

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

**BİLİRUBİN SİTOTOKSİSİTESİ OLUŞTURULAN
YENİDOĞAN RAT ASTROSİT HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
GİNKGO BİLOBANIN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZLEM ŞAHİN

DANIŞMAN

PROF.DR. HACER ERGİN

DENİZLİ-2012

Prof. Dr. Hacer Ergin danışmanlığında Dr. Özlem Şahin tarafından yapılan “Bilirubin Sitotoksitesisi Oluşturulan Yenidoğan Rat Astrosit Hücre Kültüründe Ginkgo Bilobanın Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez çalışması 13.11.2012 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.

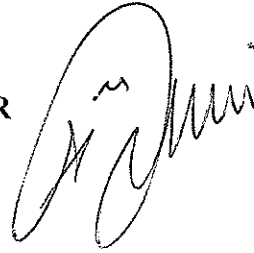
BAŞKAN : Prof. Dr. Aziz POLAT



ÜYE : Prof. Dr. Hacer ERGİN



ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Özmert MA ÖZDEMİR



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../.....



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 değerli hocalarım Prof. Dr. Hacer Ergin, Prof.Dr. İlknur Kılıç, Yrd. Doç. Dr. Özmert MA Özdemir, Prof. Dr. Aziz Polat, Prof. Dr. Serap Semiz, Doç. Dr. Dolunay Gürses, Doç. Dr. Selçuk Yüksel, Doç. Dr. Yasemin Işık Balcı, Yrd. Doç. Dr. Mine Cinbiş, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Doğan

Tez aşamasında her konuda desteğini ve yardımını benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Hakan Akça, Prof. Dr. Çiğdem Yenisey ve Doç.Dr. Mehmet Zencir'e

Tezimin her aşamasında desteklerinden yararlandığım Aydın Demiray, Onur Tokgun ve Celile Hatipoğlu'na

Birlikte çalıştığım Uzm. Dr. Kazım Küçüktaşçı'ya, tüm asistan ve hemşire arkadaşlara,

Her zaman manevi desteklerini aldığım çok sevdiğim aileme, sevgili eşim Atilla ve oğlum Poyraz'a ayrı ayrı teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Özlem Şahin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLOLAR DİZİNİ	IX
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	2
GİRİŞ	3
GENEL BİLGİLER	5
SARILIK ve BİLİRÜBİN METABOLİZMASI	5
Yenidoğan Sarılıkları	6
Bilirubin Toksisitesi	7
Bilirubin Nörotoksisitesinin Hücresel ve Moleküler	
Mekanizmaları	8
Akut Bilirubin Ensefalopatisi ve Kernikterus	9
<i>Akut Bilirubin Ensefalopatisi</i>	10
<i>Kernikterus</i>	10
Bilirubin Toksisitesinin Patofizyolojisi	11
Tedavi	11
Bilirubin ve Oksidatif Stres	12
Hücre Kültürlerinde Bilirubin Toksik Etkisi	13

Bilirubin Toksisitesini Etkileyen Faktörler	14
GİNKGO BİLOBA ve ETKİLERİ	14
GEREÇ VE YÖNTEM	18
BULGULAR	25
TARTIŞMA	32
SONUÇLAR	43
KAYNAKLAR	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

A₀:	Sıfırıncı saatteki absorbans değeri
A₄₈:	48. saatteki absorbans değeri
BAEP:	Beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyeli
BIND:	Bilirübünün indüklediği nörolojik disfonksiyon
CAT:	Katalaz
DMEM/F12:	<i>Dulbecco's Eagle Medium/F12</i>
EGB 761:	Ginkgo biloba ekstresi
GPx:	Glutasyon peroksidaz
HBSS:	<i>Hanks Buffered Salt Solution</i>
IL-1β:	İnterlökin 1 beta
IL-6:	İnterlökin 6
iNOS:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
MDA:	Malondialdehit
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB:	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NMDA:	N-metil-D-aspartat
ROS:	Reaktif oksijen ürünleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
TC₅₀:	Hücrelerin %50'sine toksik konsantrasyon
TNF-α:	Tümör nekroz faktör alfa
TUNEL:	Deoxynucleotidyl (TdT)-mediated dUTP nick end labeling
UDPGT:	Uridildifosfat glukuronil transferaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Beyin dokusunun elde edilmesi ve mekanik olarak parçalanması (A, B, C)	19
Şekil 2 Faz kontrast mikroskobu primer nöron hücre kültürü (A, B)	20
Şekil 3 Faz kontrast mikroskobu primer astrosit hücre kültürü (A, B)	21
Şekil 4 96 kuyucuklu plaklar (A). Kuyucuklu plaklardaki astrosit hücreleri (B) ...	23
Şekil 5 Uygulanan bilirubin konsantrasyonları ve TC ₅₀ değeri	25
Şekil 6 Uygulanan ginkgo alkaloid konsantrasyonları	26
Şekil 7 Grupların hücre canlılığındaki değişim (%)	28
Şekil 8 Sıfırncı ve 48. saatlerde gruplardaki hücre sayılarının değişimi	28
Şekil 9 Kontrol(A) ve ginkgo ¹⁰ (B) grubunda TUNEL boyama ile astrosit hücreleri	29
Şekil 10 TUNEL boyama ile astrositlerde indirekt bilirübine bağlı apoptozis.....	29
Şekil 11 Ginkgo ¹⁰ +Bilirubin ¹⁰ grubunda TUNEL boyama ile astrosit hücreleri	30
Şekil 12 Bilirubin ¹⁰ +Ginkgo ¹⁰ grubunda TUNEL boyama ile astrosit hücreleri	30
Şekil 13 Grupların astrosit hücrelerindeki apoptozisin değerlendirilmesi	31

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 Yenidoğanda indirekt hiperbilirubineminin nedenleri	7
Tablo 2 Grupların hücre canlılığındaki değişim	27
Tablo 3 Grupların astrosit hücrelerindeki apoptozisin değerlendirilmesi	30

ÖZET

Bilirubin sitotoksitesi oluşturulan yenidoğan rat astrosit hücre kültüründe ginkgo bilobanın etkisinin araştırılması

Dr. Özlem ŞAHİN

Neonatolojideki gelişmelere rağmen hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisite halen önemli bir sorundur. Bilirubin hücre düzeyde çift yönlü bir etkisinin bulunduğu, fizyolojik düzeylerde antioksidan etki gösterirken, patolojik seviyelerde oksidatif zedelenmeye yol açtığı düşünülmektedir. Santral sinir sisteminde antioksidan, antiapoptotik, antinitrozatif, vazorelaksan, antiagregan, antiinflamatuvar etkileri gösterilen ginkgo bilobanın (EGB-761), hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisitedeki etkisi bilinmemektedir. Çalışmamızda hiperbilirubinemiye bağlı sitotoksite oluşturulmuş yenidoğan rat astrosit hücre kültüründe EGB-761'in etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

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) 10 µM olarak saptandı. Bilirubine bağlı apoptotik hücre ölümü TUNEL boyama yöntemiyle değerlendirildi. EGB-761'in hücre canlılığını %100 ve %110 arttıran konsantrasyonları 10µg/ml, 0.5µg/ml olarak belirlendi. Kontrol grubuna ilaç uygulanmazken, astrosit hücre kültürüne bilirubin¹⁰ grubunda 10 µM bilirubin, ginkgo¹⁰ grubunda 10µg/ml EGB-761 48 saat süreyle uygulandı. Profilaksi amacıyla astrosit hücre kültürüne ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ grubunda 10µg/ml EGB-761 uygulandıktan 4 saat sonra 10µM bilirubin, tedavi amacıyla bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubunda 10 µM bilirubin uygulandıktan 4 saat sonra 10µg/ml EGB-761 48 saat süreyle uygulandı. Kontrol grubuna göre bilirubin¹⁰ grubunda hücre canlılığında yaklaşık %50 azalma, apoptozda beş kat artış saptandı (p<0.001, p<0.001). Profilaksi ve tedavi amacıyla verilen EGB-761'in kontrol grubuna göre hücre canlılığını belirgin arttırdığı (p<0.001, p<0.001); apoptozisi belirgin azalttığı saptandı (p<0.001, p<0.001).

Bu çalışmayla bilirübinin in-vitro olarak astrosit hücrelerine sitotoksik etkili olduğu, profilaksi ve tedavi amacıyla verilen EGB-761'in bilirübinin sitotoksik etkilerini azalttığı gösterildi.

Anahtar kelimeler: Bilirübin, ginkgo biloba, nörotoksisite, yenidoğan

SUMMARY

Investigation of the effect of ginkgo biloba on newborn rat astrocyte cell cultures with bilirubin cytotoxicity

Dr. Özlem ŞAHİN

In spite of the recent improvements in neonatology, neurotoxicity caused by hyperbilirubinemia is still being an important problem. Bilirubin is thought to have two sided affects on cells, being antioxidant at physiological levels, while causing oxidative injury at pathological levels. In central nervous system, antioxidant, antiapoptotic, antinitrosative, vasorelaxant, antiaggregant and antiinflammatory effects of ginkgo biloba (EGB-761) are known, but there is no knowledge about its effects on neurotoxicity caused by hyperbilirubinemia. The aim of our study was to investigate the effects of EGB-761 on newborn rat astrocyte cell cultures with bilirubin cytotoxicity.

In our study, astrocyte cell cultures obtained from one day old Wistar albino rats, by the modified method of Cole and De Vellis were used. The indirect bilirubin concentration toxic to 50% of astrocytes (TC₅₀) was found to be 10 µM. The apoptotic cell death due to bilirubin was evaluated by TUNEL staining method. The concentrations of EGB-761 that increased cell viability 100 % and % 110 were determined as 10µg/ml and 0.5µg/ml, respectively. In bilirubin¹⁰ group 10 µM bilirubin, and in ginkgo¹⁰ group 10 µg/ml EGB-761 was administered to cell cultures for 48 hours, while in control group no medication was given. In ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ group 4 hours after 10 µg/ml EGB-761 administration, 10 µM bilirubin was administered for 48 hours as prophylaxis, while in bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ group 4 hours after 10 µM bilirubin administration, 10 µg/ml EGB-761 was administered for 48 hours as treatment. Compared with the control group, approximately 50% decrease in cell viability, and five times increase in apoptosis was found in bilirubin¹⁰ group (p:0.001, p:0.001). EGB-761 administration for prophylaxis and treatment was found to significantly increase cell viability (p:0.001, p:0.001), and significantly decrease apoptosis (p:0.001, p:0.001), when compared with the control group.

This study indicates that, bilirubin is cytotoxic on astrocytes in-vitro, and administration of EGB-761 for prophylaxis or treatment reduces the cytotoxic effects of bilirubin.

Key Words: Bilirubin, ginkgo biloba, neurotoxicity, newborn.

GİRİŞ

Zamanında doğan bebeklerin yaklaşık % 60-70'i, prematüre bebeklerin ise hemen hemen tamamı yaşamın ilk günlerinde hiperbilirubinemi sorunuyla karşı karşıya kalırlar (1). Hafif derecede bilirubin yüksekliği antioksidan etki gösterirken; yenidoğan bebeklerde hepatik transportun yetersiz, bilirubin üretimi ve enterohepatik dolaşımın artmış olması belirgin bilirubin yüksekliğine, bilirubin ensefalopatisi ve kernikterusa yol açabilmektedir (2-4).

Hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisitenin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (5). Bilirubin, mitokondrial fonksiyonları ve oksidatif fosforilasyonu engelleyerek, nörotransmitter sentez, salınım ve geri alımını, protein sentezini inhibe ederek, eksitotoksisiteye ve hücre zarında hasara yol açarak, DNA'nın sentez ve replikasyonunu azaltarak nörotoksisite oluşturmaktadır (6,7).

Ginkgo biloba, aynı isimli bitkinin yapraklarının kurutulması ile elde edilen, yıllardır Çin ve Batı ülkelerinde serebrovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan, nöroprotektif etkisi bir çok in vivo ve in vitro çalışma ile gösterilmiş bir ajandır. Ginkgo biloba veya metabolitlerinin kan beyin bariyerini geçtiği, farklı tipteki nörolojik hasarlarda iyileşme sağladığı ve hastalarda ciddi yan etkiler gözlenmediği bildirilmiştir (8-11). Ginkgo biloba etkisini %22-27 oranındaki flavonoid ve %5-7 oranındaki terpenoid içeriği ile göstermektedir (9).

İn vivo ve in vitro çalışmalarda ginkgo bilobanın nöroprotektif etkisini açıklayan birçok mekanizma öne sürülmüş; bu mekanizmalar mitokondrial ATP sentezinin korunması, apoptotik hasarın inhibisyonu, beyinde hipoksiye bağlı membran hasarının baskılanması, sitokrom c oksidazın COX III subunitini ve NADH dehidrogenazın ND I subunitini kodlayan mitokondrial DNA'nın ekspresyonunu arttırması olarak açıklanmıştır (12,13). Hayvan çalışmalarında ginkgo biloba ekstresinin (EGB-761) oksidatif hasara karşı koruyucu, hidroksil radikali, peroksil radikali, süperoksid anyonu gibi serbest radikalleri temizleyici etkisi olduğu; bu etkinin EGB-761'in içeriğinde bulunan flavonoid fraksiyonunun süperoksid dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırmasıyla sağlandığı bildirilmiştir (8,9,14). Park ve arkadaşları (13) EGB-761'in indüklenbilir Nitrik

Oksid Sentaz (iNOS) ekspresyonunu ve *nuclear factor-kappa B* (NF-kB)'yi baskılayarak NO üretimini azalttığını; Liu ve arkadaşları (9) lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit (MDA) üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Yenidoğan bebeklerde hiperbilirubineminin önlemesi veya tedavisi amacıyla bir çok ajan üzerinde deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu ajanların pek çoğu olumlu sonuç vermiş olsa da çok az bir kısmı klinik olarak kullanılabilir. Santral sinir sisteminde antioksidan, antiapoptotik, antinitrozatif, vazorelaksan, antiagregan, antiinflamatuvar etkileri gösterilen EGB-761'in, hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisitedeki etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisite oluşturulmuş yenidoğan rat astrosit hücre kültüründe ginkgo bilobanın etkinliğinin araştırılması ve çıkacak sonucun kliniğe yansıtılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

SARILIK ve BİLİRÜBİN METABOLİZMASI

Sarılık, yenidoğan döneminde en sık görülen problemlerden birisidir ve büyük çoğunluğu *benign* karakterdedir. Ancak bilirübinin potansiyel toksik etkileri nedeniyle sarılıklı yenidoğanlar ciddi hiperbilirübinemi, bilirübin ensefalopatisi ve kernikterus riski açısından yakından takip edilmelidir (14-16).

Hem katabolizmasının son ürünü olan bilirübin pigmentinin %75'i yaşlanmış eritrositlerin retiküloendotelial sistemde lizisi sonucu oluşmaktadır. Hemoglobinin bir gramının yıkımı ile 35 mg bilirübin açığa çıkmaktadır. Yenidoğanlarda günlük 8-10 mg/kg olan bilirübin yapımı erişkindeki değerin ikibuçuk katıdır (7,17,18).

Bilirübinin oluşmasında ilk adım olarak hem, hem oksijenaz enzimiyle biliverdine oksitlenir. Bu katalitik olayda bir seri oksidasyon reaksiyonları gerçekleşir ve alfa-metan köprüsü kırılarak hem halkası açılır. Karbon monoksit, biliverdin ve demir açığa çıkar. İkinci aşamada biliverdin redüktaz katalizörlüğünde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ile birlikte biliverdinden bilirübin meydana gelir. Retiküloendotelial sistemden dolaşıma salınan konjuge olmamış bilirübin (indirekt bilirübin) suda çözünmediğinden albümine bağlanarak taşınır (1,17,18).

Bilirübin, albümine bağlı indirekt bilirübin, albümine bağlanmamış serbest bilirübin, safra ve böbrek yolu ile atılan konjuge bilirübin, albümine kovalan bağlı konjuge bilirübin (delta bilirübin) olmak üzere serumda dört değişik formda bulunur (19). Albüminin indirekt bilirübine yüksek affinitesi nedeniyle plazmadaki serbest bilirübinin tamamına yakını hızla albümine bağlanır (1). Karaciğere gelen albümine bağlı bilirübin, karaciğer hücre yüzeyinde albüminden ayrılır ve membran reseptörlerine bağlanır. Hepatosit içine geçen bilirübin ligandin veya Y protein adı verilen hücre içi reseptöre bağlanarak düz endoplazmik retikuluma taşınır. Düz endoplazmik retikuluma gelen bilirübin, uridildifosfat glukuronil transferaz (UDPGT) enzimi yardımıyla suda eriyen iki glukuronil grubunun eklenmesi ile mono ve diglukuronid formuna çevrilir (19). Sonuç olarak bilirübin karaciğerde,

suda eriyen ve vücuttan atılabilen şekli olan konjuge bilirübine dönüştürülmüş olur (1). Yenidoğanlarda UDPGT aktivitesi düşük olup doğumdan sonra enzim aktivitesi hızlı bir şekilde artar ve bir-iki hafta içinde erişkin düzeyine ulaşır. Konjuge bilirubin kanaliküler membrandan bir taşıyıcı protein yardımı ile safra içine atılır (7,19). Bağırsağa geçen konjuge bilirubin tekrar emilmezken; indirekt bilirubin, kolesterol, tiroksin ve diğer bazı maddelerle birlikte enterohepatik dolaşıma girer. Bilirubin monoglukuronid ve diglukuronid formları stabil moleküller olmadıklarından; bağırsaktaki alkali ortamda non-enzimatik olarak, mukoza yüzeyindeki alfa-glukuronidaz ile enzimatik olarak indirekt bilirübine dönüşüp karaciğere geri döner (19,20). Bu durum karaciğerin bilirubin yükünü arttırmaktadır (7). Bağırsağa geçen bilirubin yaklaşık %25'inin geri emildiği düşünülmektedir. Bilirubin metabolizmasının bu enterohepatik fazı, yenidoğan sarılığında önemli rol oynamaktadır (18,20). Bebeğin beslenmesinin düzeltilmesi ile enterohepatik dolaşım azaltılabilmektedir. Yenidoğan bağırsak lümeninde konjuge bilirubin, bakteriler tarafından tekrar geri emilemeyen sterkobiline dönüştürülmektedir (1). Bilirubinoidlerin büyük bir bölümü bağırsaklardan; küçük bir kısmı ise kolondan geri emilip karaciğer ve böbrekler tarafından atılmaktadır (20).

Yenidoğan Sarılıkları

Yenidoğan sarılıkları bilirubin cinsine göre indirekt hiperbilirubinemi ve direkt hiperbilirubinemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (18).

Yenidoğan bebeklerin büyük çoğunluğunda yaşamın ilk günlerinde belirgin indirekt hiperbilirubinemi görülmektedir (1,17). Yenidoğanda indirekt hiperbilirubinemi nedenleri Tablo 1'de belirtilmiştir (1,16,18). Sarılık 14-21 günden daha uzun sürerse neonatal kolestaz olabileceği düşünülmeli; serum total ve direkt bilirubin düzeyleri ölçülmelidir (21).

Direkt bilirubin düzeyinin 1.5-2.0 mg/dl'nin üzerinde olması ya da total bilirubin %10-20'sini geçmesi direkt hiperbilirubinemi olarak tanımlanır ve her zaman patolojik bir durumdur (22). Neonatal kolestazın en sık nedenleri idiyopatik neonatal hepatit ve biliyer atrezidir (21).

Tablo 1. Yenidoğanda indirekt hiperbilirubineminin nedenleri

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

Bilirubin Toksikitesi

Yağda çözünen ve kan-beyin bariyerinden kolaylıkla geçebilen indirekt bilirubin serumda yüksek düzeylere ulaştığında beyin için toksik etki göstermektedir (16,23,24). Bazı ilaçların (sulfonamidler) bilirubin ile yarışarak albümine bağlanması, beyin kan akımında ve kan-beyin bariyerinin geçirgenliğinde artış, bilirubinün beyin dokusuna geçişini kolaylaştıran faktörlerdir. Hiperozmolarite, anoksi, hiperkarbi, prematürelilik gibi durumlarda kan-beyin bariyerinin devamlılığı

bozulduğundan albümine bağlı bilirübin de beyine geçebilmektedir (1,16,25). Yüksek bilirübin düzeyleri ve bilirübine uzun süre maruziyet bilirübünün toksik etkisini daha da arttırmaktadır.

Bilirübünün toksik etkisi için enzim sistemlerinin inhibisyonu ve hücre düzenleyici reaksiyonların inhibisyonu gibi pek çok mekanizma ileri sürülmüştür (25). Mitokondri membranında bulunan sitokrom oksidaz, malat dehidrogenaz, monoamin oksidaz gibi enzimler bilirübini oksidasyonla detoksifiye etmektedir. Böylece beyin dokusu bilirübünün toksik etkisine karşı kendisini korumaktadır. Yenidoğanlarda bu enzimlerin aktivitelerinin matür hayvan modellerine göre daha düşük olduğu; bu nedenle yenidoğanların bilirübin nörotoksitesine daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (23).

Bilirübin Nörotoksitesinin Hücresel ve Moleküler Mekanizmaları

Yaklaşık 100 yıldır bir çok araştırma yapılmasına rağmen, bilirübin nörotoksitesinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte bilirübine bağlı beyinde oluşan nöronal disfonksiyon, bilirübünün protein fosforilasyonunu inhibe etmesi ile açıklanmaktadır (1,26,27).

Bilirübin mitokondride oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek sitotoksik etki göstermektedir (3). Bilirübine bağlı olarak hücrede serbest radikal oluşumu, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunun artışı protein karbonilleri ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) düzeyinin artışıyla sonuçlanmaktadır. Birçok deneysel çalışmada bu maddeler bilirübine bağlı oksidatif hasarın göstergesi olarak kullanılmıştır (26,28). Brito ve arkadaşları (28) glikoursodeoksikolik asidin, bilirübine bağlı oluşan lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu azaltarak nöroprotektif etkili olduğunu göstermişlerdir.

Biyolojik sistemlerde sürekli oluşan serbest radikaller antioksidan savunma mekanizmaları ile nötralize edilerek zararlı etkileri engellenmeye çalışılır. Yüksek bilirübin düzeylerinin beyinde serbest radikal oluşumunu arttırarak oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir. Hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olan redükte glutatyon, glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol almaktadır (26,29,30).

Bilirubin nörotoksitesini için öne sürülen mekanizmalardan birisi de glutamat reseptör aracılı oluşan hasardır (31). İn vivo çalışmalarda indirekt bilirubin indüklediği beyin hasarında beyinde primer eksitator nörotransmitter olan glutamat eksitotoksitesinin rol oynadığı ortaya konmuştur (3,32). Yüksek bilirubin düzeyleri glutamatın sinaptik aralığa sekresyonunu arttırmakta ve sinaptik aralıktan da geri alımını azaltmaktadır. Ekstrasellüler konsantrasyonu artan glutamat N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini aşırı uyararak eksitotoksitesine neden olmaktadır (26,28,33). Grojean ve arkadaşlarının çalışmasında (31) bu teoriyi destekler şekilde NMDA reseptör antagonisti MK-801'in bilirubin nörotoksitesinde koruyucu etkili olduğu bildirilirken; Shapiro ve arkadaşlarının çalışmasında (32) bu koruyucu etki gösterilememiştir.

Bilirubinün sinir hücrelerinde apoptoza yol açarak nörotoksik etkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (31,34). Apoptozis, hücrede kromatin kondensasyonu, çekirdek ve sitoplazma parçalanması ile karakterize aktif hücre ölümüdür (35). İndirekt bilirubin, sinir hücrelerinde mitokondrial transmembran potansiyelini azaltmakta, membran geçirgenliğini arttırmakta ve sitokrom c salınımına yol açmaktadır. Aynı zamanda indirekt bilirubin mitokondrial membranda apoptotik Bax translokasyonuna ve apoptozisi inhibe eden Bcl-2'nin inaktivasyonuna neden olmaktadır. Sitozolik sitokrom c, apoptozu aktive edici faktöre bağlanıp kaspazları aktive etmekte ve apoptoz kaskadının başlamasını sağlamaktadır (4,26).

Bilirubin protein ve DNA sentezinin, protein fosforilasyonunun inhibisyonuna, enerji metabolizmasında kalsiyum dengesinde bozulmaya yol açarak nöron hasarına neden olmaktadır. Bilirubinün toksik etkisiyle nöron hücresinin yüzeyindeki fosfatidil serin tabakasının kaybı, nöronun fagositoz için hedef hücre olmasına neden olmaktadır (26,34).

İndirekt bilirubin, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve interlekin 1 beta'nın (IL-1 β) ekspresyonunu stimüle ederek inflamatuvar yanıtı neden olur (33). Fernandes ve arkadaşları (33) astrosit hücre kültürü modelinde IL-10'un, NF- κ B'nin translokasyonunu engelleyerek indirekt bilirubine bağlı artan inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu engellediğini göstermişlerdir.

Akut Bilirubin Ensefalopatisi ve Kernikterus

Yenidoğan bebeklerin %8-11'inde ciddi hiperbilirubinemi gelişmektedir (36). Bilirubin ensefalopatisi veya kernikterus yenidoğan hiperbilirubinemisinin ciddi komplikasyonları olup; zamanında takip ve tedavi edilmezse nadiren ölüme sonuçlanabilmektedir (17,27,32,36).

İndirekt bilirubin yüksek seviyelere ulaştığında bazal ganglionlar, beyin sapındaki işitme ile ilgili nukleuslar, serebellum ve hipokampustaki purkinjye hücrelerinde birikip hasara neden olmaktadır. Ağır eritroblastozis fetalisten ölen sarılıklı bebeklerin otopsilerinde beyinde bilirubinle boyanmış alanlar olduğu ve bunların belirli bir dağılım gösterdiği saptanmıştır (18,37).

Akut bilirubin ensefalopatisi terimi, doğumdan sonraki ilk haftada görülen bilirubin toksisitesinin akut belirtilerini tanımlamak için, kernikterus ise bilirubin toksisitesinin kronik ve kalıcı klinik sekellerini tanımlamak için kullanılmaktadır (18,26,38). Son yıllarda bilirubin ensefalopatisi ile ilişkili değişiklikleri tanımlamak için bilirubinün indüklediği nörolojik disfonksiyonlar (BIND) teriminin kullanılması önerilmiştir. BIND, hafif ve belirsiz nörolojik bozukluklardan (izole işitsel nöropati, hareket bozuklukları, distoni, bilişsel bozukluklar, hafif zeka geriliği), akut bilirubin ensefalopatisi ve postikterik sekelleri (nöromotor/işitsel) de içine alan geniş bir spektrum gösterir (18).

Akut Bilirubin Ensefalopatisi

İndirekt bilirubinün santral sinir sisteminde depolanmasının sarı renkte bir boyanmaya ve bilirubin ensefalopatisi ile karakterize nörolojik disfonksiyona yol açtığı bildirilmektedir (34). Akut bilirubin ensefalopatisi sıklıkla geri dönüşümlü, erken dönemde hipotoni, letarji, zayıf emme, anormal beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyeli (BAEP); geç dönemde hipertoni, opistotonus, tiz sesle ağlama, batan güneş manzarası, ateş ve BAEP'te kötüleşme ile karakterize bir durumdur (37).

Kernikterus

Bilirubinün indüklediği beyin hasarının nöropatolojik bulguları ile birlikte klinik bulgularını da kapsayan kompleks bir sendromdur (39). En sık etkilenen bölgeler bazal ganglionlar (özellikle globus pallidus, subtalamik çekirdek), hipokampus, substantia nigra, çeşitli kranial sinirler (özellikle okülomotor, vestibüler, koklear, fasiyal sinir çekirdekleri), çeşitli beyin sapı çekirdekleri, özellikle ponsun retiküler yapısı, serebellar çekirdekler ve medulla spinalisin ön boynuz hücreleridir (18). Başlıca risk faktörleri, serum bilirubin düzeyinin yüksekliği, hiperbilirubineminin süresi, bilirubin albümin bağlanmasının azalması, gebelik yaşının düşüklüğü, hemoliz varlığı, sepsis, asidoz ve nöronların bilirubin toksisitesine olan duyarlılığıdır (16). Kernikterusun nöropatolojik lezyonları daha çok globus pallidus, internal kapsül ve talamus bölgelerinde manyetik rezonans ile görüntülenmiştir (1). Anormal motor hareketler, işitme ile ilgili bozukluklar, özellikle yukarı bakış paralizisine neden olan okülomotor sinir hasarı, süt dişlerinde enamel displazi kernikterusun klinik tetradını oluşturmaktadır (40).

Bilirubin Toksisitesinin Patofizyolojisi

Konjuge olmamış serbest bilirubin lipofilik özelliği nedeniyle kan-beyin bariyerini geçebilir. Bilirubin yapım hızının kan ve dokuların tamponlama kapasitesini aşması, albüminin bilirubin bağlama kapasitesinde azalma, kan-beyin bariyerinde geçirgenliğin artması (hipertonisite, menenjit, hipoksemi) bilirubinün beyin dokusuna geçişini arttırmaktadır (18). Perinatal dönemde geçirilen hipoksi ve/veya iskemi bilirubinün indüklediği beyin hasarına yatkınlığı daha da arttırmaktadır (3). Bilirubin önce sinir terminallerine bağlanır, membran potansiyelini düşürür, sinir iletisini azaltır; bundan sonra sinir terminalleri ve aksonlara penetre olur ve retrograd olarak nöronlara geçer (18). Nöronlara geçen bilirubin agregasyon, presipitasyon ve kristalizasyon ile toksik etkiye neden olmaktadır (27). Bilirubin nörotoksisitesinde önce hücre ölümü olup daha sonra bilirubin hücreye bağlanmakta ya da bilirubin hücre içine girdikten sonra hücre ölümüne sebep olabilmektedir. Son yıllarda bilirubin nörotoksisitesi ile ilgili çalışmalar daha çok ikinci görüşü desteklemekteyse de hücre düzeydeki araştırmalar yoğun olarak devam etmektedir (24).

Tedavi

Neonatal hiperbilirubinemide etkin tedavinin primer hedefi akut bilirubin ensefalopatisini önlemektir. Ciddi hiperbilirubinemi riskinin belirlenmesi, yakın izlem ve gerektiğinde acil tedavi uygulanması tedavinin ana prensipleridir (38). Hastalara fototerapi, kan değişimi, medikal tedavi uygulanabilir. Medikal tedavide kullanılan IVIG, eritrositler üzerindeki Rh antikorlarını kapatarak; metalloporfirinler, hem oksijenazı inhibe ederek; fenobarbital, şilofibrat ve nikotinamid, hepatik enzim induksiyonu yaparak etki göstermektedirler (41).

Hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisitenin önlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda L-karnitin (42), glikoursodeoksikolik asit (28), ursodeoksikolik asit (34), MK-801 (31)'in nöroprotektif etkileri gösterilmiştir; ancak bu ilaçların klinikte kullanılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bilirubin ve Oksidatif Stres

Bilirubin ile ilgili çalışmalar incelendiğinde bilirubinün hücresel düzeyde çift yönlü bir etkisinin bulunduğu, fizyolojik düzeylerde antioksidan etki gösterirken, patolojik seviyelerde oksidatif zedelenmeye yol açtığı düşünülmektedir (28). Hücre içinde reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ve temizlenmesi arasındaki dengenin bozulmasıyla gelişen oksidatif stres, sinir sisteminde serebral iskemi, eksitotoksisite ve nörodejeneratif süreçlerin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (43,44).

Bilirubinün düşük düzeylerde reaktif oksijen radikallerine bağlı hasarı önleyerek antioksidan etki göstermesi nedeniyle fizyolojik sarılığın doğal koruyucu etkileri olduğuna inanılmaktadır (2,27,28,43,45). Dore ve arkadaşları (26), bilirubinün düşük konsantrasyonda (10nM) nöronları hidrojen peroksitin indüklediği toksisiteye karşı koruduğunu, yüksek konsantrasyonda (250 nM) nöronların %25'inin yaşam süresini kısalttığını göstermişlerdir. Stocker ve arkadaşlarının çalışmasında (46) ise bilirubinün hidroksil radikallerini temizleyici etkisi rapor edilmiştir. Lanone ve arkadaşlarının çalışmasında (45) ratlara önce E.coli endotoksini, ardından tek doz bilirubin IV bolus uygulandığında, bilirubinün endotoksemiye bağlı karaciğer disfonksiyonu ve mortaliteye karşı koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir.

Yenidoğanlarda hepatik transport veya konjugasyonun yetersiz maturasyonu, enterohepatik dolaşım ve hemolizin artmasıyla yüksek düzeye ulaşan bilirubin toksik etkiye neden olur. İndirekt bilirubine maruziyet ile oluşan reaktif oksijen radikallerinin üretimi, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, glutatyon homeostazında bozulmanın sonucunda hücrelerde oksidatif hasar gelişir (43). Glutatyon, hücrenin en önemli antioksidan maddesidir. Hücresel antioksidan defans sistemi glutatyon tarafından sağlanır. Astroglial hücrelerde hücre içi glutatyon miktarı nöronlardan daha fazladır. Bu nedenle oksidan hasara karşı astrositler daha güçlüdür (43,44). Brito ve arkadaşları (43) önemli bir glutatyon prekürsörü olan N-asetil sisteinin nöronlarda bilirubine bağlı oluşan oksidatif hasara karşı nöroprotektif etkisini göstermişlerdir.

Hücre Kültürlerinde Bilirubin Toksik Etkisi

Yaşayan organizmadan alınan hücreler 24 saat içinde kültür vasatına ekilip bir dizi işlemde geçirildikten sonra hücre kültürü elde edilmektedir. Sinir hücre kültürleri primer nöron kültürü, primer astrosit kültürü, primer oligodendrosit kültürü ve primer mikroglia kültürü olmak üzere dörde ayrılır. Sinir hücre kültürlerinde toksik maddelere bağlı gelişen sitotoksik etki ve mekanizması değerlendirilmektedir (47).

Bilirubin astrositler, nöronlar, eritrositler gibi farklı hücre tiplerine toksik etkilidir (30). Astrosit ve nöron hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda bilirubine bağlı olarak apoptoz ve nekroz geliştiği gösterilmiştir (5,34,42,43). Nöronlar, glutatyon içeriğinin azlığı yanında bilirubini okside etme ve hücreden uzaklaştırma yeteneklerinin yetersizliği nedeniyle bilirubin toksik etkisine astrositlerden daha duyarlıdır (5,24,34,43). Astrositlerin belirli antioksidanları yüksek konsantrasyonlarda bulundurabildiği ve bu nedenle oksidatif hasara nöronlardan daha dirençli olduğu bilinmektedir (44).

İn vivo ve in vitro sistemlerde toksik etkinin farklı bilirubin düzeylerinde ortaya çıktığı gösterilmiştir. İn vivo sistemlerde kan-beyin ve kan-BOS bariyerleri, indirekt bilirubin hücrelere penetrasyonunu sınırlayarak toksisite gelişimini

önlemektedir (2). İn vitro çalışmalarda kullanılan sinir hücre kültürleri sitotoksik etkiyi değerlendirmek için basit ve yararlı yöntemlerdir (47).

Deneyisel kernikterus modellerinde astrositlerin iyon homeostazisinde, birçok nöroaktif bileşiklerin sentez ve salgılanmasında, nöronlara metabolik ve trofik destek sağlanmasında, indirekt bilirübinin kandan nöronlara taşınmasında, hasarlı nöronlardan salınan toksik maddelerin temizlenmesinde ve toksisiteye karşı etkili oldukları gösterilmiştir. Bilirübinin nöronlarda belirgin kalıcı hasara yol açarken astrositlerde daha çok geri dönüşümlü hasar oluşturduğu gösterilmiştir (5,44). Tüm bu özellikler bilirübin ensefalopatisinde astrositlerin önemli bir role sahip olduğunu ve tedavi modellerinde potansiyel hedef olabileceğini düşündürmektedir.

Bilirübin Toksisitesini Etkileyen Faktörler

İndirekt bilirübin oldukça lipofilik olup, albüminin olmadığı durumlarda kolaylıkla kan-beyin bariyerini geçebilmektedir (24). Yenidoğanlarda albümin konsantrasyonu erişkinlerden %25 daha düşük olup; bir gram albümin 8.5 mg bilirübini bağlamaktadır. Serbest yağ asitleri ve sulfonamid gibi bazı ilaçlar bilirübini albüminden ayırarak serbest bilirübinin artmasına ve toksisitenin daha kolay gelişmesine neden olmaktadır (16).

Asfiksi, hiperosmolalite ve hipoglisemi kernikterusa predispozan faktörlerdir. Asfiksi, hücre ödemi oluşturarak hedef hücrenin bilirübine cevabını değiştirmektedir. Hipoksemi ve hiperosmolalite, proteinlerin kan beyin bariyerinden geçişlerini arttırmaktadır (24).

GİNKGO BİLOBA ve ETKİLERİ

Ginkgo biloba, dünyanın bilinen en eski ağaç türlerinden biridir. Ginkgo ağacı, kuvvetliliği, hastalıklara karşı dirençliliği ve uzun yaşama özelliği ile karakterizedir. Binlerce yıldan beri geleneksel Çin tıbbında ürogenital sistem, akciğer, beyin hastalıkları ve dolaşım bozukluklarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır (9,48,49).

EGB-761 ginkgo biloba ağacı yapraklarından elde edilen bir ekstre dir (8,50). Günümüzde kullanılan standart EGB-761 etkisini içeriğindeki flavon glikozidler (%22-27) ve terpenoidler (%5-7) ile göstermektedir (8,9,49). Kersetin, kemferol, isoramnetin bileşiklerinden oluşan flavon glikozidler güçlü antioksidan etkileriyle ortamda bulunan süperoksit, hidroksil ve peroksil gibi serbest radikalleri yakalayarak hücreleri lipid ve protein oksidasyonuna karşı korumaktadır (49). Flavonoid fraksiyonunun antioksidan enzim aktivitelerini arttırarak oksidan strese karşı koruyucu etki sağladığı bildirilmiştir (8,9,14).

EGB-761'in içeriğinde bulunan ginkgolid A, C, J, K, L, M ve B, *platelet activating factor* (PAF) inhibisyonu ile anti inflamatuvar etki sağlamakta; iskemiye bağlı artan kan viskozitesi ve trombosit agregasyonunu azaltmaktadır. Bu etki sonucunda dokularda kan dolaşımını arttırarak hücrelerin oksijen alımını arttırmakta ve ortamda bulunan toksinlerin temizlenmesini sağlamaktadır (8,49-51).

Ginkgo bilobanın etki mekanizmaları tam olarak bilinmese de antioksidan, antiapoptotik, nöroprotektif, antiinflamatuvar, antialerjik, vazodilatör etkileri olduğu, bu etkilerin de ekstrenin heterojen yapısıyla ilişkili olduğu belirtilmektedir (8,48,50-52). Mitokondrial ATP sentezinin korunması, apoptotik hasarın inhibisyonu, beyinde hipoksinin indüklediği membran hasarının baskılanması, sitokrom c oksidazın COX III subunitini ve NADH dehidrogenazın ND I subunitini kodlayan mitokondrial DNA'nın ekspresyonunun arttırılması ginkgo bilobanın nöroprotektif etkilerini açıklamak için öne sürülen mekanizmalardandır (12,13).

Oksidatif hasar, membran lipidleri ve hücrenin diğer komponentleri için toksiktir. Ginkgo biloba direkt olarak radikalleri temizleyerek, prooksidanları bağlayarak, antioksidan enzim aktivitesini arttırarak, serbest oksijen radikallerini tutarak biyomembranları oksidatif strese karşı korumakta ve hücre kaybını en aza indirmektedir (50,53). Iraz ve arkadaşları (54) akciğerlerde bleomisin oksidatif ve nitrozatif etkilerine bağlı gelişen fibrozisi ginkgo bilobanın, serbest radikal süpürücü ve antioksidan özellikleri nedeniyle engellediğini göstermişlerdir.

EGB-761 ile ilgili yapılan çalışmalarda Park ve arkadaşları (13) EGB-761'in iNOS ekspresyonu ve NF-kB'yi baskılayarak NO üretimini azalttığını; Liu ve

arkadaşları (9) lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit (MDA) üretimini inhibe ettiğini; Zhou ve arkadaşları (55) bilobalidlerin doza bağımlı olarak reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) indüklediği apoptozisi azalttığını; Xin ve arkadaşları (11) hidroksil radikallerine bağlı artan lipid peroksidasyonunu EGB-761'in doza bağımlı olarak inhibe ettiğini göstererek EGB-761'in oksidatif hasara karşı koruyucu, serbest radikalleri temizleyici etkisi olduğunu vurgulamışlardır.

Erdoğan ve arkadaşları (53) bleomisin toksisitesine bağlı olarak serbest radikal üretiminde rol alan ksantin oksidaz aktivitesindeki artışın ginkgo biloba ile önlenemediğini göstermişlerdir. Ksantin oksidaz ve MDA arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmış; lipid peroksidasyonunun önlenmesinin ksantin oksidaz aktivitesindeki azalma ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmada ginkgo bilobanın plazmada antioksidan aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir.

Hipoksiye bağlı oluşan hücrel enerji yetersizliği, glutamat reseptörlerinin uyarılmasıyla hücre içi kalsiyumun artışına ve proteaz, endonükleaz, fosfolipaz gibi enzimlerin salınımına sebep olur. Posthipoksik hasarda fosfolipaz A2 önemli bir araçtır ve fosfolipidlerin yıkımı ile kolin oluşumuna neden olur. Klein ve arkadaşları (56) hipoksik beyin hasarında bilobalidlerin etkisini incelemişler; bilobalidlerin konsantrasyona bağlı olarak kolin salınımını inhibe ettiğini saptamışlardır.

Ginkgo biloba'nın metabolik ve nörohormonal düzenleyici mekanizmalar yoluyla vasküler yapı, kan elemanları ve diğer vücut sıvılarında etkili olduğu düşünülmektedir (48). Prostaglandin ve endotelial NO sentaz aktivasyonu ile artan NO, serebral kan akımını artırarak nöroprotektif etki sağlamaktadır (8). Ginkgo biloba, klinikte yaygın olarak kalp ve beyin gibi organlarda dolaşımı arttırmak için kullanılmaktadır (50). Serebrovasküler kan akımında azalmaya bağlı semptomları olan yaşlı hastalarda ginkgo biloba tedavisi ile belirti ve bulgularda azalmalar olduğu bildirilmiştir (48). Kızkın ve arkadaşları (48) vertebroziler yetmezlikli hastalarda vertebral arter kan akım hızlarında ginkgo biloba ile anlamlı düzeyde artış saptamışlardır.

Bilirübine bağlı nörolojik hasar ile ilgili mekanizmalar ve bilirübünün astrosit hücre yaşanı/ölümü üzerine olan etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bu aşamada bilirübine bağlı toksik etkiyi azaltacak ajanların saptanması önem kazanmaktadır. Antioksidan ve nöroprotektif etkileri bilinen ginkgo bilobanın, astrositlerde bilirubin nörotoksisitesine etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada yenidoğanlarda bilirubin nörotoksisitesinin önlenmesi ve tedavisinde ginkgo bilobanın etkinliğini araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 19.08.2011 tarih ve 07 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 Ağustos 2011- Şubat 2012 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, Bilirubin¹⁰ grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 10 µM bilirubin (*Sigma Aldrich, B 4126-1G, St. Louis, MO, USA*) 48 saat süreyle uygulandı.

Grup III, Ginkgo¹⁰ grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 10 µg/ml ginkgo alkaloid (EGB-761) (*Ginkgo biloba Hevert injekt. Dil. D3 2ml, Hevert-Arzneimittel GmbH & Co. KG Nussbaum, Deutschland*) 48 saat süreyle uygulandı.

Grup IV, Ginkgo^{0.5} grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 0.5 µg/ml EGB-761 48 saat süreyle uygulandı.

Grup V, Bilirubin¹⁰ + ginkgo¹⁰ grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 10 µM bilirubin eklendikten dört saat sonra 10 µg/ml EGB-761 ilave edilip 48 saat süreyle uygulandı.

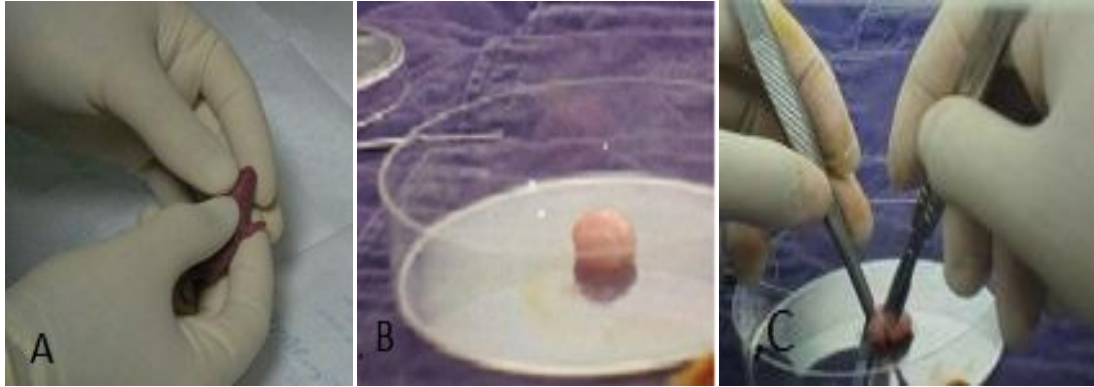
Grup VI, Bilirubin¹⁰ + ginkgo^{0.5} grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 10 µM bilirubin eklendikten dört saat sonra 0.5 µg/ml EGB-761 ilave edilip 48 saat süreyle uygulandı.

Grup VII, Ginkgo¹⁰ + bilirubin¹⁰ grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 10 µg/ml EGB-761 eklendikten dört saat sonra 10 µM bilirubin ilave edilip 48 saat süreyle uygulandı.

Grup VIII, Ginkgo^{0.5} + bilirubin¹⁰ grubu (n:6): Astrosit hücre kültürüne 0.5 µg/ml EGB-761 eklendikten dört saat sonra 10 µM bilirubin ilave edilip 48 saat süreyle uygulandı.

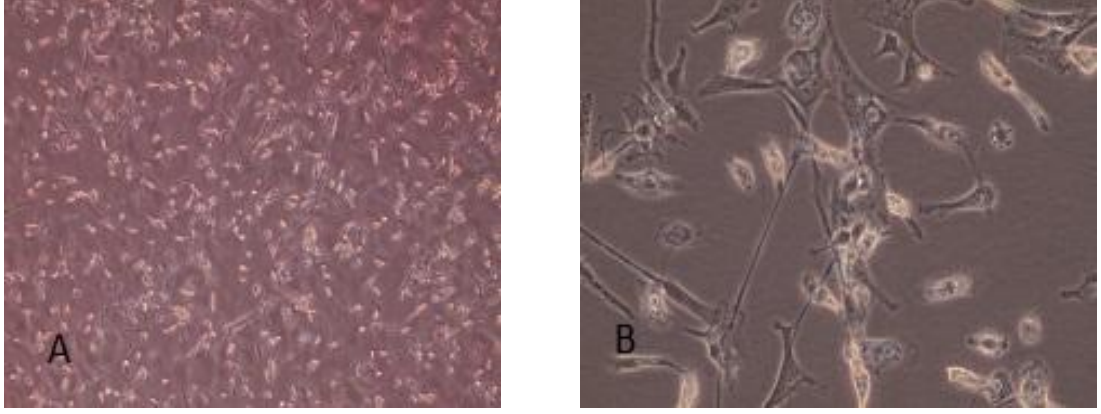
Astrosit Hücre Kültürünün Hazırlanması

Astrosit primer hücre kültürü, %95'in üzerinde saflıkta astrosit hücrelerinin elde edildiği kanıtlanmış olan Mc Carthy ve de Vellis yöntemlerinden modifiye edilerek hazırlanmış Cole de Vellis yöntemi ile literatürde tanımlandığı gibi hazırlandı (57,58). Steril koşullarda bir günlük rat yavrularına anestezi 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 1), 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 2).



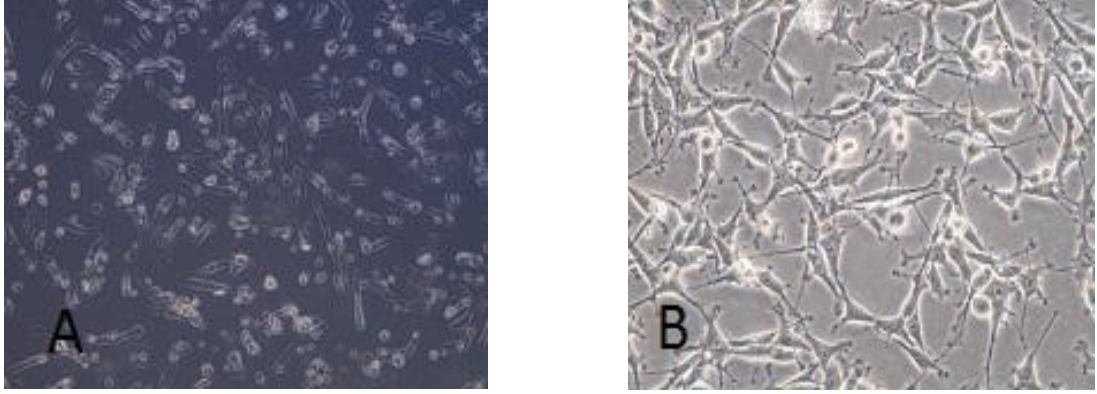
Şekil 1 (A,B,C): Beyin dokusunun elde edilmesi ve mekanik olarak parçalanması

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 2: 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 (57,58) (Şekil 3).



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

Bilirubin Solüsyonunun Hazırlanması

Astrosit hücre kültüründe kullanılan indirekt bilirubin 10 ml astrosit besiyerinde çözüldü ve ana stok 100 µl'de 2000 µM olacak şekilde hazırlandı. Bilirubin stok solüsyonu +4 °C'de karanlık ortamda saklandı. Deneyler sırasında istenilen bilirubin konsantrasyon değeri elde edilene kadar stok solüsyonu astrosit besiyeri ile sulandırıldı (2,5).

Ginkgo Alkaloidinin Hazırlanması

Astrosit hücre kültüründe kullanılan ve bir mililitresinde 1000 µg etken madde içeren ginkgo alkaloidi astrosit besiyeri ile 1/5 oranında sulandırılarak 200 µg/ml konsantrasyonu elde edildi. Ginkgo alkaloidini içeren ampuller oda sıcaklığında saklandı ve her deneyde istenen konsantrasyon tekrar hazırlandı.

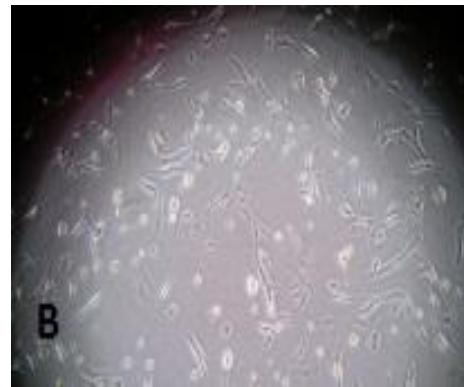
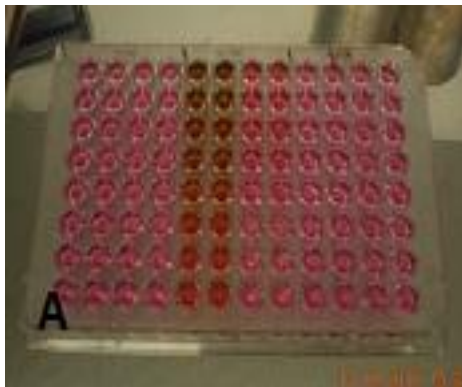
Bilirubin ve Ginkgo Alkaloidi Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Astrosit hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 3×10^4 hücre/100 µl astrosit besiyeri içerisinde olacak şekilde ekildikten 24 saat sonra faz kontrast mikroskobunda incelenerek hücrelerin varlığı ve canlılıkları değerlendirildi (Şekil 4). Kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılıp her kuyucukta 100 µl olacak şekilde astrosit besiyeri eklendikten sonra sıfırıncı saat olarak kabul edildi. Sıfırıncı saatteki absorbans (A_0) *Cytotox-glo* (Promega) kit kullanılarak Glomaks Sistem (Promega) cihazı ile luminometrik olarak ölçüm yapıldı. Daha sonra tüm plaklardaki besiyerleri uzaklaştırıldı. Her konsantrasyon için altışar kuyucuk olacak şekilde sırasıyla 400 µM, 200 µM, 100 µM, 80 µM, 60 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 8 µM, 5 µM, 4 µM, 2

μM , 1 μM , 0.5 μM indirekt bilirubin eklendi. Yine her konsantrasyon için altışar kuyucuk olacak şekilde sırasıyla 60 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ginkgo alkaloidi eklendi. Kuyucuklardaki sıvı miktarını 100 μl 'ye tamamlayacak şekilde astrosit besiyeri ilave edildi. Plaklar 37⁰C'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 x A_{48}/ A_0) hesaplandı (59). Hücre canlılığına göre deneyde kullanılacak indirekt bilirubin konsantrasyonu ve ginkgo alkaloidi konsantrasyonu belirlendi.

Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Astrosit hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 100 μl astrosit besiyeri içerisinde 3 x 10⁴ hücre olacak şekilde ekilip; 24 saat sonra kuyucuklar faz kontrast mikroskopunda incelenerek hücrelerin varlığı ve canlılıkları değerlendirildi. Kuyucuklar kontrol, bilirubin¹⁰, ginkgo¹⁰, ginkgo^{0.5}, bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5}, ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰, ginkgo^{0.5}+bilirubin¹⁰ 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 37⁰C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren karanlık ortamda 48 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 μl taze astrosit besiyeri eklendi ve A_{48} *Cytotox-glo* kit kullanılarak Glomaks Sistem cihazı ile luminometrik olarak ölçülerek hücre canlılığı hesaplandı (43,59) .



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

Apoptozisin Belirlenmesi

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

Kontrol, bilirubin¹⁰, ginkgo¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰, ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ grupları kültür kaplarında 37⁰C’de %5 CO₂ 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 çözültüsü üzerine fiksatif solüsyonu (%1 paraformaldehit) konuldu ve 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Falcon 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. Lamlara n-bütanol eklendikten sonra 30 sn inkübe edilip ksilen konuldu ve altı dakika inkübe edildi. Lamlar kurutularak entelan ve lamel ile kapatıldı. Faz kontrast mikroskopunda her deney grubu için beş alan sayılarak canlı ve apoptotik hücreler tespit edildi (35).

İstatistiksel Analiz

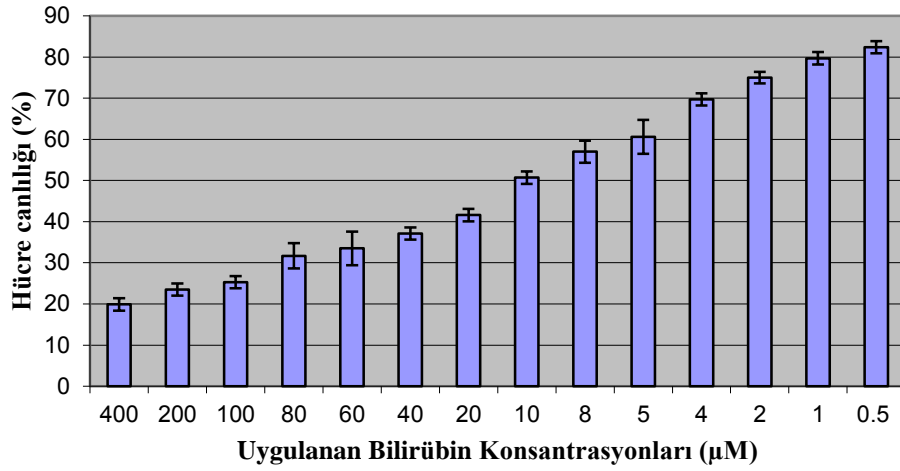
Tüm veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Çalışma grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirlemede parametrik (*Paired samples t test*) ve non-parametrik testler (*Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U*) kullanıldı. Normal dağılıma uygunluk testleri ile verilerimiz değerdendirildi. Normal dağılıma uyan verilerde ortalamaları karşılaştırırken parametrik testlerden ANOVA ve posthoc testler uygulandı. Verilerin bilgisayarda hesaplanmasında *statistical packages for*

social sciences (SPSS) (SPSS for Windows 17.0; SPSS, Chicago, Illinois, A.B.D) yazılım programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Bilirubin ve Ginkgo Alkaloid Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

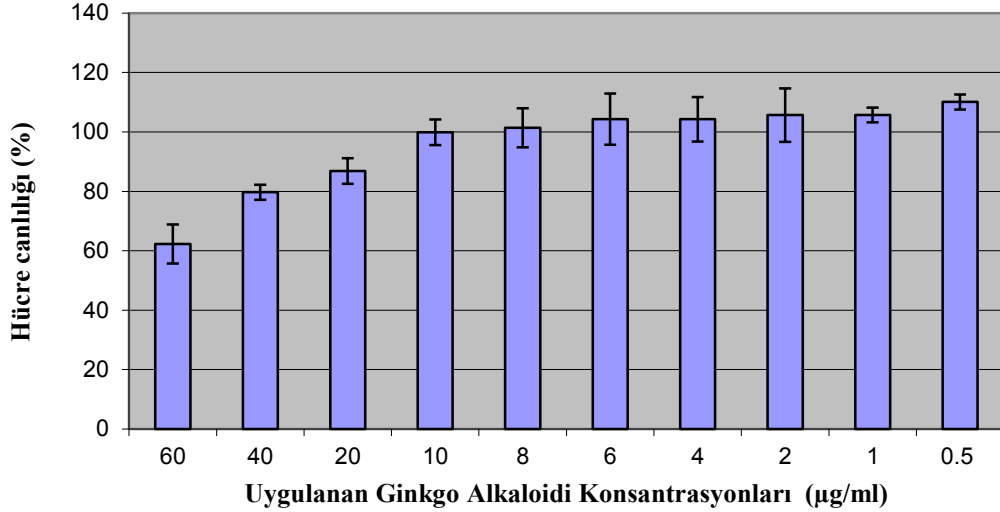
Astrosit hücre kültürüne farklı konsantrasyonlarda bilirubin uygulandıktan sonra 48. saatte hücre canlılığı belirlendi. Sonuçlar uygulanan konsantrasyon: % hücre canlılığı±standart sapma olarak verildi. Sırasıyla 400 μ M: % 19.9±1.5, 200 μ M: % 23.5±1.5, 100 μ M: % 25.3±1.5, 80 μ M: % 31.7±3.1, 60 μ M: % 33.5± 4.1, 40 μ M: % 37.1±1.5, 20 μ M: % 41.6±1.5, 10 μ M: % 50.7±1.5, 8 μ M: % 57±2.7, 5 μ M: % 60.6±4.1, 4 μ M: % 69.7±1.5, 2 μ M: % 75±1.4, 1 μ M: % 79.7±1.5 ve 0.5 μ M: % 82.4±1.5 saptandı (Şekil 5). Astrosit hücrelerinin % 50'sine toksik etkili olan indirekt bilirubin konsantrasyonu (TC_{50}) 10 μ M olarak tespit edildi. Sitotoksisite, apoptozis deneylerinde 10 μ M konsantrasyonu kullanıldı.



Şekil 5 : Uygulanan bilirubin konsantrasyonları ve TC_{50} değeri

Astrosit hücre kültürüne farklı konsantrasyonlarda EGB-761 uygulandıktan sonra 48. saatte hücre canlılığı belirlendi. Sonuçlar uygulanan konsantrasyon: % hücre canlılığı ± standart sapma olarak verildi. Sırasıyla 60 μ g/ml: % 62.3±6.6, 40 μ g/ml: % 79.7±2.5, 20 μ g/ml: % 86.9±4.3, 10 μ g/ml: % 99.9±4.3, 8 μ g/ml: % 101.4±6.6, 6 μ g/ml: % 104.3±8.6, 4 μ g/ml: % 104.3±7.5, 2 μ g/ml: % 105.7±9.0, 1

$\mu\text{g/ml}$: % 105.7 ± 2.5 ve $0.5 \mu\text{g/ml}$: % 110.1 ± 2.5 saptandı (Şekil 6). Ginkgo alkaloidi için hücre canlılığını %100 ve en fazla (%110) arttıran değerler sırasıyla $10 \mu\text{g/ml}$, $0.5 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi ve sitotoksosite ölçümünde bu konsantrasyonlar kullanıldı. Apoptozis deneylerinde ise daha etkin olan ginkgo alkaloidinin $10 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu kullanıldı.



Şekil 6: Uygulanan ginkgo alkaloid konsantrasyonları

Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Grupların hücre canlılığı 48. saatte değerlendirildi. Başlangıçtaki hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi. Kontrol grubunda hücre canlılığının başlangıca göre % 147.1 ± 25.2 'ye ulaştığı, bilirubin¹⁰ grubunda ise başlangıçtaki hücrelerin % 69.9 ± 5.7 'sinin canlı kaldığı görüldü. Kontrol grubuna göre bilirubin¹⁰ grubunda hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0.001$). Hücre canlılığının ginkgo¹⁰ grubunda % 151.5 ± 14.8 , ginkgo^{0.5} grubunda % 162.7 ± 10.3 'e ulaştığı görüldü. Bilirubin¹⁰ grubuna göre kontrol, ginkgo¹⁰ ve ginkgo^{0.5} gruplarında hücre canlılığındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0.001$). Bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubunda hücre canlılığının başlangıca göre % 117.9 ± 16.4 , bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} grubunda % 105.5 ± 12.3 , ginkgo^{0.5}+bilirubin¹⁰ grubunda % 134.4 ± 18.8 , ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ grubunda % 147.2 ± 10.2 'ye ulaştığı görüldü. Ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ ve ginkgo^{0.5}+bilirubin¹⁰ gruplarında hücre canlılığındaki artış

kontrol grubuna göre farklı değildi ($p > 0.05$). Kontrol grubu ile bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ ve bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} grupları arasında hücre değişimi açısından anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p = 0.039$, $p = 0.001$) (Tablo 2, Şekil 7 ve 8).

Tablo 2: Grupların hücre canlılığındaki değişim (%)

Gruplar*	Hücre canlılığındaki değişim (%)
Kontrol	147.1±25.2
Bilirubin ¹⁰	69.9±5.7 [#]
Bilirubin ¹⁰ +ginkgo ¹⁰	117.9±16.4 [£]
Bilirubin ¹⁰ +ginkgo ^{0.5}	105.5±12.3 ^{&}
Ginkgo ¹⁰	151.5±14.8 [§]
Ginkgo ^{0.5}	162.7± 10.3 ^{§§}
Ginkgo ¹⁰ +bilirubin ¹⁰	147.2±10.2 [£]
Ginkgo ^{0.5} +bilirubin ¹⁰	134.4±18.8 ^{££}

*Tüm gruplar 0-48. saat hücre canlılığında değişim açısından karşılaştırıldığında ($p < 0.001$).

[#] Bilirubin¹⁰ grubunda hücre canlılığındaki değişim bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} hariç tüm gruplarla karşılaştırıldığında ($p < 0.001$), bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} ile karşılaştırıldığında ($p = 0.005$).

[£] Bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubunda hücre canlılığındaki değişim kontrol, bilirubin¹⁰ grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla $p = 0.039$, $p < 0.001$).

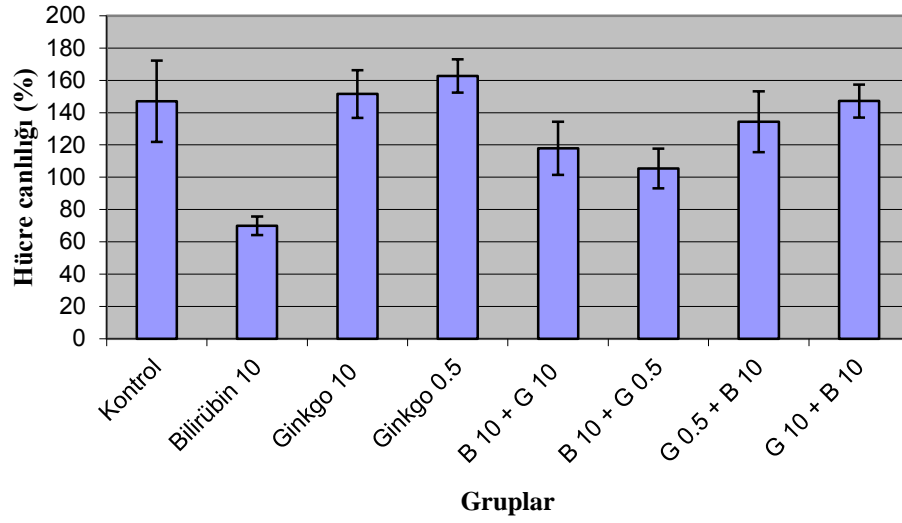
[&] Bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} grubunda hücre canlılığındaki değişim kontrol, bilirubin¹⁰ grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla $p = 0.001$, $p = 0.005$).

[§] Ginkgo¹⁰ grubunda hücre canlılığındaki değişim bilirubin¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.011$, $p < 0.001$).

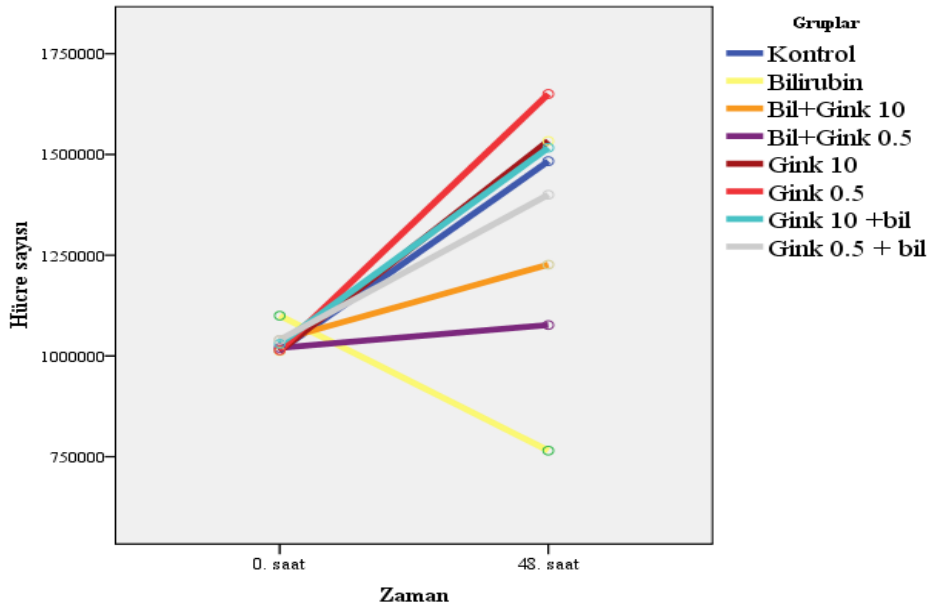
^{§§} Ginkgo^{0.5} grubunda hücre canlılığındaki artış bilirubin¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.001$).

[£] Ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ grubunda hücre canlılığındaki artış bilirubin¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.038$, $p = 0.001$).

^{££} Ginkgo^{0.5}+bilirubin¹⁰ grubunda hücre canlılığındaki artış bilirubin¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.043$).



Şekil 7 : Grupların hücre canlılığındaki değişim
B: Bilirubin, G:Ginkgo biloba

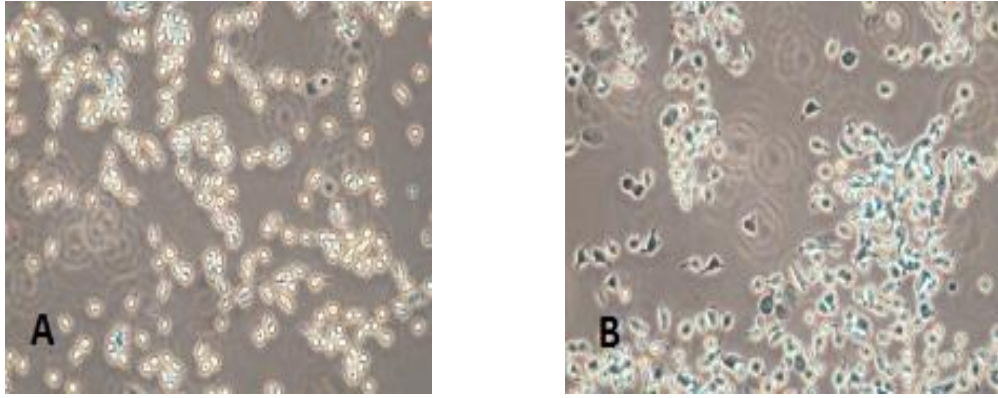


Şekil 8: Sıfırncı ve 48 saatlerde gruplardaki hücre sayılarının değişimi

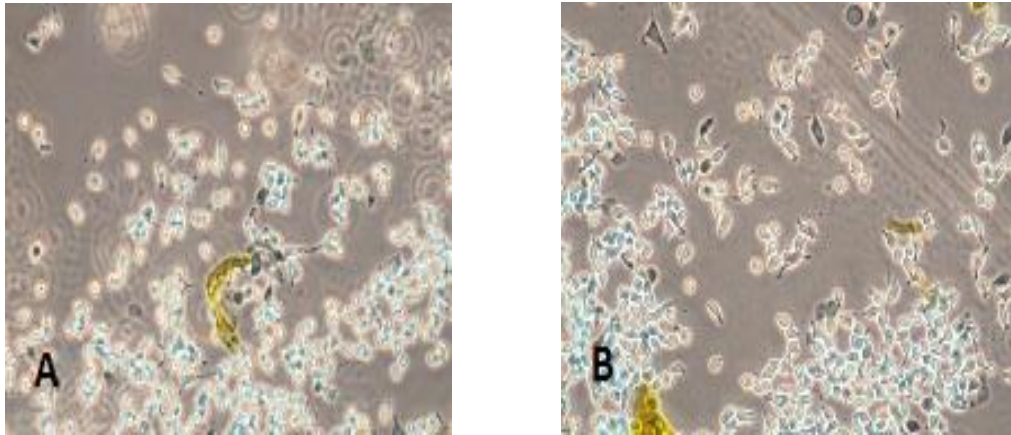
Apoptozisin Değerlendirilmesi

Astrosit hücrelerindeki apoptozis 48. saatte değerlendirildi. Kontrol grubunda apoptozis (Şekil 9-A) % 4.1±0.6, bilirubin¹⁰ grubunda (Şekil 10) %19.1±2.3, ginkgo¹⁰ grubunda (Şekil 9-B) %5.2±0.9, ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ grubunda (Şekil 11) %9.2±1.6, bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubunda (Şekil 12) %10.7±1.6 saptandı. Bilirubin¹⁰

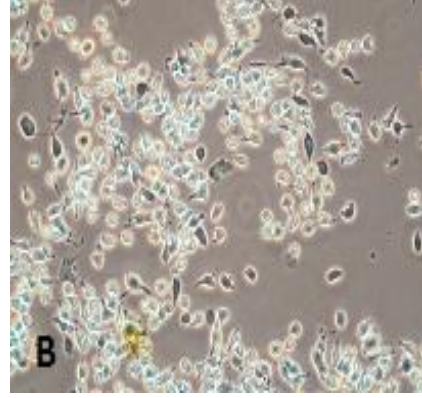
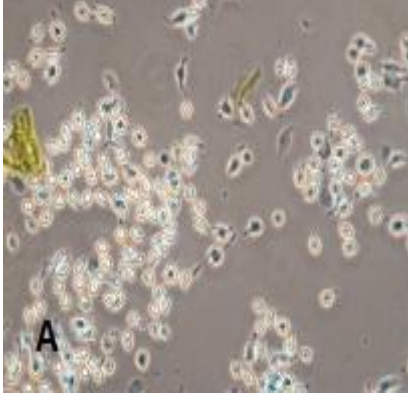
grubundaki apoptozis kontrol, ginkgo¹⁰, ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ grubundaki apoptozis kontrol, ginkgo¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında ve apoptozisteki azalma bilirubin¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.005$, $p < 0.001$). Bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubundaki apoptozis kontrol, ginkgo¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında ve apoptozisteki azalma bilirubin¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Kontrol grubu, ginkgo¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında ve bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ ile ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 3, Şekil 13).



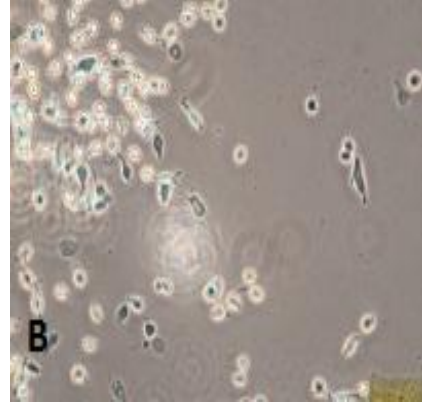
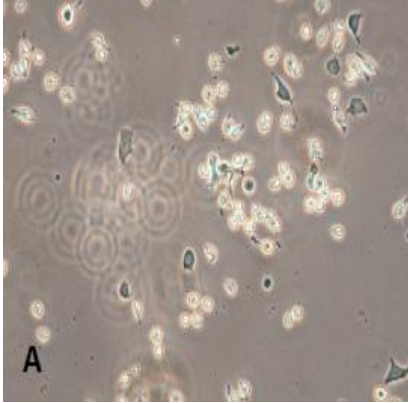
Şekil 9 : Kontrol (A) ve ginkgo¹⁰ (B) grubunda TUNEL boyama ile astrosit hücreleri.



Şekil 10 (A, B): TUNEL boyama ile astrositlerde indirekt bilirübine bağlı apoptozis (x40).



Şekil 11 (A, B): Ginkgo¹⁰+Bilirubin¹⁰ grubunda TUNEL boyama ile astrosit hücreleri (x40).



Şekil 12 (A, B): Bilirubin¹⁰+Ginkgo¹⁰ grubunda TUNEL boyama ile astrosit hücreleri (x40).

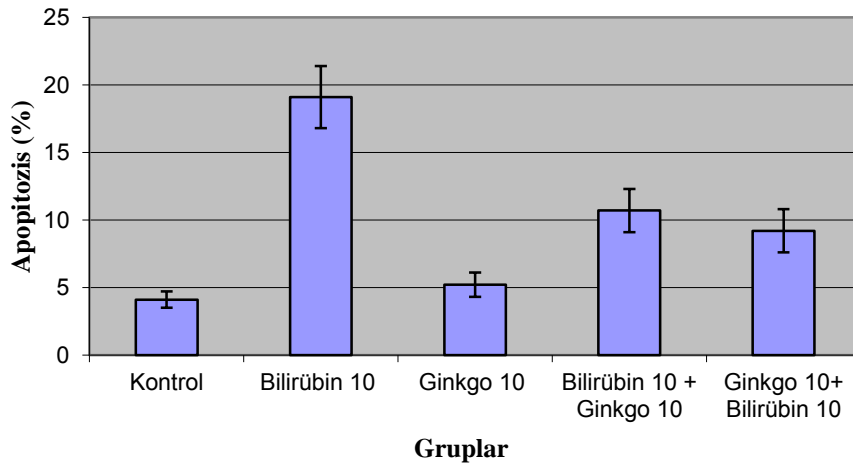
Tablo 3: Grupların astrosit hücrelerindeki apoptozisin değerlendirilmesi

Gruplar	Apoptozis (%)
Kontrol	4.1±0.6
Bilirubin ¹⁰	19.1±2.3*
Ginkgo ¹⁰	5.2±0.9
Ginkgo ¹⁰ +bilirubin ¹⁰	9.2±1.6#
Bilirubin ¹⁰ +ginkgo ¹⁰	10.7±1.6§

* Bilirubin grubundaki apoptozis kontrol, ginkgo¹⁰, ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰, bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında (p< 0.001).

Ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ grubundaki apoptozis kontrol, ginkgo¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında ve apoptozisteki azalma bilirubin¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında (sırasıyla p<0.001, p = 0.005, p< 0.001).

§ Bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubundaki apoptozis kontrol, ginkgo¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında ve apoptozisteki azalma bilirubin¹⁰ grubu ile karşılaştırıldığında (p< 0.001).



Şekil 13: Grupların astrosit hücrelerindeki apoptozisin değerlendirilmesi

TARTIŞMA

Sıklıkla fizyolojik bir durum olan yenidoğan sarılığında, bilirübinin fizyolojik düzeylerde antioksidan özellik gösterdiği ve nöroprotektif olduğu bildirilmektedir (2,4,6,17,37). Serbest bilirübin 70nM'ün altındaki konsantrasyonda SSS hücrelerini oksidatif hasara karşı korumaktadır (2,60). Dore ve Synder (61) 25 nM ve 50 nM konsantrasyonlardaki bilirübinin hipokampal hücreleri hidrojen peroksite karşı koruduğunu göstermişlerdir. Ancak yenidoğanlarda özellikle de prematürelde hepatik glukronil transferaz enzimi ve hepatik transportun yetersiz, eritrosit yıkımı ve enterohepatik dolaşımın artmış olması serum bilirübininin hızlı artışına neden olmaktadır. Ciddi hiperbilirübinemiye bağlı olarak yenidoğanlarda geri dönüşümlü bilirübin ensefalopatisi, bilirübin yüksekliği devam ederse kalıcı nörolojik hasar olan kernikterus gelişebilmektedir (2,4,37).

Yenidoğanlarda bilirübin düzeyi arttıkça sitotoksikite riski artmaktadır. Total bilirübinin 19-24 mg/dl, 25-29 mg/dl ve 30-40 mg/dl düzeylerinde sırasıyla %8, %33 ve %73 oranında kernikterusa sebep olabileceği bildirilmiştir (6). Serebellum, özellikle purkinje hücreleri, serebellar ve 4. ventrikül duvarındaki nukleuslar, bazal ganglionlar, hipokampus, kranial sinir nukleusları bilirübine karşı daha duyarlı olan bölgelerdir. Bu bölgelerin tutulumu sonucunda oluşan koreatetoid serebral palsy, yukarı bakış paralizisi ve sağırılık hiperbilirübinemiye bağlı oluşan beyin hasarının en iyi tanımlanan sekelleridir (3). Total bilirübin düzeyi 20 mg/dl ve üzerinde olan term ve sınırda term yenidoğanlarda yapılacak çalışmalarda kernikterusun tanımlanması için nörofizyolojik işitme testi (BAEP), MR ve nörolojik muayenede anormal kas tonusu kullanılabilir (39). BAEP'teki anormallikler işitsel sinir sistemindeki elektrofizyolojik değişiklikleri göstermektedir ve nöroanatomik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal değişikliklerle korelasyonu iyidir. BAEP, bilirübinin indüklediği nörolojik disfonksiyonda işitme disfonksiyonunun değerlendirilmesinde çok duyarlı ve objektif bir testtir (32,37).

İndirekt bilirübin, hem astrosit hem nöronlar için düşük düzeyde antioksidan, yüksek düzeyde sitotoksik etkili olduğundan, hücre içi konsantrasyonu düşük seviyede tutulmalıdır (4). Kan-BOS bariyeri, BOS'tan kana bilirübinin atılması,

oksidasyon ve konjugasyonla bilirübinin toksik olmayan moleküllere dönüştürülmesi ile santral sinir sistemi indirekt bilirübinin toksik etkilerine karşı korunmaktadır (37).

Bilirübini okside eden enzimler beyin, bağırsak, karaciğer ve böbreğin mitokondri membranında bulunmaktadır. Klinik deneyimler bilirubin nörotoksitesine yenidoğanların daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Bu durum immatür beyin dokusunda bilirubin oksidaz aktivitesinin matür beyin dokusuna göre daha az olması ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bilirubin oksidaz aktivitesinin genetik olarak heterojen olması, bilirübine karşı duyarlılığın bireysel olarak farklı olmasını açıklayabilmektedir. Bilirubin oksidaz, ticari olarak elde edilebilen bir preparattır ve yenidoğan sarılığında bilirübinin detoksifikasyonu için yeni bir tedavi yaklaşımıdır (23,35).

Bilirubin toksisitesinde ana hedef glial hücreler ve nöronlardır. Sinir hücrelerinden nöronların bilirübinin toksik etkisine astrositlerden daha duyarlı olduğu düşünülmektedir (5,43,62). Beyinde en yoğun hücre topluluğu olan astrositler, nöronlara metabolik, trofik destek sağladıkları ve kan-beyin bariyerinin oluşumuna katkıda buldukları için santral sinir sisteminin korunmasında kritik önem taşıyan hücrelerdir. Kan-beyin bariyerinin hasarında bilirübine ilk maruz kalan hücreler astrositlerdir (5,44,62,63). Bilirübini hücre dışına atan pompanın artmış ekspresyonu, yüksek antioksidan kapasiteleri nedeniyle astrositlerin bilirübinin oluşturduğu oksidatif hasara nöronlardan daha dirençli olduğu ve nöronları toksik hasardan koruduğu bildirilmiştir (5,44). Deneysel oluşturulan bir çok kernikterus modellerinde astrositler kullanılmıştır (5,33,34,43). Kumral ve arkadaşları (63) bilirübinin sitotoksik etkisiyle hasarlanan astrositlerin, bilirubin ensefalopatisinin patogeneğinde önemli olduğunu belirtmişlerdir. Yukarıda sözü edilen tüm bu bulgulara dayanılarak ciddi hiperbilirubinemi sırasında gelişen ensefalopatide astrositlerin önemli role sahip olduğu ve gelecekteki tedavi modellerinde astrositlerin potansiyel hedef olacağı düşünülmektedir. Toksikolojik ve nörotoksikolojik çalışmalar için çok kullanışlı olan primer hücre kültür sistemleri ayrıca farklı nöron hücrelerinin toksinlere farklı duyarlılığının değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır (47). Biz de çalışmamızda bilirübinin toksik etkisini değerlendirmek için astrositleri kullandık.

Bilirübünün biyolojik sistemlere toksik etkisi için birçok mekanizma öne sürülmüş; ancak tam olarak açıklanamamıştır (3,25). Temel hücrel mekanizma, oksidatif fosforilasyonun inhibisyonudur (6,25). Oksidatif stres, sinir sisteminde serebral iskemi, eksitotoksisite ve nörodejeneratif süreçlerin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (44). İn vitro çalışmaların meta-analizi, serbest bilirübünün mitokondri fonksiyonlarını ve astrositlerin canlılığını bozduğunu, nöronlarda apoptozisi indüklediğini göstermiştir (3,39). Kumral ve arkadaşlarının çalışmasında (63) kaspas 3 aktivasyonunun, bilirübine bağlı gelişen apoptoziste rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca bilirubin, kalsiyum dengesi ve enerji metabolizmasını etkileyerek sinir hücresi için önemli bir iyon pompası olan Na-K ATPaz'ın aktivitesini azaltmakta; bu durum hücreye glutamatın geri alımını önleyerek eksitotoksisite ve apoptozis ile sonuçlanmaktadır. Hücre membranına bağlanan bilirubin monomer ve oligomerleri membran hasarı oluşturup membran geçirgenliğini artırarak sitokrom c salınımına ve apoptozis ile hücre ölümüne neden olmaktadır (26). Enzim sistemleri ve birçok hücrel işlevin düzenlenmesi için gerekli protein/peptid fosforilasyonunun inhibisyonu (25), yapısal ve hücre iskeleti hasarını içeren morfolojik değişiklikler, iyon dengesizliği, inflamatuvar sitokinlerin salınımı, nöron gelişiminin bozulması bilirubin nörotoksisitesini açıklayan diğer mekanizmalardır (43).

İskemik atak, status epileptikus, travmatik beyin hasarı gibi bir çok nörolojik bozuklukta hasar NMDA kanal aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (32). Astrositlerin indirekt bilirübine maruziyeti glutamatın geri alımının önlenmesine, sinaptik aralıkta uzun süre kalmasına sebep olmaktadır (33). Glutamat artışıyla NMDA reseptörleri aşırı uyarılınca (eksitotoksisite) hücre içine aşırı Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- ve su girişi olmakta; bu durum hücrenin şişmesi, apoptozis ve nekrozis ile sonuçlanmaktadır (4,28). Beyinde eksitator aminoasit reseptörlerinin bulunduğu bölgeler ile bilirübine bağlı beyin hasarı olan bölgeler benzerdir (3). Mc Donald ve arkadaşları (3), NMDA'nın intraserebral enjeksiyonu ile sarılıklı Gunn ratların beyinlerinde sarılıklı olmayanlara göre çok daha belirgin hasar olduğunu histolojik olarak göstermiş; selektif ve nonkompetitif NMDA kanal antagonisti MK-801 ile akut bilirubin toksisitesinin histolojik bulgularında azalma saptamışlardır. Grojean ve arkadaşları (42) da MK-801'in bilirubin nörotoksisitesine karşı koruyucu etkisini göstermişlerdir. Ancak Shapiro ve arkadaşları (32) MK-801'in BAEP'e etkisi olmadığını bildirmişlerdir.

Llansola ve arkadaşları (64) L-karnitinin nöron hücre kültüründe glutamatın indüklediği toksisiteyi önlediğini, Taştekin ve arkadaşları (42) L-karnitin bilürübini indüklediği nöronal hücre ölümüne karşı koruyucu etkili olduğunu göstermişlerdir.

İn vitro çalışmalarda serbest bilürübini nörotoksik etkisi için eşik değerin 71-770 nM arasında değişen geniş bir aralıkta olduğu gösterilmiştir (2,31,37). Bilürübini eşik değerin bu kadar geniş bir aralıkta olması, farklı metod, hücre fonksiyonları ve maturasyonu, kültürde bekleme sürelerinin değişik olmasından kaynaklanabilmektedir (2). Taştekin ve arkadaşlarının çalışmasında (42) primer serebellar hücre kültürüne indirekt bilürubin 0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM konsantrasyonlarda uygulanmış; hücrelerin yaklaşık %50'sine toksik olan konsantrasyon (TC₅₀ değeri) 10 µM ve 100 µM saptanmıştır. Çalışmamızda primer astrosit hücre kültürüne indirekt bilürübini sırasıyla 0.5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 5 µM, 8 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM, 200 µM ve 400 µM konsantrasyonlarda uyguladık ve TC₅₀ değerini Berns ve arkadaşlarının (65), Becerir ve arkadaşlarının (66) çalışmalarındaki gibi 10 µM olarak tespit ettik. Sitotoksikite, apoptozis deneylerinde bilürübini 10 µM konsantrasyonunu kullandık. Ostrow ve arkadaşlarının (2), Kumral ve arkadaşlarının (63), Becerir ve arkadaşlarının (66) bildirdiği gibi bilürubin konsantrasyonu arttıkça hücre ölümü oranının arttığını tespit ettik. Dora ve Synder'in çalışmasında (61) gösterilen 25 nM bilürubin ile hücre canlılığındaki artış ise bizim çalışmamızda saptanmadı.

Bilürubin düzeyi, hiperbilürubineminin süresi ve bilürubine maruz kalan sinir hücrelerinin gelişme döneminde olması hücrelerde oluşan toksisiteyi etkilemektedir (39,62). Nöronlarda bilürubine bağlı hasarın astrositlere göre daha belirgin ve kalıcı olduğu, astrositlerde ise daha çok geri dönüşümlü hasar olduğu gösterilmiştir (5). Silva ve arkadaşları (5) astrositlerde 171 µM, nöronlarda 85.5 µM indirekt bilürubin ile hücre iskeleti hasarı olduğunu göstererek nöron ve astrositlerin bilürubin toksisitesine farklı cevap verdiklerini bildirmişlerdir. Genç ve arkadaşları (62) rat oligodendrosit hücre kültüründe 10 µM indirekt bilürubin ile 24., 48. ve 72 saatlerde hücre canlılığında anlamlı bir azalma olmadığını, 100 µM bilürubin ile belirgin sitotoksik etki olduğunu saptamışlardır. Grojean ve arkadaşları (31) ise primer

nöron hücre kültürüne bilirubin uyguladıktan 96 saat sonra TC_{50} değerini $1\mu M$ bulmuşlar ve $0.25\ \mu M$ 'de hücre sayısında artış saptamışlardır. Çalışmamızda TC_{50} değerinin Grojen ve arkadaşlarınınkinden daha yüksek olmasının ($10\ \mu M$) nöronlara göre daha dayanıklı olan astrositlerin kullanılmasına bağlı olduğunu düşündük.

Berns ve arkadaşları (65) rat kortikal nöron kültüründe bilirubine bağlı nörotoksisitede TC_{50} değerini $10\ \mu M$ olarak saptamışlar ve ibuprofenin eklenmesiyle sitotoksisitenin anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir.

Bilirubin nörotoksisitesinin önlenmesi için birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Shapiro ve arkadaşlarının (32) NMDA kanal anatagonisti MK-801'i, Taştekin ve arkadaşlarının (42) glutamat reseptörünün indüklediği nörotoksisiteyi önlemek için L-karnitini, Brito ve arkadaşlarının (28) oksidatif strese karşı glikoursodeoksikolik asiti, Zhang ve arkadaşlarının (67) hücre içi Ca artışını engelleyerek etki eden taurini, Geiger ve arkadaşlarının (68) antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkili minosiklini kullandıkları çalışmalar bunlardan birkaçını oluşturmaktadır. Brito ve arkadaşları (43) hücre içinde bilirubine bağlı oksidatif göstergeler artarken glutasyon içeriğinin azaldığını, bilirubinin indüklediği nöron hücre ölümü ile hücre içi komponentlerin oksidasyonunun paralel olduğunu, bilirubine bağlı nöronlarda oluşan oksidatif hasara karşı glutasyon öncüsü olan N-asetil sisteinin koruyucu etkisi olduğunu göstermişler; glutasyonun bilirubinin indüklediği oksidatif hasarda yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceğini belirtmişlerdir. Becerir ve arkadaşlarının çalışmasında (66) primer astrosit hücre kültüründe bilirubinin sitotoksik etkisini önlemek için proflaktik olarak dokosaheksaenoik asit kullanılmış ve bilirubin grubuna göre hücre canlılığının arttığı, apoptozisin azaldığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda hem proflaktik hem de tedavi edici olarak uygulanan EGB-761'in primer astrosit hücre kültüründe hücre canlılığında anlamlı artış ve apoptoziste anlamlı bir azalmaya yol açarak bilirubin sitotoksisitesini azalttığı saptandı.

Geleneksel Çin tıbbında ürogenital sistem, akciğer, beyin hastalıkları ve dolaşım bozukluklarında tedavi amacıyla kullanılan ginkgo biloba, %22-27 oranında flavanoid ve %5-7 oranında terpenoid içeriğine sahiptir (8,9,13,48,50). Ginkgo bilobanın etki mekanizmaları tam olarak bilinmese de, ekstrenin heterojen yapısına bağlı çoklu etkileri olduğu bildirilmektedir (69). Kardiyovasküler sistemde arter, ven

ve kapiller perfüzyonu, eritrosit ve trombositleri etkilediği, güçlü vazorelaksan ve antiagregan etki sağladığı gösterilmiştir (48,69). Santral sinir sisteminde hipokampal nöron hücrelerinde β -amiloidin indüklediği toksisiteye karşı serbest radikal üretimi ve apoptozisi önleyerek koruyucu etkili olduğu; rat serebellar nöronlarda hidrojen peroksitin oluşturduğu oksidatif stresi azalttığı; serebellar granüler hücrelerde hidroksil radikallerine bağlı artan lipid peroksidasyonunu doza bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilerek oksidatif hasara karşı koruyucu, serbest radikalleri temizleyici etkisi olduğu bildirilmiştir (10,11,70). Makrofajlarda iNOS ekspresyonu ve NF-kB'yi baskılayarak NO üretimini azalttığı; feokramasitoma hücrelerinde doza bağımlı olarak reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) indüklediği apoptozisi azalttığı; intestinal iskemi ve reperfüzyon hasarına bağlı lipid peroksidasyonu ürünü malondialdehit (MDA) üretimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (9,13,55). Çalışmalarda EGB-761'in antioksidan özelliğinin flavonoid içeriği ile sağlandığı vurgulanmaktadır (8,9,14). Literatür taramalarında antioksidan, antiapoptotik, nöroprotektif etkisi gösterilen ginkgo bilobanın, santral sinir sisteminde NMDA kanal aktivasyonu, oksidatif hasar, hücre içi kalsiyum artışı, nekroz, apoptozis ve inflamasyon yoluyla toksik etkili olan bilirubin nörotoksitesine karşı çalışılmadığını gördük (3,6,28,32,67,68). Çalışmamızda bilirubin nörotoksitesini önleme ve tedavi etmede ginkgo bilobanın etkisini araştırdık.

Çalışmamızda ginkgo bilobanın farklı dozlarında astrosit hücrelerine etkisini araştırdık. Sırasıyla 60 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında EGB-761'i astrosit hücre kültürü ortamına uyguladık; 10 $\mu\text{g/ml}$ dozunda yaklaşık %100, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ dozunda %110 hücre canlılığı elde ettik. Bu doz literatürde de etkili doz aralığında bildirilmektedir (8). Bastianetto ve arkadaşları (10) mikst hipokampal hücre kültüründe beta amiloide bağlı nörotoksiste oluşturulduktan sonra EGB-761'in, 10 $\mu\text{g/ml}$ ve 100 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında uygulanmasıyla apoptozisin önlendiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda kontrol grubunda hücre canlılığının başlangıca göre %147.1 \pm 25.2'ye ulaştığı, bilirubin¹⁰ grubunda ise hücre canlılığının azaldığı (%69.9 \pm 5.7) görüldü. EGB-761'in proflaktik uygulanmasında ginkgo^{0.5}+bilirubin¹⁰ grubunda %134.4 \pm 18.8, ginkgo¹⁰+bilirubin¹⁰ grubunda %147.2 \pm 10.2 oranında hücre canlılığı sağlanarak nöroprotektif etki gösterildi. Benzer şekilde EGB-761 bilirubin sitotoksitesini

oluşturulduktan sonra tedavi amacıyla uygulandığında bilirubin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubunda % 117.9±16.4, bilirubin¹⁰+ginkgo^{0.5} grubunda % 105.5±12.3 oranında hücre canlılığı sağlanarak nöroprotektif etki gösterildi. Sonuç olarak EGB-761'in hem proflaktik hem tedavi edici olarak uygulanmasıyla nöroprotektif etki sağlandığı gösterildi.

Oyama ve arkadaşlarının yaptığı seri birkaç çalışmada ginkgo bilobanın nöroprotektif etkisi açık bir şekilde ortaya konmuştur. Bu seri çalışmaların ilkinde (71), ratlardan elde edilen serebellar nöron hücre kültürüne 0.1-3 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanan EGB-761'in doza bağımlı olarak istirahat halindeki hücrede oluşan hidrojen peroksit içeriğini ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığı gösterilmiştir.

Nöronlarda iskemi, bilirubin yüksekliği sonucu gelişen glutamat nörotoksitesi ve hücre içinde kalsiyum artışı hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır (31,72). Oyama ve arkadaşlarının (72) diğer bir çalışmasında, 3 µg/ml dozunda uygulanan ginkgo biloba ekstresinin memeli beyin nöronlarında Ca'un indüklediği oksidatif metabolizma artışını baskıladığı saptanmıştır. Kanada ve arkadaşlarının bir çalışmasında (73) 10 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarında ginkgo biloba ekstraktlarının, rat serebellar nöronlarında glutamat reseptörü agonisti kainata bağlı hücre içi Ca artışını anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir.

Oyama ve arkadaşlarının başka bir çalışmasında (70) ise nöronların hidrojen peroksitten önce 10 µg/ml ginkgo biloba ile muamele edilmesi, nöron ölümündeki artışı büyük ölçüde geciktirmiştir. Çalışmamızda bilirubin sitotoksitesi oluşturulmadan önce rat astrositlerine hem 0.5 µg/ml hem 10 µg/ml konsantrasyonda ginkgo biloba uygulamasının hücre canlılığını arttırdığı ve apoptozisi azalttığı gösterildi.

Serbest radikallerin hücredeki fosfolipid ve poliansatüre yağ asitlerine etki ederek oluşturduğu doymamış aldehytler olan protein karbonilleri ve HNE, sırasıyla protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu için spesifik göstergeler olup; toksik etkileri nedeniyle apoptozis ile hücre ölümüne sebep olmaktadır (26,28). Oksidatif hasarın arttığı durumlarda, serbest radikallerin uzaklaştırılması tedavi stratejisinde olmalıdır (9). Brito ve arkadaşları (26,28) primer rat astrosit hücre

kültüründe bilirübinin, serbest radikal oluşumunu, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu arttırarak oksidatif stresi indüklediğini, antioksidan defansı ve hücre canlılığını azalttığını, glükoursodeoksikolik asit (GUDCA) ile bilirübinin oluşturduğu oksidatif hasarın önlenebildiğini göstermişlerdir.

Ginkgo bilobanın, biyomebranları oksidatif strese karşı koruduğu ve serbest oksijen radikallerini tutarak hücre kaybını azalttığı bildirilmektedir (50,54). EGB-761, etyolojisinde oksidatif hasarın gösterildiği Alzheimer ve nöronal hipokside tedavi edici ajan olarak kullanılmaktadır (9). Ginkgo bilobanın içindeki flavanoid fraksiyonun, süperoksit anyonu, hidroksil, lipid peroksit radikalleri gibi oksijen radikallerinin temizlenmesinde önemli rolü olduğu saptanmıştır (54). Yağmurca ve arkadaşları (50) ratlarda sisplatin ile indüklenmiş böbrek hasarını ginkgo bilobanın düzelttiğini saptamışlardır. Ginkgo bilobanın bu etkiyi antioksidan aktivitesi, süperoksit ve hidroksil radikallerini yakalayarak hücreleri lipid ve protein oksidasyonuna karşı koruması, platelet aktive edici faktörün inhibisyonu, kan dolaşımını arttırıp hücrelerin oksijen kullanımına ve toksinlerin atılmasına olanak sağlayarak gerçekleştirdiği düşünülmüştür (50). Zhou ve arkadaşları (55) bilobalidlerin doza bağımlı olarak ROS'un indüklediği apoptozisi azalttığını göstermişlerdir. Kumral ve arkadaşları (63) fare astrosit hücre kültürüne ısı ile inaktive edilmiş hiperbilirübinemik serumu farklı konsantrasyon (% 1-20) ve farklı sürelerde (24, 48 ve 72. saatlerde) uygulamışlar; sitotoksisite ve apoptozisin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak arttığını göstermişlerdir.

Bilirübine bağlı apoptotik hücre ölümünün NMDA reseptör aktivasyonu sonucu oluşan eksitotoksisite, mitokondri fonksiyonlarının bozulması, proapoptotik Bax translokasyonu, Na-K ATPaz aktivitesinde azalma, hücre içi kalsiyum düzeyinin artışı, oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu, hücre içi sitokrom c artışı, hücre iskeletinin bozulması ile geliştiği düşünülmektedir (4,5,26,31,34,42,74). Çalışmamızda bilirübin sitotoksisitesini önlemek amacıyla kullandığımız EGB-761'in literatürde mitokondrial fonksiyonları koruyarak, proapoptotik kaspaz-3, Bax, c-Myc ve p-53'ü azaltarak, antiapoptotik Bcl-2 aktivitesini arttırarak, eksitotoksik hasardan koruyarak, antioksidan enzim aktivitelerinin artışıyla oksidatif hasardan koruyarak, lipid peroksidasyonunu

azaltarak antiapoptotik etkili olduğu bildirilmiştir (11-12,53,55,75). Çalışmamızda bilirübine bağlı apoptotik hücre ölümü TUNEL boyama yöntemiyle değerlendirildi. Astrosit hücre kültüründe 10 µM konsantrasyonda indirekt bilirübünün, kontrol grubuna göre beş kat fazla (%4.1±0.6'ya karşılık %19.1±2.3) apoptozis oluşturduğu ve 10 µg/ml konsantrasyonlardaki ginkgo alkaloidin profilaktik (%9.2±1.6) ve tedavi edici (%10.7±1.6) olarak kullanılması ile apoptozisin azaldığı saptandı. Bilirübünün hücre ölümünü belirgin arttırdığını, bilirübünden önce proflaktik, bilirübünden sonra tedavi edici olarak verilen ginkgo bilobanın hücre ölümünü anlamlı olarak azalttığını saptadık.

Aerobik metabolizma sırasında, normal hücre fonksiyonun bir parçası olarak sürekli oluşan serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı hücrelerin korunma mekanizmaları bulunmaktadır. Vücuttaki oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki denge oksidan güçler lehine bozulduğunda hücre ve doku hasarı meydana gelmekte, oksidatif stresle ilişkili hastalıklar oluşmaktadır (76,77). Dokularda oksidatif hasara karşı antioksidan enzim sistemleri SOD, CAT, GPx'dir. Enzimatik olmayan endojen antioksidanların en önemlilerinden biri ise glutatyondur (44,78). Oksidatif hasarın önlenmesinde hayati önemi olan SOD, süperoksitin H₂O₂'ye dismutasyonunu hızlandırır ve birincil savunmada rol alır. Daha sonra CAT enzimi oluşan H₂O₂'yi H₂O ve O₂'ye dönüştürerek detoksifiye eder. GPx hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştıran ve intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir (76).

Dokuda GPx, SOD ve CAT aktivitesinde azalma serbest radikal oluşumunun indirekt göstergesidir (54). EGB-761'in Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında rat hipokampusunda ve ileusta rat ileumunda SOD, CAT gibi antioksidan enzim aktivitetlerini ve fare karaciğerinde glutatyon redüktaz aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (79-81). Iraz ve arkadaşlarının çalışmasında (54) bleomisine bağlı akciğer fibrozisi oluşturulan ratlarda SOD ve CAT aktivitesinin azaldığı; ginkgo bilobanın bu enzimlerin aktivitetlerini arttırdığı gösterilmiştir. Liu ve arkadaşları (9) intestinal iskemi/reperfüzyonla indüklenen akciğer hasarını EGB-761'in, SOD aktivitesini arttırarak, MDA düzeyi ve myeloperoksidaz aktivitesini azaltarak, NO oluşumunu süprese ederek azalttığını göstermişlerdir.

Keskin ve arkadaşlarının çalışmasında (76) ratlarda bilirübinin oksidatif stresi arttırdığı; SOD, CAT, GR, glutasyon s-transferaz aktivitelerini ve glutasyon düzeyini düşürdüğü, GPx ve myeloperoksidaz aktivitesini arttırdığı saptanmış. Bu çalışmada L-karnitin, lipid peroksidasyonu, GPx, myeloperoksidaz, glutasyon s-transferaz aktivitelerini azaltırken, SOD, CAT, GR aktivitelerini ve glutasyon düzeyini arttırdığı gösterilmiş ve L-karnitin bilirübin toksisitesinin tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmış. Güleç ve arkadaşlarının çalışmasında (49) sisplatin nefrotoksitesisi oluşturulan sıçanlarda azalan GPx aktivitesinin, EGB-761'in etkisi ile arttığı gösterilmiştir. Antioksidan enzim aktiviteleri çalışılmamakla birlikte bu çalışmada EGB-761'in nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir.

Oksidatif stres belirteçleri ile TNF- α salınımı ve NF- κ B'nin aktivasyonu koreledir. Bilirübinin etkisi ile astrositler ve nöronlardan NF- κ B ve mitojen aktive edici protein kinazın aracılığıyla TNF- α , IL-1 β , IL-6 (interlökin altı) sekresyonu artıp inflamatuvar reaksiyona sebep olmaktadır. Sitokinlerin astroglial hücrelerin ölümünü indükleyici etkisi vardır. Bu kaskadı bloke edecek ajanların indirekt bilirübine bağlı beyin hasarını önlenebileceği düşünülmektedir (28,33).

NO, sinir sisteminde bir çok fizyolojik ve patolojik süreçlerden sorumlu tutulan bir moleküldür. Nörolojik bozukluklarda artan NO'in kompleks IV ile reaksiyonuyla mitokondrial solunum zincirinde geri dönüşümlü, süperoksit anyonu ile reaksiyonuyla peroksinitrite bağlı geri dönüşümsüz hasar oluşmaktadır (54,82). Yapılan çalışmalarda bilirübinin iNOS ve nNOS yoluyla NO yapımını arttırarak sitotoksitesiteye yol açtığı gösterilmiştir (62,83). Ginkgo biloba ile yapılan deneysel çalışmalarda; Liu ve arkadaşları (9) EGB-761'in, iNOS'un ekspresyonunu engelleyerek intestinal iskemi-reperfüzyonla indüklenen akciğer hasarını azalttığını; Iraz ve arkadaşları (54) serbest radikal süpürücü, antioksidan, antinitrozatif etkileriyle akciğerlerde bleomisine bağlı fibrozis gelişimini engellediğini; Varga ve arkadaşları (84); iNOS ekspresyonu inhibisyonuyla postiskemik kardiyak fonksiyonları düzelttiğini; Kubota ve arkadaşları (14) ratlarda endotelde NO regülasyonunu sağlayarak antihipertansif etki sağladığını; Park ve arkadaşları (13) makrofajlarda NF- κ B'nin aktivasyonunu bloke ederek, lipopolisakkaritlerin indüklediği NO, COX2, TNF- α üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Bastianetto ve arkadaşları (85) 10-100 µg/ml dozlarında uygulanan EGB-761'in hipokampal hücrelerde NO'in toksik etkilerini önlediğini göstermişlerdir. Abdel-Kader ve arkadaşlarının çalışmasında (82) 10-100 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanan EGB-761'in, mitokondri fonksiyonlarını düzelterek ve antinitrozatif etkiyle nöroprotektif etki sağladığı gösterilmiştir. NO düzeyleri çalışılmamakla birlikte bizim çalışmamızda bilirubin nörotoksitesine karşı hem proflaktik hem tedavi edici olarak 10 µg/ml dozunda uygulanan EGB-761 ile bilirubin nörotoksitesine karşı nöroprotektif etki sağlanabilmiştir. Çalışmamızda EGB-761'in antioksidatif, antinitrozatif ve antiapoptotik etkileriyle bilirubin sitotoksitesini önlediği düşünüldü.

Bu çalışmayla bilirubin'in in vitro olarak astrosit hücrelerine sitotoksik etkili olduğu ve ginkgo bilobanın bilirubin'in sitotoksik etkilerini azalttığı gösterildi. Bu çalışmada ginkgo bilobanın koruyucu etki mekanizmaları araştırılmamakla birlikte; antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar, antinitrozatif ve eksitotoksiteden koruyucu etkileriyle bilirubin sitotoksitesini önlediği düşünüldü. Gelecekte bu konu ile ilgili yapılacak başka çalışmalarla bilirubin toksitesine karşı ginkgo bilobanın koruyucu etki mekanizmaları ortaya konarak profilaksi ve tedavide kullanımı mümkün olabilir.

SONUÇLAR

1. Astrosit hücre kültüründe 0.5-400 μM konsantrasyonlarda uygulanan bilirübinin 0.5 μM konsantrasyonda en düşük (%18), 400 μM konsantrasyonda en yüksek (%80) hücre ölümüne yol açtığı, indirekt bilirübin konsantrasyonu arttıkça astrosit hücre ölüm oranının arttığı saptandı.
2. Astrosit hücrelerinin % 50'sine toksik etkili olan indirekt bilirübin konsantrasyonu (TC_{50}) 10 μM olarak saptandı.
3. Ginkgo alkaloidi için hücre canlılığını %100 ve en fazla (%110) arttıran konsantrasyonlar sırasıyla 10 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi ve sitotoksosite ölçümünde bu konsantrasyonlar kullanıldı.
4. Kontrol grubunda hücre canlılığının başlangıca göre %147.1 \pm 25.2'ye ulaştığı, bilirübin¹⁰ grubunda ise hücre canlılığının yarı yarıya azaldığı (%69.9 \pm 5.7) görüldü. EGB-761'in proflaktik uygulanmasında ginkgo^{0.5}+bilirübin¹⁰ grubunda %134.4 \pm 18.8, ginkgo¹⁰+bilirübin¹⁰ grubunda %147.2 \pm 10.2 oranında hücre canlılığı sağlanarak nöroprotektif etki gösterildi. Benzer şekilde EGB-761 bilirübin sitotoksitesisi oluşturulduktan sonra tedavi amacıyla uygulandığında bilirübin¹⁰+ginkgo¹⁰ grubunda %117.9 \pm 16.4, bilirübin¹⁰+ginkgo^{0.5} grubunda %105.5 \pm 12.3 oranında hücre canlılığı sağlanarak nöroprotektif etki gösterildi. Sonuç olarak EGB-761'in proflaktik kullanımında daha belirgin olmak üzere, hem proflaktik hem tedavi edici olarak uygulanmasıyla nöroprotektif etki sağlandığı gösterildi ($p<0.001$, $p<0.001$).
5. Astrosit hücre kültüründe 10 μM konsantrasyonda indirekt bilirübinin, kontrol grubuna göre beş kat fazla (%4.1 \pm 0.6'ya karşılık %19.1 \pm 2.3) apoptozis oluşturduğu ve 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlardaki ginkgo alkaloidin profilaktik (%9.2 \pm 1.6) ve tedavi edici (%10.7 \pm 1.6) olarak kullanılması ile apoptozisin azaldığı saptandı. Bilirübinin hücre ölümünü belirgin arttırdığını ($p<0.001$), bilirübinden önce proflaktik, bilirübinden sonra tedavi edici olarak verilen ginkgo bilobanın hücre ölümünü anlamlı olarak azalttığını saptadık ($p<0.001$, $p<0.001$).

KAYNAKLAR

1. Alpay F, Sarılık. Yurdakök M, Erdem G. ed. Türk Neonatoloji Derneği Neonatoloji. Ankara: Alp Ofset, 2004: 559-578.
2. Ostrow JD, Pascolo L, Tiribelli C. Reassessment of the unbound concentrations of unconjugated bilirubin in relation to neurotoxicity in vitro. *Pediatr Res* 2003;54: 98-104.
3. Mc Donald JW, Shapiro SM, Silverstein FS, Johnston MV. Role of glutamate receptor-mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the guinea pig model. *Exp Neurol* 1998;150: 21-29.
4. Ostrow JD, Pascolo L, Brites D, Tiribelli C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends Mol Med* 2004;10: 65-70.
5. Silva RFM, Rodrigues CMP, Brites D. Rat cultured neuronal and glial cells respond differently to toxicity of unconjugated bilirubin. *Pediatr Res* 2002;51: 535-541.
6. Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol* 2003;29: 410-421.
7. Watchko JF. Neonatal indirect hyperbilirubinemia and kernicterus. In: Gleason CA, Devaskar SU, eds. *Avery's diseases of the newborn*. 9 th Ed. Philadelphia:Elsevier Saunders, 2012: 1123-1142.
8. Ahlemeyer B, Kriegstein J. Neuroprotective effects of ginkgo biloba extract. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60: 1779-1792.
9. Liu KX, Wu WK, He W, Liu CL. Ginkgo biloba extract (EGB-761) attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: roles of oxidative stress and nitric oxide. *World J Gastroenterol* 2007;13: 299-305.
10. Bastianetto S, Ramassamy C, Dore S, Christen Y, Poirier J, Quirion R. The ginkgo biloba extract (EGB-761) protects hippocampal neurons against cell death induced by β -amyloid. *Eur J Neurosci* 2000;12: 1882-1890.

11. Xin W, Wei T, Chen C, Ni Y, Zhao B, Hou J. Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals and the effects of EGB-761 and its constituents. *Toxicology* 2000;148: 103-110.
12. Defeudis FV. Bilobalide and neuroprotection. *Pharmacol Res* 2002;46: 565-568.
13. Park YM, Won JH, Yun KJ, Ryu JH, Han YN, Choi SK, et al. Preventive effect of ginkgo biloba extract (GBB) on the lippopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression of nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 985-990.
14. Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, et al. Effects of ginkgo biloba extract feeding on salt-induced hypertensive Dahl rats. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 266-269.
15. Sarıcı SÜ, Saldır M. Yenidoğan sarılıklarına acil yaklaşım. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2007;3: 1-7.
16. Çetinkaya M, Köksal N, Özkan H. Yenidoğan sarılıklarında tedavi yaklaşımı. *Güncel Pediatri* 2006; 3: 118-123.
17. Cohen RS, Wong RJ, Stevenson DK. Understanding neonatal jaundice: a perspective on causation. *Pediatr Neonatol* 2010;51: 143-148.
18. Can G, Çoban A, İnce Z. Yenidoğanda sarılık. Neyzi O, Ertuğrul T. ed. *Pediatri*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2010: 467-490.
19. Ovalı F. İndirekt hiperbilirübinemi. Dağoğlu T, Ovalı F. ed. *Neonatoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2007: 517-536.
20. Kaplan M, Wong RJ, Sibley E, Stevenson DK. Neonatal jaundice and liver disease. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. *Fanaroff and Martin's neonatal-perinatal medicine. Diseases of the fetus and infant. 9 th ed.* Philadelphia:Elsevier Mosby, 2011: 1443-96.
21. Kul M, Tunç T. Neonatal kolestaz. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2009;18: 105-16.

22. Gomella TL, Cunningham MD, Eyal FG. Hyperbilirubinemia, direct (conjugated hyperbilirubinemia). *Neonatology: management, procedures, on-call problems, diseases and drugs* (6th ed). New York: The McGraw Hill Companies Inc, 2009:288-293.
23. Hansen TWR. Bilirubin oxidation in brain. *Mol Genet Metab* 2000;71: 411-417.
24. Vural M. Bilirubin nörotoksitesisi. *Güncel Pediatri* 2008; 1: 112-113.
25. Hansen TWR. Bilirubin brain toxicity. *J Perinatol* 2001;21: S48-S51.
26. Brito MA, Brites D, Butterfield DA. A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes. *Brain Res* 2004;1026: 33-43.
27. McDonagh AF. Controversies in bilirubin biochemistry and their clinical relevance. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;30: 1-7.
28. Brito MA, Lima S, Fernandes A, Falcao AS, Silva RFM, Butterfield DA, et al. Bilirubin injury to neurons: Contribution of oxidative stress and rescue by glycoconjugated deoxycholic acid. *Neurotoxicology* 2008;29: 259-269.
29. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutasyonun rolü. *T Klin Tıp Bilimleri* 2002;22: 442-448.
30. Aktaş M, Değirmenci U, Ercan SK, Tamer L, Atik U. Redükte glutasyon ölçümünde HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2005;3: 95-99.
31. 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: 334-341.
32. Shapiro SM, Sombati S, Geiger A, Rice AC. NMDA channel antagonist MK-801 does not protect against bilirubin neurotoxicity. *Neonatology* 2007;92: 248-257.
33. Fernandes A, Vaz AR, Falcao AS, Silva RFM, Brito MA, Brites D. Glycoconjugated deoxycholic acid and interleukin-10 modulate the reactivity of rat cortical astrocytes to unconjugated bilirubin. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66: 789-798.

34. Silva RFM, Rodrigues CMP, Brites D. Bilirubin induced apoptosis in cultured rat neural cells in aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 2001;34: 402-408.
35. 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.
36. Bhutani VK, Johnson L. Kernicterus in the 21st century: frequently asked questions. *J Perinatol* 2009;29: 20-24.
37. Ostrow JD, Pascolo L, Shapiro SM, Tiribelli C. New concepts in bilirubin encephalopathy. *Eur J Clin Invest* 2003;33: 988-997.
38. Çoban A. İndirekt hiperbilirubinemi tedavisi. *Güncel Pediatri* 2006;4: 114-117.
39. Shapiro SM. Definition of the clinical spectrum of kernicterus and bilirubin-induced neurologic dysfunction (BIND). *J Perinatol* 2005;25:54-59.
40. Shapiro SM. Chronic bilirubin encephalopathy: diagnosis and outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;15: 157-163.
41. Acunaş B. Hiperbilirubinemide tedavi. *Güncel Pediatri* 2008;6: 114-118.
42. 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: 436-439.
43. Brito MA, Rosa AI, Falcao AS, Fernandes A, Silva RFM, Butterfield, et al. Unconjugated bilirubin differentially affects the redox status of neuronal and astroglial cells. *Neurobiol Dis* 2008;29: 30-40.
44. Yılmaz Ö, Taşkıran D. Astrosit hücre kültürlerinde pH değişikliğinin yarattığı toksisite ve glutasyonun koruyucu etkisi. *J Neurol Sci (Turk)* 2010; 22:61-68.
45. Lanone S, Bloc S, Foresti R, Almolki A, Callebert J, Conti M, et al. Bilirubin decreases NOS2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. *FASEB J* 2005; 19: 1890-2.

46. Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 5918-5922.
47. Silva RFM, Falcao AS, Fernandes A, Gordo AC, Brito MA, Brites D. Dissociated primary nevre cell cultures as models for assesment of neurotoxicity. *Toxicol Lett* 2006; 163: 1-9.
48. Kızılcın S, İlhan A, Özişik HI, Özcan C. Vertebrobaziler yetmezlikte ginkgo biloba ekstrelerinin transkraniyal doppler ultrasonografi ile değerlendirilmesi: Ön çalışma. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2003;10: 63-66.
49. Güleç M, Yılmaz HR, Iraz M, Ağlamış S, Söğüt S. Sisplatin nefrotoksisitesi oluşturulan sıçanların plazma glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, adenzin deaminaz aktiviteleri ve nitrik oksit seviyelerine ginkgo biloba ekstraktının etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2004;24: 585-591.
50. Yağmurca M, Baş O, Şahin Ö, Nacar A, Yüksel Ş, Narcı A. Ratlarda sisplatin ile indüklenmiş böbrek hasarına karşı melatonin ve ginkgo bilobanın koruyucu etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2007;8: 29-34.
51. Shi-hai XIA, Dian-chun FANG. Pharmacological action and mechanisms of ginkgolide B. *Chin Med J* 2007;120: 922-928.
52. MacLennan KM, Darlington CL, Smith PF. The CNS effects of ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Prog Neurobiol* 2002;67: 235-257.
53. Erdogan H, Fadillioglu E, Kotuk M, Iraz M, Tasdemir S, Oztas Y, et al. Effects of ginkgo biloba on plasma oxidant injury induced by bleomycin in rats. *Toxicol Ind Health* 2006;22: 47-52.
54. Iraz M, Erdogan H, Kotuk M, Yagmurca M, Kilic T, Ermis H, et al. Ginkgo biloba inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Pharmacol Res* 2006;53: 310-316.
55. Zhou LJ, Zhu XZ. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293: 982-988.

56. Klein J, Chatterjee SS, Löffelholz K. Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of ginkgo biloba. *Brain Res* 1997;755: 347-350.
57. McCarthy KD, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980;85: 890-902.
58. 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*. New York: Alan R. Liss, 1989: 121-133.
59. 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.
60. Branano DE, Rao M, Ferris CD, Synder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 16093-16098.
61. Dore S, Synder SH. Neuroprotective action of bilirubin against oxidative stress in primary hippocampal cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1999;890: 167-172.
62. Genc S, Genc K, Kumral A, Baskin H, Ozkan H. Bilirubin is cytotoxic to rat oligodendrocytes in vitro. *Brain Res* 2003;985: 135-141.
63. 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.
64. Llansola M, Felipo V. Carnitine prevents NMDA receptor-mediated activation of MAP-kinase and phosphorylation of microtubule-associated protein 2 in cerebellar neurons in culture. *Brain Res* 2002; 947: 50-56.
65. Berns M, Toennesen M, Koehne P, Altmann R, Obladen M. Ibuprofen augments bilirubin toxicity in rat cortical neuronal culture. *Pediatr Res* 2009; 65: 392-396.

66. Becerir C, Kılıc I, Sahin O, Ozdemir O, Tokgun O, Ozdemir B, et al. The protective effect of docosahexaenoic acid on the bilirubin neurotoxicity. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2012 May 16. (Epub ahead of print)
67. Zhang B, Yang X, Gao X. Taurine protects against bilirubin-induced neurotoxicity in vitro. *Brain Res* 2010;1320: 159-167.
68. Geiger AS, Rice AC, Shapiro SM. Minocycline blocks acute bilirubin-induced neurological dysfunction in jaundiced Gunn rats. *Neonatology* 2007;92: 219-226.
69. McKenna DJ, Jones K, Hughes K. Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med* 2001;7: 70-86, 88-90.
70. Oyama Y, Chikahisa L, Ueha T, Kanemaru K, Noda K. Ginkgo biloba extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Res* 1996;712: 349-352.
71. Oyama Y, Ueha T, Hayashi A, Chikahisa L, Noda K. Flowcytometric estimation of the effect of ginkgo biloba extract on the content of hydrogen peroxide in dissociated mammalian brain neurons. *Jpn J Pharmacol* 1992;60: 385-388.
72. Oyama Y, Hayashi A, Ueha T. Ca^{+2} -induced increase in oxidative metabolism of dissociated mammalian brain neurons: effect of extract of ginkgo biloba leaves. *Japan J Pharmacol* 1993;61: 367-370.
73. Kanada A, Nishimura Y, Yamaguchi J, Kobayashi M, Mishima K, Horimoto K, et al. Extract of ginkgo biloba leaves attenuates kainate-induced increase in intracellular Ca^{+2} concentration of rat cerebellar granule neurons. *Biol Pharm Bull* 2005;28: 934-936.
74. Rodrigues CMP, Sola S, Brites D. Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons. *Hepatology* 2002;35: 1186-95.
75. Kampkötter A, Pielarski T, Rohrig R, Timpel C, Chovolou Y, Watjen W, et al. The ginkgo biloba extract EGB-761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation

and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. Pharmacol Res 2007;55: 139-147.

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

77. Sies H. Oxidative stres: Oxidants and antioxidants. Exp Physiol 1997;82: 291-295.

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

79. Bridi R, Crossetti FP, Steffen VM, Henriques AT. The antioxidant activity of standardized extract of ginkgo biloba (EGB-761) in rats. Phytother Res 2001;15: 449-51.

80. Colak O, Sahin A, Alatas O, Inal M, Yasar B, Kiper H. The effect of ginkgo biloba on the activity of catalase and lipid peroxidation in experimental strangulation ileus. Int J Clin Lab Res 1998;28: 69-71.

81. Sasaki K, Hatta S, Wada K, Ueda N, Yoshimura T, Endo T, et al. Effects of extract of ginkgo biloba leaves and its constituents on carcinogen-metabolizing enzyme activities and glutathione levels in mouse liver. Life Sci 2002;70: 1657-67.

82. Abdel-Kader R, Hauptmann S, Keil U, Scherping I, Leuner K, Eckert A, et al. Stabilization of mitochondrial function by ginkgo biloba extract (EGB-761). Pharmacol Res 2007;56: 493-502.

83. Park WS, Chang YS, Lee M. Effect of 7-nitroindazole on bilirubin-induced changes in brain cell membrane function and energy metabolism in newborn piglets. Biol Neonate 2002;82: 61-65.

84. Varga E, Bodi A, Ferdinandy P, Droy-Lefaix MT, Blasig IE, Tosaki A. The protective effect of EGB-761 in isolated ischemic/reperfused rat hearts: a link

between cardiac function nitric oxide production. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34: 711-7.

85. Bastianetto S, Zheng W-H, Quirion R. The ginkgo biloba extract (EGB-761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J Neurochem* 2000;74: 2268-2277.