinin indüklediği hücre ölümünü, IL-1 β , IL-18 ve matrix metalloproteinazı azaltarak engellediği gösterilmiştir (117). LPS ile beyaz cevher hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarına verilen Epo'nun IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'yı azalttığı gösterilmiştir (118). Primer astrosit kültüründe bilirubin maruziyeti ile nörotoksisite oluşturduğumuz çalışmamızda, 2.5 IU/ml dozda uyguladığımız Epo'nun antiinflamatuvar etkinliği 24. saatte değerlendirildi. Epo'nun hem profilaktik hem de tedavi edici olarak verildiğinde IL-6 ve TNF- α düzeyini azalttığı görüldü.

MAPK ailesi p38 kinaz, JNK1/2 ve ERK1/2 olmak üzere üç alt sınıftan oluşmaktadır. p38 kinaz ve JNK1/2 yolları çevresel stres ve inflamatuvar sitokinlerle aktive olmaktadır. p38 kinaz inflamatuvar cevapta kritik öneme sahipken; JNK1/2 fosforilasyonu ise proglamlanmış hücre ölümü ile ilişkilendirilmektedir. ERK1/2 yolağı esas olarak mitojenler ve büyüme faktörleriyle uyarılmakla birlikte; hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve yaşamasında major rol oynamaktadır. MAPK etkisini, NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu aracılığıyla göstermektedir. NF- κ B de inflamatuvar süreçte rol oynayan bir moleküldür. TNF- α ve

IL-6'nın sekresyonu için MAPK'nin üç alt sınıfının da aktivasyonu gerekmektedir; IL-1 β sekresyonu için JNK1/2 ve ERK1/2'nin aktivasyonu yeterlidir. Fernandes ve arkadaşlarının astrosit kültüründe yaptıkları bir çalışmada (109), 50 μ M bilirubin uyardığı JNK1/2 fosforilasyonu ve ERK1/2 aktivasyonunun, farmakolojik JNK1/2 ve ERK1/2 inhibitörleriyle engellendiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada ilginç olarak p38 kinaz inhibitörünün, bilirubin indüklediği p38 fosforilasyonunu azaltmadığı görülmüştür. ERK1/2 ve JNK1/2 inhibitörleriyle bilirubine bağlı IL-1 β salınımını azalttığı görülürken; p38 kinaz inhibitörünün IL-1 β sekresyonunu arttırdığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda da profilaktik olarak verilen Epo'nun IL-1 β düzeyini belirgin olarak arttırdığı görüldü. Bilirubin grubunda IL-1 β düzeyi, kontrol grubuna göre düşük bulundu. Bunun sebebinin, 6-12. saatte pik yapan IL-1 β düzeyinin düşmeye başlayarak 24. saatte bazal değerlere yakın olması nedeniyle olabileceğini düşündük. Bilirubin nörotoksitesi oluşturulan astrosit hücre kültürü deneyimizde, Epo'nun p38 kinaz yolağını kullanarak IL-1 β düzeyini arttırmış olabileceğini düşündük.

Bilirubin postsinaptik nöronda NMDA subtip glutamat reseptörünü uyarması sonucu nöronal NO sentaz ekspresyonu, NO sentezi ve nitrit üretimi artmaktadır. NO yapımının artması protein oksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve bunun sonucunda enerji eksikliği, glutasyon azalması, apoptozis ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Önceki çalışmalarda inflamasyonun, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretiminin artmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, bilirubin indüklediği nöronal oksidatif hasarda NO'nun anahtar mediatör olduğu anlaşılmaktadır (11,12). NOS inhibitörü olan L-NAME uygulandıktan sonra bilirubin nörotoksitesinin azaldığı gösterilmiştir (119). Genç ve arkadaşları (61), LPS ve IFN- γ ile inflamasyon oluşturmadan önce uygulanan Epo'nun, NOS mRNA ekspresyonunu ve nitrit düzeyini anlamlı olarak azalttığını bildirmişlerdir. Otoimmün ensefalomyelit modeli oluşturulan bir çalışmada, Epo tedavisinin inflamatuvar infiltrasyonu ve demyelinizasyonu anlamlı olarak azalttığı ve nörolojik fonksiyonları düzelttiği rapor edilmiştir (59). Hipoksik-iskemik beyin hasarı oluşturulan ratlarda NO'nun arttığı ve kritik rol oynadığı gösterilmiştir. Buradan yola çıkılarak yapılan bir çalışmada, hipoksiden hemen sonra 1000 Ü/kg dozunda verilen Epo'nun NO üretimini azalttığı belirtilmiştir (120). Çalışmamızda profilaktik ve tedavi edici

olarak uygulanan Epo'nun, NO sentezini azaltarak total nitrat/nitrit miktarını azalttığı gösterildi.

Primer astrosit hücre kültüründe bilirubin nörotoksitesisi oluşturduğumuz çalışmamızda, 50 µM dozunda bilirubin ile sitotoksitesite, apoptozis, nitrozatif etki ve inflamasyonda artış, antioksidan belirteçlerde düşme olduğunu; profilaktik ve tedavi edici olarak 2.5 IU/ml dozda uyguladığımız Epo'nun antisitotoksik, antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuvar ve antinitrozatif etkileriyle bilirubine bağlı nöron hasarını azalttığını gösterdik. Ayrıca Epo'nun, p38 kinaz yolağını kullanarak IL-1β düzeyini arttırmış olabileceğini düşündük. Profilaktik olarak uygulanan Epo'nun yine p38 kinaz yolu ile LDH aktivitesini arttırmış olabileceğini; tedavi edici Epo'nun ise LDH aktivitesini azalttığını saptadık. Bilirubine bağlı oluşan nöron hasarında görülen lipid peroksidasyonuna, 2.5 IU/ml dozunda Epo'nun etkisinin olmadığını ve lipid peroksidasyonunun bilirubin nörotoksitesisinde primer mekanizma olmadığını düşünmekteyiz. Bu çalışma, bilirubin nörotoksitesisi oluşturulan primer astrosit hücre kültüründe Epo'nun nöroprotektif etkinliğinin gösterildiği ilk çalışmadır. Birçok mekanizmayla nöron koruyucu etkinliğe sahip olan Epo'nun, akut ve kronik bilirubin nörotoksitesisinde terapötik ajan olarak kullanılmadan önce daha çok çalışmanın yapılması gerektiğine inanıyoruz.

SONUÇLAR

1- Astrosit hücre kültüründe 0.5-1000 μM konsantrasyonlarda uygulanan indirekt bilirübinin, konsantrasyonu arttıkça astrosit hücre ölümünü arttırdığı; canlı hücre oranının 0.5 μM konsantrasyonda en yüksek (%96.8), 1000 μM konsantrasyonda en düşük (%13.2) olduğu saptandı. Astrosit hücrelerinin %50'sine toksik etkili olan indirekt bilirübin konsantrasyonu (TC_{50}) 50 μM olarak saptandı. Apoptozis, sitotoksisite değerlendirilmesinde, katalaz, SOD, GPx, LDH aktivite ölçümünde ve glutasyon, MDA, total nitrit/nitrat, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzey ölçümünde bu konsantrasyon kullanıldı.

2- Hücre canlılığını %100 arttıran Epo konsantrasyonu 2.5 IU/ml olarak belirlendi. Apoptozis, sitotoksisite değerlendirilmesinde, katalaz, SOD, GPx, LDH aktivite ölçümünde ve glutasyon, MDA, total nitrit/nitrat, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzey ölçümünde bu konsantrasyon kullanıldı.

3- Başlangıçtan 72 saat sonra canlı hücre oranının kontrol grubunda 100.00 ± 0.50 'ye ulaştığı, bilirübin grubunda yaklaşık %75 oranda azaldığı (27.05 ± 0.26) görüldü ($p=0.000$). Canlı hücre oranı Epo + bilirübin grubunda 66.62 ± 1.91 , bilirübin + Epo grubunda 48.34 ± 5.07 olup; Epo'nun profilaktik kullanımında daha belirgin olmak üzere, hem profilaktik hem tedavi edici olarak uygulanmasıyla nöroprotektif etkili olduğu görüldü ($p=0.001$, $p=0.018$).

4- Uygulamadan 24 saat sonra değerlendirilen apoptozisin, bilirübin grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 50 kat arttığı (1.04 ± 0.11 'e karşılık 51.10 ± 1.15) ($p=0.000$) görüldü. Profilaktik kullanımında daha belirgin olmak üzere, Epo'nun hem profilaktik (28.72 ± 0.29) ($p=0.000$), hem de tedavi edici (36.13 ± 0.42) ($p=0.001$) olarak kullanılmasının apoptozisi belirgin azalttığı görüldü.

5- Bilirübinin katalaz aktivitesini (3.83 ± 0.12 U/mg), kontrol grubunun katalaz aktivitesine (8.74 ± 0.15) göre belirgin azalttığı ($p=0.000$); Epo'nun hem profilaktik (4.91 ± 0.23 U/mg) ($p=0.005$), hem tedavi edici (5.00 ± 0.24 U/mg) ($p=0.005$) olarak uygulanmasının katalaz aktivitesini belirgin arttırdığı saptandı. Epo'nun profilaktik ve tedavi edici olarak uygulanmasının katalaz aktivitesine etkisi benzerdi ($p=0.66$).

6- Bilirübinin glutasyon düzeyini ($3.96 \pm 0.16 \mu\text{M}$), kontrol grubunun glutasyon düzeyine ($15.35 \pm 0.34 \mu\text{M}$) göre belirgin azalttığı ($p=0.000$); Epo'nun profilaktik ($12.20 \pm 0.05 \mu\text{M}$) ($p=0.000$) ve tedavi edici ($9.49 \pm 0.29 \mu\text{M}$) ($p=0.000$) olarak uygulanmasıyla glutasyon düzeyinin belirgin arttığı saptandı. Profilaktik olarak verilen Epo'nun, glutasyon düzeyini tedavi edici olarak uygulanan Epo'dan daha fazla arttırdığı görüldü ($p=0.003$).

7- Bilirübinin GPx aktivitesini ($0.42 \pm 0.03 \text{ U/mg}$), kontrol grubunun GPx aktivitesine (0.82 ± 0.01) göre belirgin azalttığı ($p=0.001$); Epo'nun hem profilaktik ($0.64 \pm 0.02 \text{ U/mg}$) ($p=0.001$) hem de tedavi edici ($0.58 \pm 0.02 \text{ U/mg}$) ($p=0.002$) olarak uygulanmasının GPx aktivitesini belirgin arttırdığı saptandı. Profilaktik Epo'nun GPx aktivitesini, tedavi edici olarak uygulanan Epo'dan daha fazla arttırdığı görüldü ($p=0.04$).

8- Grupların SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).

9- Bilirübinin total nitrat/nitrit düzeyini ($11.05 \pm 0.93 \mu\text{M}$), kontrol grubunun total nitrat/nitrit düzeyine ($5.63 \pm 0.62 \mu\text{M}$) göre yaklaşık iki kat arttırdığı ($p=0.001$); Epo'nun hem profilaktik ($8.60 \pm 0.61 \mu\text{M}$) ($p=0.007$), hem de tedavi edici ($8.13 \pm 0.65 \mu\text{M}$) ($p=0.013$) olarak uygulanmasının total nitrat/nitrit düzeyini belirgin azalttığı görüldü. Profilaktik ve tedavi edici olarak uygulanan Epo'nun total nitrat/nitrit düzeyini azaltıcı etkisi benzerdi ($p=0.41$).

10- Epo ($22.85 \pm 0.19 \text{ pg/ml}$), Epo + bilirübin ($593.60 \pm 2.97 \text{ pg/ml}$) ve bilirübin + Epo ($20.47 \pm 0.82 \text{ pg/ml}$) gruplarındaki IL-1 β düzeyinin bilirübin grubuna ($2.95 \pm 0.05 \text{ pg/ml}$) göre belirgin olarak yüksek olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$). Epo + bilirübin grubundaki IL-1 β düzeyi Epo ve bilirübin + Epo gruplarından belirgin olarak yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.000$).

11- Bilirübinin IL-6 düzeyini ($82.92 \pm 1.68 \text{ pg/ml}$), kontrol grubunun IL-6 düzeyine ($27.38 \pm 0.46 \text{ pg/ml}$) göre yaklaşık üç kat arttırdığı ($p=0.000$); Epo'nun profilaktik ($70.64 \pm 0.50 \text{ pg/ml}$) ($p=0.004$) ve tedavi edici ($45.35 \pm 1.12 \text{ pg/ml}$) ($p=0.000$) olarak

uygulanmasının IL-6 düzeyini belirgin azalttığı saptandı. Tedavi edici olarak verilen Epo'nun IL-6 düzeyini, profilaktik Epo'dan daha fazla azalttığı görüldü (p=0.000).

12- Bilirübinin TNF- α düzeyini (535.73 ± 3.04 pg/ml), kontrol grubunun TNF- α düzeyine (326.30 ± 3.23 pg/ml) göre iki kat arttırdığı (p=0.000); Epo'nun hem profilaktik (380.07 ± 5.07 pg/ml) (p=0.000), hem de tedavi edici (484.72 ± 2.03 pg/ml) (p=0.000) olarak uygulanmasının TNF- α düzeyini belirgin azalttığı saptandı. Profilaktik Epo'nun TNF- α düzeyini, tedavi edici olarak uygulanan Epo'dan daha fazla azalttığı görüldü (p=0.000).

13- Epo (54.59 ± 1.01 μ U/ml) ve Epo + bilirübin (52.62 ± 1.08 μ U/ml) gruplarındaki LDH aktivitesi bilirübin grubundan yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla p=0.000, p=0.001). Bilirübin + Epo (36.48 ± 0.74 μ U/ml) grubundaki LDH aktivitesi bilirübin (41.73 ± 0.58 μ U/ml) grubundan düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0.001). Profilaktik Epo'nun LDH aktivitesini arttırdığı (p=0.001); tedavi edici Epo'nun ise LDH aktivitesini azalttığı görüldü (p=0.001).

14- Grupların MDA düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı (p> 0.05).

KAYNAKLAR

1. Brites D. The evolving landscape of neurotoxicity by unconjugated bilirubin: role of glial cells and inflammation. *Front Pharmacol* 2012; 3: 88.
2. Fernandes A, Falcão AS, Silva RF, Gordo AC, Gama MJ, Brito MA, et al. Inflammatory signalling pathways involved in astroglial activation by unconjugated bilirubin. *J Neurochem* 2006;96:1667-79.
3. Brito MA, Brites D, Butterfield DA. A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes. *Brain Res* 2004;1026:33-43.
4. Hoffman DJ, Zanelli SA, Kubin J, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. The in vivo effect of bilirubin on the N-methyl-D-aspartate receptor/ion channel complex in the brains of newborn piglets. *Pediatr Res* 1996;40:804-8.
5. Grojean S, Lievre V, Koziel V, Vert P, Daval JL. Bilirubin exerts additional toxic effects in hypoxic cultured neurons from developing rat brain by the recruitment of glutamate neurotoxicity. *Pediatr Res* 2001;49:507-13.
6. McDonald 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.
7. 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.
8. Rodrigues CM, Sola S, Brito MA, Brites D, Moura JJ. Bilirubin directly disrupts membrane lipid polarity and fluidity, protein order, and redox status in rat mitochondria. *J Hepatol* 2002;36:335-41.
9. Fernandes A, Silva RF, Falcão AS, Brito MA, Brites D. Cytokine production, glutamate release and cell death in rat cultured astrocytes treated with unconjugated bilirubin and LPS. *J Neuroimmunol* 2004;153:64-75.
10. Silva SL, Vaz AR, Diógenes MJ, van Rooijen N, Sebastião AM, Fernandes A, et al. Neuritic growth impairment and cell death by unconjugated bilirubin is mediated

by NO and glutamate, modulated by microglia, and prevented by glyoursodeoxycholic acid and interleukin-10. *Neuropharmacology* 2012;62:2398-408.

11. Brito MA, Vaz AR, Silva SL, Falcão AS, Fernandes A, Silva RF, et al. N-methyl-aspartate receptor and neuronal nitric oxide synthase activation mediate bilirubin-induced neurotoxicity. *Mol Med* 2010;16:372-80.

12. Vaz AR, Silva SL, Barateiro A, Fernandes A, Falcão AS, Brito MA, et al. 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.

13. Kumral A, Tüzün F, Oner MG, Genç S, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin in neonatal brain protection: the past, the present and the future. *Brain Dev* 2011;33:632-43.

14. Bartesaghi S, Marinovich M, Corsini E, Galli CL, Viviani B. Erythropoietin: a novel neuroprotective cytokine. *Neurotoxicology* 2005;26:923-8.

15. Silva RF, Rodrigues CM, 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.

16. 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.

17. Geiger AS, Rice AC, Shapiro SM. Minocycline blocks acute bilirubin-induced neurological dysfunction in jaundiced Gunn rats. *Neonatology* 2007;92:219-26.

18. 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.

- 19.** Brito MA, Lima S, Fernandes A, Falcão AS, Silva RF, Butterfield DA, et al. Bilirubin injury to neurons: contribution of oxidative stress and rescue by glycoconjugate deoxycholic acid. *Neurotoxicology* 2008;29:259-69.
- 20.** Zhang B, Yang X, Gao X. Taurine protects against bilirubin-induced neurotoxicity in vitro. *Brain Res* 2010;1320:159-67.
- 21.** Ye HB, Wang J, Zhang WT, Shi HB, Yin SK. Taurine attenuates bilirubin-induced neurotoxicity in the auditory system in neonatal guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013;77:647-54.
- 22.** 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.
- 23.** Becerir C, Kılıç I, Sahin O, Ozdemir O, Tokgün O, Ozdemir B, et al. The protective effect of docosahexaenoic acid on the bilirubin neurotoxicity. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2013;28:801-7.
- 24.** Şahin Ö. Bilirubin sitotoksitesi oluşturulan yenidoğan rat astrosit hücre kültüründe ginkgo bilobanın etkisinin araştırılması (Yan Dal Uzmanlık Tezi). Denizli: Pamukkale Üniversitesi; 2012.
- 25.** Kaplan M, Wong RJ, Sibley E, Stevenson DK. Neonatal jaundice and liver disease. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. *Neonatal-perinatal medicine diseases of the fetus and infant*. 9th ed. St. Louis: Elsevier Saunders 2011:1443-81.
- 26.** Fahri Ovalı. İndirekt Hiperbilirubinemi. In: Dağoğlu T, Ovalı F, eds. *Neonatoloji*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi 2007:517-36.
- 27.** Rennie J, Burman-Roy S, Murphy MS. Neonatal jaundice: summary of NICE guidance. *BMJ* 2010;340:c2409.
- 28.** Watchko JF. Neonatal indirect hyperbilirubinemia and kernicterus. In: Gleason CA, Devaskar SU, eds. *Avery's diseases of the newborn*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders 2012:1123-42.

- 29.**Ahdab-Barmada M, Moossy J. The neuropathology of kernicterus in the premature neonate: diagnostic problems. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984;43:45-56.
- 30.**Rubin RA, Balow B, Fisch RO. Neonatal serum bilirubin levels related to cognitive development at ages 4 through 7 years. *J Pediatr* 1979;94:601-4.
- 31.**Mollison PL, Cutbush M. Haemolytic disease of the newborn. In: Gardner K, ed. *Recent advances in pediatrics*. London: J&A Churchill 1954:110-32.
- 32.**Soorani-Lunsing I, Woltil HA, Hadders-Algra M. Are moderate degrees of hyperbilirubinemia in healthy term neonates really safe for the brain? *Pediatr Res* 2001;50:701-5.
- 33.**Jangaard KA, Fell DB, Dodds L, Allen AC. Outcomes in a population of healthy term and near-term infants with serum bilirubin levels of ≥ 325 micromol/L (≥ 19 mg/dL) who were born in Nova Scotia, Canada, between 1994 and 2000. *Pediatrics* 2008;122:119-24.
- 34.**Watchko JF. Kernicterus and the molecular mechanisms of bilirubin-induced CNS injury in newborns. *Neuromolecular Med* 2006;8:513-29.
- 35.**Silva RF, Rodrigues CM, 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.
- 36.**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.
- 37.**Oakden WK, Moore AM, Blaser S, Noseworthy MD. ¹H MR spectroscopic characteristics of kernicterus: a possible metabolic signature. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005;26:1571-4.
- 38.**Fernandes A, Barateiro A, Falcão AS, Silva SL, Vaz AR, Brito MA, et al. Astrocyte reactivity to unconjugated bilirubin requires TNF- α and IL-1 β receptor signaling pathways. *Glia* 2011;59:14-25.

- 39.**Silva RF, Falcão AS, Fernandes A, Gordo AC, Brito MA, Brites D. Dissociated primary nerve cell cultures as models for assessment of neurotoxicity. *Toxicol Lett* 2006;163:1-9.
- 40.**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.
- 41.**Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 2003;228:1-14.
- 42.**Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR. Liver as the primary site of erythropoietin production in the fetus. *J Lab Clin Med* 1977;89:640-4.
- 43.**Koury ST, Bondurant MS, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 1988;71:524-37.
- 44.**Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977;252:5558-64.
- 45.**Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7580-4.
- 46.**Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806-10.
- 47.**Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 1987;316:73-8.
- 48.**Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992;72:449-89.
- 49.**Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1775-93.

- 50.**Yoshimura A, Misawa H. Physiology and function of the erythropoietin receptor. *Curr Opin Hematol* 1998;5:171-6.
- 51.**Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;64:159-71.
- 52.**Langer J, Obladen M, Dame C. Urinary loss of erythropoietin after intravenous versus subcutaneous epoetin-beta in preterm infants. *J Pediatr* 2008;152:728-30.
- 53.**Widness JA. Treatment and prevention of neonatal anemia. *Neoreviews* 2008;9:526-33.
- 54.**Aher SM, Ohlsson A. Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2012 Oct 17;10:CD004865. doi: 10.1002/14651858.
- 55.**Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. Erythropoietin and oxidative stress. *Curr Neurovasc Res* 2008;5:125-42.
- 56.**Kumral A, Genc S, Ozer E, Yilmaz O, Gokmen N, Koroglu TF, et al. Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biol Neonate* 2006;89:205-10.
- 57.**Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Villa P, Ghezzi P, Garau A, et al. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 2005;93:412-21.
- 58.**Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 2002;106:2973-9.
- 59.**Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, et al. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2002;952:128-34.

- 60.** Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 2003;198:971-5.
- 61.** Genc K, Genc S, Baskin H, Semin I. Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes. *Physiol Res* 2006;55:33-8.
- 62.** Byts N, Siren AL. Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Exp Transl Stroke Med* 2009;1:1-10.
- 63.** Weber A, Maier RF, Hoffmann U, Grips M, Hoppenz M, Aktas AG, et al. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res* 2002;958:305-11.
- 64.** Födinger M, Fritsche-Polanz R, Buchmayer H, Skoupy S, Sengoelge G, Hörl WH, et al. Erythropoietin-inducible immediate-early genes in human vascular endothelial cells. *J Investig Med* 2000;48:137-49.
- 65.** Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int* 1995;47:740-5.
- 66.** Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, et al. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem* 1996;239:494-500.
- 67.** Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* 2003;33:891-6.
- 68.** Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, et al. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 2005;87:15-8.
- 69.** Iwai M, Stetler RA, Xing J, Hu X, Gao Y, Zhang W, et al. Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke* 2010;41:1032-7.

- 70.**Kondo A, Shingo T, Yasuhara T, Kuramoto S, Kameda M, Kikuchi Y, et al. Erythropoietin exerts anti-epileptic effects with the suppression of aberrant new cell formation in the dentate gyrus and upregulation of neuropeptide Y in seizure model of rats. *Brain Res* 2009;1296:127-36.
- 71.**Elmahdy H, El-Mashad AR, El-Bahrawy H, El-Gohary T, El-Barbary A, Aly H. Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. *Pediatrics* 2010;125:1135-42.
- 72.**McCarthy KD, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980;85:890-902.
- 73.**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 1989:121-133.
- 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.**Brito MA, Rosa AI, Falcão AS, Fernandes A, Silva RF, Butterfield DA, et al. Unconjugated bilirubin differentially affects the redox status of neuronal and astroglial cells. *Neurobiol Dis* 2008;29:30-40.
- 76.**Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996;44:959-68.
- 77.**Maisels MJ, McDonagh AF. Phototherapy for neonatal jaundice. *N Engl J Med* 2008;358:920–8.
- 78.**Ostrow JD, Pascolo L, Brites D, Tiribelli C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends Mol Med* 2004;10:65-70.
- 79.**Hameed NN, Na'Ma AM, Vilms R, Bhutani VK. Severe neonatal hyperbilirubinemia and adverse short-term consequences in Baghdad, Iraq. *Neonatology* 2011;100:57-63.

- 80.**Johnson L, Bhutani VK. The clinical syndrome of bilirubin-induced neurologic dysfunction. *Semin Perinatol* 2011;35:101-13.
- 81.**Arun Babu T, Bhat B V, Joseph NM. Association between peak serum bilirubin and neurodevelopmental outcomes in term babies with hyperbilirubinemia. *Indian J Pediatr* 2012;79:202-6.
- 82.**Kumral A, Genc S, Genc K, Duman N, Tatli M, Sakizli M, et al. Hyperbilirubinemic serum is cytotoxic and induces apoptosis in murine astrocytes. *Biol Neonate* 2005;87:99-104.
- 83.**Casals-Pascual C, Idro R, Gicheru N, Gwer S, Kitsao B, Gitau E, et al. High levels of erythropoietin are associated with protection against neurological sequelae in African children with cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2634-9.
- 84.**Weber A, Dzierko M, Berns M, Felderhoff-Mueser U, Heinemann U, Maier RF, et al. Neuronal damage after moderate hypoxia and erythropoietin. *Neurobiol Disease* 2005;20:594-600.
- 85.**Liu R, Suzuki A, Guo Z, Mizuno Y, Urabe T. Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *Journal Neurochemistry* 2006;96:1101-10.
- 86.**Kim MS, Seo YK, Park HJ, Lee KH, Lee KH, Choi EJ, et al. The neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin via an antiapoptotic mechanism on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Korean J Pediatr* 2010;53:898-908.
- 87.**Keller M, Yang J, Griesmaier E, Gorna A, Sarkozy G, Urbanek M, et al. Erythropoietin is neuroprotective against NMDA-receptor-mediated excitotoxic brain injury in newborn mice. *Neurobiol Dis* 2006;24:357-66.
- 88.**Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2004;153:77-86.

- 89.**Mikati MA, El Hokayem JA, El Sabban ME. Effects of a single dose of erythropoietin on subsequent seizure susceptibility in rats exposed to acute hypoxia at P10. *Epilepsia* 2007;48:175-81.
- 90.**Fan X, van Bel F, van der Kooij MA, Heijnen CJ, Groenendaal F. Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage. *Pediatr Res* 2013;73:18-23.
- 91.**Fang AY, Gonzalez FF, Sheldon RA, Ferriero DM. Effects of combination therapy using hypothermia and erythropoietin in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 2013;73:12-7.
- 92.**Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, Boerner C, et al. Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol* 2008;64:523-34.
- 93.**Chong ZZ, Lin SH, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *J Neurosci Res* 2003;71:659-69.
- 94.**Yiş U, Kurul SH, Kumral A, Tuğyan K, Cilaker S, Yilmaz O, et al. Effect of erythropoietin on oxygen-induced brain injury in the newborn rat. *Neurosci Lett* 2008;448:245-9.
- 95.**Keogh CL, Yu SP, Wei L. The effect of recombinant human erythropoietin on neurovasculature repair after focal ischemic stroke in neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:521-8.
- 96.**Lee JH, Sung DK, Koo SH, Shin BK, Hong YS, Son CS, et al. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced lung injury by down-modulating inflammation in neonatal rats. *J Korean Med Sci* 2007;22:1042-7.
- 97.**Ozer EA, Kumral A, Ozer E, Yilmaz O, Duman N, Ozkal S, et al. Effects of erythropoietin on hyperoxic lung injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 2005;58: 38-41.

- 98.**Kumral A, Baskin H, Duman N, Yilmaz O, Tatli M, Ozer E, et al. Erythropoietin protects against necrotizing enterocolitis of newborn rats by the inhibiting nitric oxide formation. *Biol Neonate* 2003;84:325-9.
- 99.**Shiou SR, Yu Y, Chen S, Ciancio MJ, Petrof EO, Sun J, et al. Erythropoietin protects intestinal epithelial barrier function and lowers the incidence of experimental neonatal necrotizing enterocolitis. *J Biol Chem* 2011;286:12123-32.
- 100.**McPherson RJ, Juul SE. High-dose erythropoietin inhibits apoptosis and stimulates proliferation in neonatal rat intestine. *Growth Horm IGF Res* 2007;17:424-30.
- 101.**Comim CM, Cassol OJ Jr, Abreu I, Moraz T, Constantino LS, Vuolo F, et al. Erythropoietin reverts cognitive impairment and alters the oxidative parameters and energetic metabolism in sepsis animal model. *J Neural Transm* 2012;119:1267-74.
- 102.**Ledbetter DJ, Juul SE. Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *J Pediatr Surg* 2000;35:178-81.
- 103.**Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA, Ledbetter KJ, Gleason CA, Mayock DE. A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics* 2008;122:383-91.
- 104.**Zhu C, Kang W, Xu F, Cheng X, Zhang Z, Jia L, et al. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2009;124:218-26.
- 105.**Rayjada N, Barton L, Chan LS, Plasencia S, Biniwale M, Bui KC. Decrease in incidence of bronchopulmonary dysplasia with erythropoietin administration in preterm infants: a retrospective study. *Neonatology* 2012;102:287-92.
- 106.**Churn SB, DeLorenzo RJ, Shapiro SM. Bilirubin induces a calcium-dependent inhibition of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity in vitro. *Pediatr Res* 1995;38:949-54.
- 107.**Churn SB. Multifunctional calcium and calmodulin-dependent kinase II in neuronal function and disease. *Adv Neuroimmunol* 1995;5:241-59.

- 108.**Ostrow JD, Pascolo L, Shapiro SM, Tiribelli C. New concepts in bilirubin encephalopathy. *Eur J Clin Invest* 2003;33:988-97.
- 109.**Fernandes A, Falcão AS, Silva RF, Brito MA, Brites D. MAPKs are key players in mediating cytokine release and cell death induced by unconjugated bilirubin in cultured rat cortical astrocytes. *Eur J Neurosci* 2007;25:1058-68.
- 110.**Shapiro SM, Sombati S, Geiger A, Rice AC. NMDA channel antagonist MK-801 does not protect against bilirubin neurotoxicity. *Neonatology* 2007;92:248-57.
- 111.**Perrone S, Negro S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;3:63-5.
- 112.**Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, et al. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Dev Brain Res* 2005;160:146-56.
- 113.**Sifringer M, Brait D, Weichelt U, Zimmerman G, Endesfelder S, Brehmer F, et al. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain Behav Immun* 2010;24:792-9.
- 114.**Wu H, Dong G, Liu H, Xu B, Li D, Jing H. Erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion induced lung injury by inhibiting tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase-9 expression. *Eur J Pharmacol* 2009;602:406-12.
- 115.** Daood MJ, Hoyson M, Watchko JF. Lipid peroxidation is not the primary mechanism of bilirubin-induced neurologic dysfunction in jaundiced Gunn rat pups. *Pediatr Res* 2012;72:455-9.
- 116.**Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 2005;36:1672-8.
- 117.**Sifringer M, Genz K, Brait D, Brehmer F, Löber R, Weichelt U, et al. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of

inflammatory mediators and matrix metalloproteinases. *Dev Neurosci* 2009;31:394-402.

118.Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, et al. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology* 2007;92:269-78.

119.Genc S, Genc K, Kumral A, Baskin H, Ozkan H. Bilirubin is cytotoxic to rat oligodendrocytes in vitro. *Brain Res* 2003;985:135-41.

120.Kumral A, Baskin H, Gokmen N, Yilmaz O, Genc K, Genc S, et al. Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain model in newborn rats: is it an explanation for the protective role of erythropoietin? *Biol Neonate* 2004;85:51-4.