

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


**DOKOSAHEKSAENOİK ASİDİN BİLİRUBİN  
NÖROTOKSİSİTESİNİ ÖNLEMEDE PROFLAKTİK ETKİSİ**


**UZMANLIK TEZİ  
DR. CEM BECERİR**


**DANIŞMAN  
YRD. DOÇ. DR. ÖZMERT MA. ÖZDEMİR**

**DENİZLİ-2011**

Yrd. Doç. Dr. Özmert MA. ÖZDEMİR danışmanlığında Dr. Cem BECERİR tarafından yapılan “Dokosaheksaenoik Asidin Bilirubin Nörotoksisitesini Önlemede Proflaktik Etkisi” başlıklı tez çalışması 30/06/2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

  
BAŞKAN : Prof. Dr. Hacer ERGİN

  
ÜYE : Doç. Dr. Dolunay GÜRSES

  
ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Özmert MA. ÖZDEMİR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.  
30/06/2011

Prof. Dr. Mustafa KILIÇ  
Dekan

Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı





## TEŞEKKÜRLER

Asistanlığım süresince bilgisinden ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen saygıdeğer büyüğüm ve değerli hocam Prof. Dr. İlknur Kılıç'a ve tezimin tamamlanmasında büyük katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Özmert MA. Özdemir'e

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, değerli hocalarım Prof. Dr. Hacer Ergin, Prof. Dr. Serap Semiz, Doç. Dr. Dolunay Gürses, Doç. Dr. Ahmet Akçay, Doç. Dr. Selçuk Yüksel, Yrd. Doç. Dr. Mine Cinbiş, Yrd. Doç. Dr. Yasemin Işık Balcı ve Uzm. Dr. Özlem Şahin'e

Tez aşamasında her konuda desteğini ve yardımını benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Hakan Akça'ya

Tezimin her aşamasında desteklerinden yararlandığım Aydın Demiray ve Onur Tokgun'a

Tez aşamasında bana yardımcı olan Doç. Dr. Bülent Özdemir'e

Birlikte çalıştığım tüm asistan ve hemşire arkadaşlara,

Birlikte çalıştığım tüm personele,

Yetişmemde büyük emekleri olan değerli aileme, asistanlığım süresince desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili eşim Tülay ve kızım Ela'ya teşekkürlerimi sunarım.

**30/06/2011**

**Dr. Cem BECERİR**

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI .....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ .....	X
ÖZET .....	1
ABSTRACT .....	2
GİRİŞ .....	3
GENEL BİLGİLER .....	5
Yenidoğanda Sarılık.....	5
Bilirubin Metabolizması.....	5
Yenidoğan Sarılıklarının Sınıflandırılması.....	6
Bilirubin Toksisitesi.....	7
Bilirubin Ensefalopatisi ve Kernikterus.....	9
Akut Bilirubin Ensefalopatisi.....	9
Kronik Bilirubin Ensefalopatisi.....	9
Bilirubin Toksisitesinin Patofizyolojisi.....	10
Serbest Bilirubin Geçişi.....	10
Asidozun Etkisi.....	11
Kan Beyin Bariyerinin Bozulması.....	11
Bilirubin Hücresel Düzeyde Toksik Etkileri.....	12
Bilirubin ve Oksidatif Stres.....	13
Hücre Kültürlerinde Bilirubin Toksisitesi.....	14
Bilirubin Toksisitesini Etkileyen Faktörler.....	15
Dokosaheksaenoik Asit.....	16
Dokosaheksaenoik Asit Ve Sinir Sistemi.....	16
Dokosaheksaenoik Asitin Nöronlara Etkisi.....	17

<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	21
<b>Çalışma Grupları</b> .....	21
<b>Astrosit Hücre Kültürünün Hazırlanması</b> .....	21
<b>Bilirubin Solüsyonunun Hazırlanması</b> .....	23
<b>Dokosaheksaenoik Asit Solüsyonunun Hazırlanması</b> .....	23
<b>Bilirubin ve DHA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi</b> .....	24
<b>Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi</b> .....	25
<b>Apoptozisin Belirlenmesi</b> .....	26
<b>Süperoksid Dismutaz, Katalaz, Glutatyon Peroksidaz</b>	
<b>Aktivite Ölçümü</b> .....	27
<b>İstatistiksel Analiz</b> .....	28
<b>BULGULAR</b> .....	29
<b>Bilirubin ve DHA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi</b> .....	29
<b>Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi</b> .....	30
<b>Apoptozisin Değerlendirilmesi</b> .....	31
<b>Süperoksid Dismutaz Aktivite Ölçümünün Değerlendirilmesi</b> .....	33
<b>Katalaz Aktivite Ölçümünün Değerlendirilmesi</b> .....	34
<b>Glutatyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü</b> .....	35
<b>TARTIŞMA</b> .....	37
<b>SONUÇLAR</b> .....	50
<b>KAYNAKLAR</b> .....	52

## SİMGELELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>A<sub>0</sub></b>	:Sıfırıncı saatteki absorbans değeri
<b>A<sub>72</sub></b>	:72. saatteki absorbans değeri
<b>AA</b>	:Araşidonik asit
<b>ALA</b>	:Alfa linolenik asit
<b>BİND</b>	:Bilirubinin indüklediği nörolojik disfonksiyon
<b>CAT</b>	:Katalaz
<b>DHA</b>	:Dokosaheksaenoik asit
<b>DMEM/F12</b>	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12</i>
<b>EPA</b>	:Eikosapentaenoik asit
<b>GPx</b>	:Glutatyon peroksidaz
<b>GSH</b>	:Glutatyon
<b>HBSS</b>	: <i>Hanks Buffered Salt Solution</i>
<b>HO</b>	:Hem oksijenaz
<b>IFN</b>	:İnterferon
<b>IL-1 β</b>	:İnterlökin 1 beta
<b>IL-6</b>	:İnterlökin altı
<b>LTB<sub>4</sub></b>	:Lökotrien B <sub>4</sub>
<b>MDA</b>	:Malonaldialdehit
<b>μl</b>	:Mikrolitre
<b>mM</b>	:Milimolar

<b><math>\mu</math>M</b>	:Mikromolar
<b>NADPH</b>	:Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>NK</b>	:Doğal öldürücü hücre
<b>nm</b>	:Nanometre
<b>NMDA</b>	:N-metil-D-aspartat
<b>PGE<sub>2</sub></b>	:Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	:Fosfolipaz A <sub>2</sub>
<b>RES</b>	:Retiküloendoteliyal sistem
<b>SOD</b>	:Süperoksit dismutaz
<b>TC<sub>50</sub></b>	:Hücrelerin % 50'sine toksik konsantrasyon
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:Tümör nekroz faktör alfa
<b>TNFR1</b>	:Tümör nekroz faktör reseptörü 1
<b>TUNEL</b>	: <i>Deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling</i>
<b>U</b>	:Ünite

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b> İndirekt hiperbilirubinemi nedenleri.....	8
<b>Tablo 2</b> Grupların hücre canlılığındaki değişim (%)......	31
<b>Tablo 3</b> Grupların astrosit hücrelerindeki apoptozisin değerlendirilmesi...	33
<b>Tablo 4</b> Grupların SOD aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi.....	34
<b>Tablo 5</b> Grupların CAT aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi.....	35
<b>Tablo 6</b> Grupların GPx aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi.....	36

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Yenidoğanda bilirubin metabolizması.....	7
Şekil 2 Beyin dokusunun elde edilmesi ve mekanik parçalanması (A, B, C)	22
Şekil 3 Faz kontrast mikroskobu primer nöron hücre kültürü (A, B).....	22
Şekil 4 Faz kontrast mikroskobu astrosit hücre kültürü (A, B, C).....	24
Şekil 5 96 kuyucuklu plaklar (A). Kuyucuklardaki astrosit hücreleri (B).....	26
Şekil 6 Uygulanan bilirubin konsantrasyonları ve TC <sub>50</sub> değeri.....	29
Şekil 7 Uygulanan DHA konsantrasyonları ve seçilen DHA konsantrasyonu	30
Şekil 8 Grupların hücre canlılığındaki değişim (%).....	31
Şekil 9 TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. Kontrol grubu (A). DHA grubu (B).....	32
Şekil 10 TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. İndirekt bilirubine bağlı apoptozis (A, B).....	32
Şekil 11 TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. DHA+bilirubin grubu (A, B).	32
Şekil 12 Grupların astrosit hücrelerindeki apoptozisin değerlendirilmesi.....	33
Şekil 13 Grupların SOD aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi.....	34
Şekil 14 Grupların CAT aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi.....	35
Şekil 15 Grupların GPx aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi.....	36

## ÖZET

### **Dokosaheksaenoik asidin bilirubin nörotoksitesini önlemede proflaktik etkisi**

Dr. CEM BECERİR

Yenidoğan bakımındaki son gelişmelere rağmen bilirubine bağlı santral sinir sistemi hasarı önemli bir problem olma özelliğini korumaktadır. Bilirubinün neden olduğu toksisite birden fazla mekanizma ile ortaya çıkar ve bu mekanizmaların çoğu oksidatif stresin bir sonucudur. Dokosaheksaenoik asidin (DHA) oksidatif strese ve apoptozise karşı nöroprotektif etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada DHA'nın bilirubinün nörotoksitesini önleyici etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda bir günlük Wistar Albino ratlardan modifiye Cole ve De Vellis yöntemi ile elde edilen astrosit hücre kültürü kullanıldı. Kontrol, bilirubin, DHA ve DHA+bilirubin şeklinde dört grup oluşturuldu. Astrosit hücre kültürlerinde bilirubin farklı konsantrasyonlarda uygulandığında hücrelerin %50'sinin canlılığını kaybettiği değer 10 µM olarak saptandı. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan DHA için astrosit hücre ölümüne yol açan bir etki görülmediği gibi hücre canlılığını arttıran en etkin doz 5 µM olarak bulundu. Astrosit hücre kültürüne 5 µM DHA eklendikten dört saat sonra 10 µM bilirubin eklendi ve 72 saat inkübe edildi. DHA'nın bilirubinün oluşturduğu nörotoksositeye karşı etkisi hücre canlılığı, apoptozis ve antioksidan enzimlerden süperoksit dizmutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri ölçülerek değerlendirildi.

Çalışmamızda bilirubinün konsantrasyona bağlı olarak astrosit hücre canlılığını 4 µM'ün altında arttırdığı, üstünde ise azalttığı saptandı. Nörotoksosite oluşturulan bilirubin grubu ile karşılaştırıldığında DHA+bilirubin grubunda hücre canlılığının belirgin olarak arttığı, buna karşın apoptozisin belirgin olarak azaldığı tespit edildi ( $p<0.001$ ). Antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GPx aktiviteleri değerlendirildiğinde DHA+bilirubin grubunda bu enzim aktivitelerinin bilirubin grubuna kıyasla belirgin olarak arttığı bulundu ( $p<0.001$ ). Sonuç olarak, DHA'nın bilirubinün oluşturduğu nörotoksositeye karşı hücre canlılığını ve SOD, CAT ve GPx aktivitelerini arttırarak, apoptozisi ise azaltarak nöroprotektif etkisi olduğu gösterildi.

Anahtar kelimeler: Dokosaheksaenoik asit, astrosit, bilirubin, nörotoksosite



## SUMMARY

### **The protective effect of docosahexaenoic acid on the bilirubin neurotoxicity**

Dr. CEM BECERİR

Despite recent improvements in neonatal care the central nervous system damage due to bilirubin is still being an important problem. Toxicity caused by bilirubin occurs more than one mechanism and most of these mechanisms are a result of oxidative stress. Docosahexaenoic acid (DHA) is known to be neuroprotective effects against oxidative stress and apoptosis. This study aimed to evaluate the effect of DHA prevents bilirubin neurotoxicity.

Our study, astrocytes in cell culture obtained from 1-day-old Wistar albino rats by the modified method of Cole and De Vellis were used. Control, bilirubin, DHA and DHA+bilirubin group were applied to four groups. Astrocyte cell cultures with different concentrations of bilirubin is applied, %50 of the cells had lost viability value was 10  $\mu$ M. Such as applied in different concentrations of DHA leads to an effect wasn't seen in astrocyte cell death, the most effective dose was found to increase cell viability in 5  $\mu$ M. DHA in 5  $\mu$ M added to the cell culture of astrocytes for four hours after than 10  $\mu$ M bilirubin added, afterward all these were incubated for 72 hours. The effect of DHA against bilirubin neurotoxicity was assessed by measuring of cell viability, apoptosis and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzyme activities.

In our study, bilirubin increases astrocyte cell viability under 4  $\mu$ M and decreases over it, depending on the bilirubin concentration. DHA+bilirubin group significantly increased cell viability compared with bilirubin group generated in neurotoxicity, whereas apoptosis was significantly decreased ( $p < 0.001$ ). Antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx activities were evaluated in DHA+bilirubin group, these antioxidant enzyme activities increased significantly compared bilirubin group ( $p < 0.001$ ). As a result, DHA was shown to be neuroprotective which was increased the cell viability and the antioxidant enzymes including SOD, CAT and GPx activities, and reduced apoptosis against neurotoxicity of bilirubin.

Keywords: Docosahexaenoic acid, astrocyte, bilirubin

## GİRİŞ

Yenidoğan bakımındaki son gelişmelere rağmen indirekt bilirubine bağlı santral sinir sistemi hasarı önemli bir problem olma özelliğini korumaktadır. Bu durum indirekt bilirubinin beyin dokusunda birikmesi ve nöronal hücreleri zedelemesi sonucu oluşmaktadır (1). İndirekt bilirubin hem katabolizmasının son ürünüdür. Hidrofobik, lipofilik, düşük düzeyde antioksidan, yüksek düzeyde ise oksidan ve nörotoksiktir (1, 2). Serumda albümine bağlanarak taşınmaktadır. Albümine bağlanma kapasitesini aşan serbest formdaki indirekt bilirubin beyin dokusuna girmekte ve hasar oluşturmaktadır (1). Etkilenen yenidoğanlar bilirubin ensefelopatisi veya kernikterus riski taşımaktadır (1, 2).

İndirekt bilirubine bağlı selektif hasarın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte özellikle bazal ganglionlar, kranial sinir nükleusları ve serebellum etkilenmektedir (2, 3). İndirekt bilirubinin neden olduğu nörotoksisite birden fazla mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmalar oksidatif stres, eksitotoksisite, inflamasyon, nöron gelişiminin bozulması, iyon dengesinin bozulması, membran ve hücre iskeleti bütünlüğünün bozulmasıdır (4-9). Oksidatif strese bağlı ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hücre bütünlüğünün bozulmasına, sinir hücrelerinin disfonksiyonuna, nekroz veya apoptozis yoluyla hücre ölümüne neden olmaktadır (4).

Dokosaheksaenoik asit (DHA) uzun zincirli 22 karbon atomlu ve 6 çift bağ içeren bir moleküldür. Öncü molekülü, omega-3 yağ asitlerinin temel yağ asidi alfa-linolenik asit (ALA)'tir. Bu madde insan vücudunda sentezlenemez ve dışarıdan alınmak zorundadır. Yağ asitleri hücre membranlarında, membran fosfolipitlerinin yapısında veya serbest moleküller olarak bulunmaktadır. Her iki durumda da membranların fiziksel özelliklerinde önemli rol oynamaktadır. Bunlardan bazıları membran fonksiyonlarının düzenlenmesi, iyon geçişi, membran ilişkili proteinlerin aktivitesi ve membran elastisitesidir (10). DHA, beyin ve retinada nöronal membranların fosfolipit bariyerlerinde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (11).

DHA'nın fototransdüksiyon ve nöronal fonksiyonlarda önemli rolü vardır. Retinal dokudaki azlığı ışığa karşı yanıtı azaltmakta, görme keskinliğinde yetersizlik yaratmakta ve karanlığa adaptasyonda gecikmeye neden olmaktadır. Sinir sistemi

gelişimi için önemlidir. Beyin gelişiminin hızlı olduğu infant döneminde gereklidir. Beyinde azalması öğrenme kapasitesini olumsuz etkilemektedir (11, 12). DHA eksikliği nörolojik gelişimi olumsuz etkileyerek normal gelişimi geciktirmekte veya inhibe etmektedir (12). Biyolojik prosesin düzenlenmesinde önemli mediatörler olan eikozonoidlerin prekürsörüdür (13). DHA ve eikozonoidler arasındaki etkileşim oldukça komplekstir. Ancak lenfosit çoğalmasını, proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin aktivitesini azaltarak immün cevabı etkilemektedir (14). DHA'nın oksidatif strese karşı retinal ganglion hücrelerinde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir. Fotoreseptörlerde apoptozisi önlemektedir (15, 16). DHA, glutatyon (GSH) seviyesini, glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) enzimlerinin serebral aktivitesini artırarak antioksidan savunma mekanizmasını indüklemektedir (17). Hipoksik-iskemi sonrasında yenidoğan dönemindeki ratlarda beyin fonksiyonlarında iyileşmede, volüm kaybında azalmada, serbest radikallerin, inflamatuvar sitokinlerin, biyoaktif lipid mediatörlerinin etkisinin ve apoptozisin önlenmesinde rol oynamaktadır (18).

DHA'nın embriyonik ve fetal dönemde nörogenezis için önemli olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Hücre membranları, iyon transportu, nöron hücreleri gelişimi üzerine etkisinin yanı sıra oksidatif strese ve apoptozise karşı nöroprotektif etkisi olduğu da bilinmektedir. Bu çalışmada indirekt bilirübinin nöron hücrelerindeki toksik etkilerine karşı DHA'nın önleyici ve/veya hasarı azaltıcı etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### Yenidoğanda Sarılık

Sarılık hiperbilirubineminin gözle görülen belirtisi olup yenidoğan döneminde en sık karşılaşılan sorunlardan birisidir. Sağlıklı term bebeklerin yaklaşık %60'ında, preterm bebeklerin ise %80'inde yaşamın ilk haftasında klinik olarak sarılık görülmektedir (19, 20). Sarılık sarı-turuncu renkteki bilirubin pigmentinin deride ve skleralarda birikmesi ile ortaya çıkmaktadır (3). Serum total bilirubin düzeyi, bilirubin üretimi, transportu, karaciğerde hücre içerisine alınması, konjugasyonu, ekskresyonu ve bağırsaklardan reabsorbsiyon basamakları arasındaki hassas dengeye bağlı olarak düzenlenmektedir. Genellikle geçici bir durum olmakla birlikte doğum sonrası ilk hafta içinde hastaneye yatışların en sık nedenidir (3, 19, 20).

### Bilirubin Metabolizması

Bilirubin hem katabolizmasının son ürünüdür. Hem içeren proteinler hemoglobin, miyogloblin, sitokromlar, katalaz, triptofan ve pirolaz gibi enzimlerdir (1-3). Bilirubinün %75'i yaşlanmış eritrositlerin retikuloendotelial sistemde (RES) lizisi sonucu oluşmaktadır. Geri kalan bölümü ise hem proteinlerinin karaciğerde ve eritrosit öncü hücrelerinin kemik iliğinde yıkılmasıyla oluşmaktadır. Bir gram hemoglobinin yıkımı ile 35 mg bilirubin açığa çıkmaktadır (1, 2, 20). Yenidoğanda günlük bilirubin yapımı erişkin düzeyinin 2.5 katıdır (8-10 mg/kg/gün) (1-3, 20).

Bilirubinün meydana gelmesinde ilk adım hemin, hem oksijenaz (HO) enzimi tarafından biliverdine dönüştürülmesidir. Bu olay sırasında ortamda oksijen (O<sub>2</sub>) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'a gereksinim vardır (3). Bir seri oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonu sonucu  $\alpha$ -metan köprüsü kırılarak hem halkası açılmakta ve karbon monoksit (CO), biliverdin ve demir açığa çıkmaktadır (1-3).

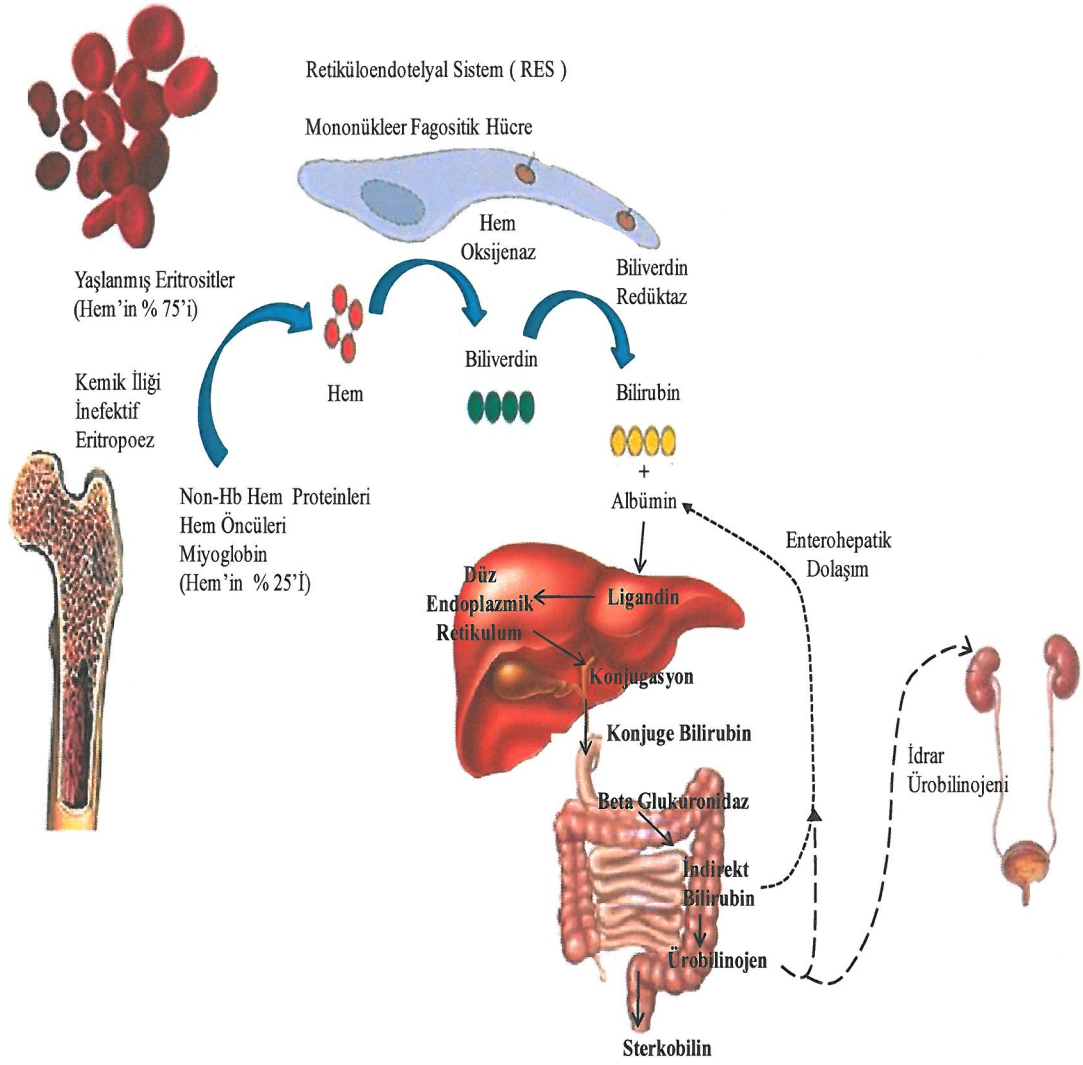
İkinci aşamada biliverdin redüktaz katalizörlüğünde NADPH ile birlikte biliverdinden bilirubin meydana gelmektedir (3, 21). RES'den dolaşıma salınan bilirubin (indirekt bilirubin, konjuge olmamış bilirubin) pH 7.4'te suda çözünmez olduğundan taşınabilmesi için albümine bağlanmaktadır (1, 21). Albümin üzerinde biri yüksek, diğeri daha düşük afiniteli iki bağlama bölgesi vardır ve bir gram albümine 8.5 mg bilirubin bağlanabilir (1). Düşük albümin düzeyi, albümine

bağlanma kapasitesindeki düşüklük, asidoz, serbest yağ asitleri ve bazı ilaçlar bilirubinün albümine bağlanmasını azaltarak plazmadaki serbest bilirubin miktarını arttırmaktadır (1, 2). Bilirubin, indirekt bilirubin, serbest bilirubin, direkt bilirubin ve delta bilirubin olmak üzere serumda dört değişik formda bulunmaktadır (20).

Albümine bağlı olarak karaciğere gelen indirekt bilirubin bir taşıyıcı protein aracılığı ile hücre içine alınmaktadır (3). Burada öncelikle Y-proteinine (ligandin), daha az oranda Z-proteinine bağlanmaktadır (3, 19). Daha sonra düz endoplazmik retikuluma taşınan bilirubin, üridin difosfoglukuronil transferaz enzimi ile konjuge edilerek suda eriyen direkt bilirubine dönüştürülmektedir (1-3). Direkt bilirubin aktif transportla karaciğer hücresi dışına ve safra kanaliküllerine, safranın bir komponenti olarak salgılanmaktadır (1, 3). Safra aracılığıyla bağırsağa salgılanan direkt bilirubin beta-glukuronidaz aktivitesi ile hidrolize edilerek konjuge olmamış bilirubine dönüştürülmekte ve bağırsaktan emilerek enterohepatik sirkülasyonla karaciğere taşınmaktadır (1, 3, 20). Yenidoğanda indirekt bilirubine dönüşüm ve enterohepatik dolaşıma katılım erişkinlere göre daha fazladır (1-3). Bağırsağa geçen direkt bilirubinün yaklaşık %25'inin geri emildiği düşünülmektedir. Yenidoğanda enterohepatik dolaşımı artıran faktörler; bağırsak motilitesinin azalması, mekonyum pasajının gecikmesi ve beta-glukuronidaz enzim aktivitesinin yüksek olmasıdır (**Şekil-1**) (1, 19, 20).

### **Yenidoğan Sarılıklarının Sınıflandırılması**

Yenidoğan sarılıkları bilirubinün cinsine göre indirekt hiperbilirubinemi ve direkt hiperbilirubinemi olarak ikiye ayrılmaktadır (1-3). Yenidoğanda en sık görülen tip olan indirekt hiperbilirubinemi, bilirubin üretiminde artış, karaciğere alınmasında bozukluk, konjugasyon ve atılımın azalmasına bağlı nedenlerle oluşmaktadır (**Tablo-1**) (1-3). Direkt hiperbilirubinemi ise yenidoğan döneminde daha nadirdir. Bu durum her zaman patolojiktir ve safra yollarında tıkanıklığa ve karaciğer işlevlerinde ciddi bozukluğa işaret etmektedir (1, 2). Direkt hiperbilirubineminin %80'ini idiopatik neonatal hepatit ve biliyer atrezi oluşturmaktadır. Sepsiste, intrauterin enfeksiyonlara bağlı hepatitte, metabolik bozukluklarda direkt bilirubin tek başına ya da indirekt bilirubinle birlikte artmaktadır. Ağır hemolitik hastalıkta da indirekt hiperbilirubinemiye direkt bilirubin artışı eşlik edebilir (1).



Şekil-1: Yenidoğanda bilirubin metabolizması

### Bilirubin Toksisitesi

Bilirubin fizyolojik sınırları aşılıp serumda aşırı yükseldiğinde bilirubin toksisitesi gelişmekte ancak bilirubin düzeyi bir süre yüksek seyrettikten sonra klinik bulgular görülmeye başlamaktadır (3). Nörotoksisiteden kan beyin bariyerini kolayca geçen indirekt bilirubin sorumludur. Serbest bilirubin teorisine göre albümine bağlı olmayan indirekt bilirubin beyne geçmekte ve nöron hasarına neden olmaktadır. Kan-beyin bariyeri bir yere kadar bilirubinin beyne geçişini önlemektedir. Yapılan çalışmalarda, immatür kan-beyin bariyerinin bilirubine daha geçirgen olduğu gösterilmiştir (22).

**Tablo - 1: İndirekt hiperbilirubinemi nedenleri**

<b>Bilirubin Üretiminde Artış</b>	<b>Konjugasyon veya Atılım Yetersizliği</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• İzomünizasyon<ul style="list-style-type: none"><li>- Rh uyumsuzluğu</li><li>- ABO uyumsuzluğu</li><li>- Minör kan grubu uyumsuzluğu</li></ul></li><li>• Eritrosit enzim defektleri<ul style="list-style-type: none"><li>- Glikoz-6 fosfat dehidrogenaz eksikliği</li><li>- Piruvat kinaz eksikliği</li><li>- Heksokinaz eksikliği</li><li>- Konjenital eritropoetik porfiria</li></ul></li><li>• Eritrosit membran defektleri<ul style="list-style-type: none"><li>- Herediter sferositoz</li><li>- Herediter eliptositoz</li><li>- İnfantil piknositoz</li></ul></li><li>• Yenidoğanın travmaya uğraması<ul style="list-style-type: none"><li>- Vakum veya forseps uygulaması</li><li>- Yaygın ekimoz</li><li>- Sefal hematoma veya subgaleal kanama</li></ul></li><li>• Polisitemi</li><li>• Yenidoğan enfeksiyonları<ul style="list-style-type: none"><li>- Üriner enfeksiyon</li><li>- Sepsis</li><li>- Bakteriyel, viral, protozoal enfeksiyonlar</li></ul></li><li>• Etnik köken<ul style="list-style-type: none"><li>- Asya kökenli olma</li></ul></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yetersiz veya zayıf beslenme<ul style="list-style-type: none"><li>- Prematürite</li><li>- Gecikmiş veya yetersiz laktasyon</li><li>- Yetersiz emzirme</li><li>- Diğer beslenme bozuklukları</li></ul></li><li>• Enterohepatik sirkülasyonun artması<ul style="list-style-type: none"><li>- İntestinal obstrüksiyon</li><li>- Mekonyum ileusu</li><li>- Kistik fibrozis</li></ul></li><li>• Hormonal bozukluklar<ul style="list-style-type: none"><li>- Hipotiroidizm</li><li>- Hipopitüitarizm</li></ul></li><li>• Bilirubin metabolizma bozuklukları<ul style="list-style-type: none"><li>- Crigler-Najjar sendromu I ve II</li><li>- Gilbert hastalığı</li><li>- Lucey-Driscoll sendromu</li></ul></li></ul>

Albüminin yapısal değişikliği, albümine yarışmalı olarak bağlanan eksojen veya endojen maddelerin varlığı, hipoalbüminemi gibi serbest bilirubin düzeyini etkileyen faktörler bilirubin beyne girişini artırmaktadır. Asidoz, enfeksiyon/sepsis, asfiksi, hiperkarbi, hiperozmolarite ve bazı ilaçların da bilirubin beyne geçişini artırdığı gösterilmiştir (1-3). Bilirubin kendisi de kan-beyin bariyerini bozabilmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda bilirubin membran fonksiyonlarını bozduğu ve permeabilityyi artırdığı gösterilmiştir (3, 22). Kan-beyin bariyerindeki açılma ile bilirubin beyne geçişi artmaktadır. Bu durumlar hasta yenidoğanlarda sıklıkla görüldüğünden yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenen bebeklerde sarılığın klinik takibi önemlidir. Konjuge bilirubin nörotoksik olmamasına rağmen albümine bağlanmakta ve albümine bağlanmada indirekt bilirubin ile yarışmaktadır. Bu nedenle yüksek konjuge bilirubin düzeyi olan hastalar da nörotoksositeye bağlı hasar riski taşımaktadır (21, 22).



## **Bilirubin Ensefalopatisi Ve Kernikterus**

Bilirubin toksisitesinin santral sinir sistemine olan etkilerinin klinik bulguları ve patolojik etkileri bilirubin ensefalopatisi ve kernikterus olarak tanımlanmaktadır (1-3). Kernikterus bazal ganglionlar, pons ve serebellum gibi beynin spesifik bölgelerinde nöronal ölüm ve pigment birikimi ile karakterize nöropatolojik değişiklikleri içermektedir. Akut bilirubin ensefalopatisi terimi ise doğumdan sonraki ilk haftada görülen bilirubin toksisitesinin akut belirtilerini tanımlamak için kullanılmaktadır (1).

### **Akut Bilirubin Ensefalopatisi**

Klinik olarak üç evreden oluşur (1, 2):

- Evre 1 (ilk 1-2 gün): emme güçlüğü, stupor, hipotoni, nöbet
- Evre 2 (ilk haftanın ortaları): ekstensör kaslarda hipertoni, opistotonus, retrokolis, ateş, tiz sesle ağlama, moro refleksinin kaybı, apne, koma, ölüm
- Evre 3 (ilk haftadan sonra): hipertoninin gerilemesi

İlk hafta boyunca nörolojik olarak normal olan bebeklerde kronik bilirubin ensefalopatisi tablosunun gelişmeyeceği kabul edilirdi. Oysa kronik bilirubin ensefalopatisi olan çocukların %10'unda yenidoğan döneminde hiç bulgu olmadığı veya minimal bulgu olduğu gösterilmiştir. Kronik bilirubin ensefalopatisinin karakteristik klinik bulguları ancak bebek yaklaşık altı haftalık olduğunda ortaya çıkmaktadır (1-3).

### **Kronik Bilirubin Ensefalopatisi:**

Bu bebekler hipotoniktir ancak tendon refleksleri artmıştır. Tonik boyun refleksi devam eder ve motor gelişim geridir (1). Sağırılık, serebral palsi, nöbetler ve kernikterusa bağlı ölümden hafif mental retardasyon ve kognitif hasara kadar değişik yelpazede görülmektedir (21). Klasik kernikterus tetraatı içinde ekstrapramidal anormallikler, yüksek frekanslı sensorinöronal işitme kaybı, bakış anormallikleri (özellikle yukarı bakış bozukluğu) ve dişlerde enamel hipoplazi görülmektedir (21). Bu çocukların çoğu yürümeye ancak beş yaşında başlamaktadır. Diğer tipik bulguları



ise bir yaştan önce görülmemekte, sık olarak da yıllar sonra ortaya çıkmaktadır (1, 2).

Kronik bilirubin ensefalopatisi (1,2):

- İlk yıl: hipotoni, aktif derin tendon refleksi, zorunlu tonik boyun refleksi, motor becerilerin gecikmesi
- Birinci yıldan sonra: hareket bozuklukları (koreoatetoz, ballismus, tremor), yukarı bakış kısıtlılığı, sensörinöral işitme kaybı

Prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde kernikterusun klasik bulguları genellikle görülmemektedir, çünkü çoğu etkilenmiş bebek bu döneme kadar yaşamamaktadır (2,20). Oysa preterm bebekler en riskli gruptur. Bu bebeklerde bilirubin düzeyleri güvenli kabul edilen düşük değerlerde olsa da kernikterus görülebilmektedir (1,21). Çünkü küçük preterm bebeklerde bilirubinin albümine bağlanmasını azaltan veya dokulara geçişini kolaylaştıran hipotermi, asfiksi, asidoz, hipoalbuminemi gibi durumlar, sepsis, menenjit ve ilaçların olumsuz etkileri daha kolay gelişebilmektedir. Preterm bebeklerde hangisinin kernikterus riski taşıdığını tahmin etmek çok olası değildir (1-3).

### **Bilirubin Toksisitesinin Patofizyolojisi**

Bilirubin birçok biyolojik reaksiyon ve sistem için toksiktir. Yenidoğanda bilirubinin toksik etkilerini tam olarak anlayabilmek için bazı faktörlerin açıklanması gerekmektedir. Bunlar bilirubinin beyne girişi, hücresel düzeydeki hasarı, erken tanı imkanları ve hasarın önlenmesi için nelerin yapılabileceğidir (1-3, 21).

Bilirubinin beyne girişi ve beyinden temizlenmesi açısından pek çok durum araştırılmış olsa da, kernikterusta bilirubinin niçin beyinin bazı bölgelerini tercih ettiği ve kalıcı beyin hasarının ortaya çıktığı ile ilişkili mekanizmalar hala açık değildir. Bilirubinin beyne girişi ile ilgili çeşitli hipotezler geliştirilmiştir (21, 22).

### **Serbest Bilirubin Geçişi**

Lipofilik diğer maddeler gibi serbest bilirubin de diffüzyon yolu ile kan beyin bariyerini geçebilmektedir. Serbest bilirubin miktarındaki herhangi bir artış veya albümin miktarı ya da bilirubin bağlama kapasitesindeki herhangi bir azalma serbest bilirubinin kan beyin bariyerini geçip beyin dokusu içinde birikmesini ve sonuçta

nöral hücre membranı içinde bilirubinin asit şeklinde çökmesini sağlayabilir. Bu hipotezle uyumlu olan bilgi fizyolojik hiperbilirubinemi sırasında bile bir miktar serbest bilirubinin kan beyin bariyerini kolayca geçebilmesidir (2, 22, 23). Bu tez büyük oranda kabul görmüştür.

### **Asidozun Etkisi**

Alkali pH'da bilirubin suda eriyen bir sodyum tuzu yapısındadır fakat nötral veya düşük pH'da çözünürlüğü oldukça azdır. Asidik pH'da serbest bilirubinin çözünürlüğü azalmakta, ortamda bulunan hidrojen iyonlarıyla bağlanarak (monobazik bilirubin veya bilirubin-asit) kolayca dokulara geçişi mümkün olmaktadır. Serumda bilirubin-asit miktarı fazla olduğunda kolayca dokulara çökme eğilimi göstermektedir. Bu da sarılıklı bebeklerin dokularında bilirubin-asidin çöktüğü anlamına gelmektedir (24). Bu tez asidozda kernikterus gelişimini açıklamaktadır. Prematürelde asidozla düşük serum albümin düzeyi bir araya geldiğinde orta derecede bilirubin yüksekliğinde bile riskli bir durum oluşmaktadır (2).

### **Kan Beyin Bariyerinin Bozulması**

Vasküler hasar, anormal dolaşım veya anormal osmolarite gibi durumların varlığında albümin ve bilirubine karşı olan bariyer geri dönüşümlü olarak açılabilir. Hipertermi ve septisemi de benzer etkilere sahip olabilir. Kan beyin bariyeri bağlantısının kaybı, herhangi bir serum bilirubin konsantrasyonunda bilirubinin beyne kolayca geçişini sağlayabilmektedir. Bilirubinin santral sinir sistemine olan bölgesel toksisitesi için hücre membranında ya da hücre içinde albüminden ayrılması gerekmektedir çünkü serbest bilirubin daha toksiktir. Ancak hasarlı bir kan beyin bariyeri varlığında albümine bağlı bilirubinden daha fazla serbest bilirubin beyne girmekte ve toksik etki göstermektedir. Bu da bilirubinin beyne girişi ile ilgili çeşitli mekanizmaların aynı anda devrede olabileceğini göstermektedir (25; 26).

### **Bilirubin Hücresel Düzeyde Toksik Etkileri**

Bilirubin nörotransmitter salınımında önemli olan bazı enzimlerin fosforilasyonunu inhibe ettiği in vitro olarak gösterilmiştir (27). Sinaptik transmisyonun bir belirleyicisi olan tirozinin alımını da inhibe etmektedir. Ayrıca iyon kanalı reseptörü olan N-metil-D-aspartatın (NMDA) fonksiyonunu inhibe ederek hücrelerde membran potansiyel değişikliklerine neden olmaktadır. Böylece bilirubin nöroeksitatör sinyalleri etkileyerek sinir iletimini bozabilmektedir (28).

Hücre kültürlerinde bilirubin mitokondriyal enzimleri inhibe ettiği, DNA sentezini engellediği, DNA iplikçiklerinde kırılmayı indüklediği, protein sentezi ve fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (29). Sitokrom c salınımı, mitokondri depolarizasyonu, kaspaz-3 aktivasyonu ve Bax translokasyonu sonucu gelişen mitokondriyal etkilenme nöronal apoptozise neden olmaktadır (30). Mitokondri zarında ve sinir hücresinde lipid akışkanlığını, protein sıralanmasını ve redoks reaksiyonu dengesini bozup mitokondriyal şişme ve geçirgenlik artışına neden olmaktadır (4, 31, 32). Bazı araştırmacılar bilirubin-asidin fosfolipid membranlarda çöktüğünü ve bunun mitokondride geri dönüşümsüz disfonksiyonla sonuçlandığını ileri sürerken, bazıları bilirubin çeşitli hücre membranları ile geri dönüşümlü bileşikler oluşturduğunu savunmaktadırlar. Bu nedenle kan değişimi veya bilirubin düzeyinin hızla düşürülmesi sonucu bilirubin toksisitesine ait bazı klinik bulguların geri döndüğünün açıklanabileceğini belirtmişlerdir (23, 26).

Bilirubin nörotoksitesini açıklamak için diğer bir hipotez, bilirubin-asidin spesifik enzimlerdeki reseptör bölgelerine bağlanabilmesidir. Böylece bu enzimler çalışamaz duruma gelmekte ya da aktiviteleri önemli ölçüde azalmaktadır (4, 23, 33). Bilirubin metabolik etkilerini araştıran bir çalışmada immatür nöronlarda artmış laktat düzeyleri ve azalmış hücresel glukoz düzeyleri ile bozulmuş glukoz metabolizmasının hiperbilirubinemi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (33). Hücre zarının yapısında ve fosfolipid membranında morfolojik değişiklikler, hücre enerji metabolizmasında, Na-K ATPaz gibi hücre zarında bulunan taşıma sistemlerinde, glutamat salınım ve geri alınımında bozulma, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörü (tümör nekroz faktör reseptörü 1 = TNFR1 )' nün aktivasyonu sonucu p38 MAP-kinazın etkinleşmesi ve hücre içi kalsiyumun artması ve artmış oksidatif stres nedeniyle nöronal hücrede nekroz ya da apoptozis gelişmektedir (4, 6, 34).

Sitokin salınımı da bilirubin toksisitesinde önemlidir. İndirekt bilirubine maruziyet tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) salınımını uyararak nöron dejenerasyonu ve vazojenik ödeme yol açmaktadır. İndirekt bilirubin aynı zamanda TNF- $\alpha$  ve IL-1  $\beta$  üretimini baskılayan interlökin-6 (IL-6) salınımını da inhibe etmektedir. Bu sitokinlerin salınımı TNFR1'i aktive ederek hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır (35, 36).

### **Bilirubin ve Oksidatif Stres**

Uzun yıllardan beri yapılan çalışmalarda bilirubin doğal antioksidan sistemin bir parçası olduğuna inanılmaktadır (8, 37). Oksijen ve karbon radikalleri oluşturduğu bilinen sigaranın insanlarda plazma bilirubin düzeyini anlamlı düzeyde azalttığı tespit edilmiştir (37). Oksidatif stres varlığında bilirubin muhtemelen harcanarak azalması veya bilirubin arttıkça total antioksidan kapasitenin artması şeklindeki veriler oksidatif strese yol açan durumlarda bilirubin bir antioksidan gibi davranmış olabileceğini, yani vücut için koruyucu bir madde olabileceğini düşündürmüştür (8, 37). Bilirubin fizyolojik konsantrasyonlarda, in vitro ortamda linoleik asidi oksidasyondan koruduğu, lipid peroksidasyonuna karşı en iyi antioksidan olarak kabul edilen  $\alpha$ -tokoferol kadar etkili olduğu tespit edilmiştir (38). Antioksidan olan askorbik asitten yoksun diyet ile beslenen ratlarda lipopolisakkarit enjeksiyonu ile oksidatif stres oluşturulduğunda, normal beslenenlere göre idrarda bilirubin oksidatif metabolitlerinin arttığı, dahası askorbik asit desteği yapılanlarda bilirubin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan hem oksijenaz'ın hepatik mRNA'sının baskılandığı gösterilmiş ve bu sonuçlara göre bilirubin askorbik asit ile birlikte fizyolojik bir antioksidan olarak çalıştığı sonucuna varılmıştır (38). Hiperoksiye maruz bırakılan hiperbiliubinemik Gunn ratlarda sarılığı olmayan ratlara göre oksidatif stresin azaldığı gösterilmiştir (39).

Bununla birlikte literatürde bilirubin antioksidan etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Prematüre retinopatisi ile ilgili bir çalışmada bilirubin koruyucu etkisi gösterilememiştir (40). Domuz yavrularında grup B streptokok infüzyonu ile serbest radikal ilişkili pulmoner hipertansiyon oluşturulmuş, bilirubin infüzyonunun pulmoner hipertansiyon ve oksidatif stres üzerinde bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (41). Sarılıklı prematüre bebeklerde sarılığı olmayan

bebeklere göre total hidroksiperoksit konsantrasyonu (oksidatif stres göstergesi) daha yüksek ve total antioksidan kapasite daha düşük bulunmuş, bilirubin azalınca total hidroksiperoksit konsantrasyonunun azaldığı ve total antioksidan kapasitenin arttığı tespit edilmiştir (42).

Bilirubin oksidatif strese neden olduğunu belirten çalışmalara rağmen, bilirubin antioksidan olarak kabul edilmiş olması nedeniyle, bilirubin azalmasına paralel olarak oksidatif streste azalma olmasının başka faktörler nedeniyle olabileceği ileri sürülmektedir (42). Hemolitik ya da nonhemolitik sarılığı olan yenidoğanlarda oksidatif stres göstergesi olan malonaldehidit (MDA) düzeyleri sarılığı olmayanlara göre daha yüksek bulunmuş, ancak muhtemelen yine bilirubin antioksidan olarak kabul edilmesi nedeniyle MDA'deki artış, artmış oksidatif stres sonucu hemoliz ve bunun sonucunda da bilirubin artışı şeklinde yorumlanmıştır (43).

Sarılıklı prematürelere sarılığı olmayanlara göre plazma total nitrit düzeyi yüksek, buna karşın eritrosit CAT, süperoksit dismutaz (SOD), GPx ve vitamin A, C, E ile selenyum düzeyleri düşük bulunmuş, prematürelere antioksidanların düşük olması nedeniyle oksidatif stresin arttığı, buna bağlı olarak gelişen hemoliz nedeniyle de hiperbilirubinemi olduğu şeklinde yorumlanmıştır (44). Bilirubin düzeyi 12,5 mg/dl üzerinde olan yenidoğanlarda, sarılığı daha az olan bebeklere göre eritrosit GPx ve SOD düzeylerini daha düşük bulunmuş ve koruyucu antioksidanların eksikliği nedeniyle hemoliz ve hiperbilirubinemi oluşabileceği iddia edilmiştir (45).

Son yıllarda ise bilirubin oksidatif strese yol açtığını gösteren çalışmalar yayınlanmaktadır (4, 8). Tüm çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde bilirubin hücresel düzeyde çift yönlü bir etkisinin bulunduğu, fizyolojik düzeylerde antioksidan etki gösterirken patolojik düzeylerde oksidatif zedelenmeye yol açtığı düşünülmektedir (1-3, 20).

### **Hücre Kültürlerinde Bilirubin Toksisitesi**

Bilirubin hücresel düzeydeki toksik etkileri astrositler ve nöronları da içeren değişik hücre tiplerinde gösterilmiştir (9, 46). Nöron ve astrosit hücre kültürleri değerlendirildiğinde, dördüncü ve beşinci günlerde indirekt bilirubin immatür nöronlara daha toksik olduğu saptanmıştır (47). Rat astrosit ve nöron primer hücre kültürlerinde bilirubin apoptozisi indüklemektedir. Nöronlar astrositler ile

karşılaştırıldığında, bilirubin toksisitesine daha yatkındır. Bu durumun nöronların bilirubini aktif olarak uzaklaştırma yeteneğinin daha az olması ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (47, 48). Astrositler ise nöronlara göre aktif dışa akım pompalarının daha fazla ekspresyonu ve bilirubin detoksifikasyon kapasitesinin daha fazla olması nedeniyle bilirubin toksisitesine karşı daha dayanıklıdır (48, 49).

Astrositler kan beyin bariyerini oluşturduklarından hormon ve besin transportunda önemli bir rolü vardır. Bu nedenle kan beyin bariyerinin yetersizliğinde bilirubin ile ilk temas eden hücrelerden birisidir (50). Astrositler bilirubinin kandan nöronlara taşınmasında ve hasar görmüş nöronlardan salınan atıkların temizlenmesinde rol oynar (51, 52). İnsanlarda beyin korteksinin toplam hücre hacminin yaklaşık üçte birini oluşturan astrositler, yüksek metabolik aktiviteye sahiptir, ekstraselüler aralıktan nöroaktif bileşikleri temizler ve beyinde en önemli glutamin sentez yeridir. Bu özellikler nedeniyle bilirubin nörotoksitesinin hücre kültüründe gösterilmesinde astrosit hücre kültürleri önemli yer tutmaktadır (50-53). Tüm bu bulgular ciddi hiperbilirubinemi sırasında gelişen ensefalopatide astrositlerin önemli bir role sahip olduğunu ve gelecekteki tedavi modellerinde potansiyel hedef olacağını düşündürmektedir.

### **Bilirubin Toksisitesini Etkileyen Faktörler**

Bilirubinün nörotoksik etkilerindeki en önemli belirleyiciler beyindeki konsantrasyonu, bilirubine maruz kalma süresi ve bilirubin üretim hızıdır (54, 55). Ölçülen serum bilirubin düzeyi dolaşımdaki albümine bağlı ya da serbest bilirubini yansıtsa da total vücut yükünü yansıtmamaktadır. Üretim hızı artan bilirubin dokulara daha hızlı taşınmaktadır. Böylece yüksek bilirubin üretim hızı olan bebekler düşük üretim hızı olan bebeklere göre daha fazla total vücut yüküne sahip olmaktadır (56, 57). Bilirubin üretiminin artış hızı kadar postnatal yaş da önemlidir. Örneğin hayatın 48. saatinde 20 mg/dl düzeyindeki serum bilirubin konsantrasyonu yedinci gündeki aynı düzeyden farklı bir risk taşımaktadır (55).

Albümine bağlanma kapasitesini ve total vücut yükünü aşan bilirubin düzeylerinde, kan beyin bariyerini geçiş riski artmaktadır (22, 58). Hemoliz nedeniyle bilirubin üretimi artan bebeklerde total vücut yükü de artmaktadır. Bu nedenle bu bebeklerde kan değişimi ve fototerapi sonrası takiplerinde serum bilirubin

düzeylelerinde belirgin bir artış görülmektedir. Bu durum bilirubin üretim hızı artmış bebeklerde nörotoksisite riskinin yüksek olduğunu ve uygulanacak tedavilerin dikkatlice planlanması gerektiğini göstermektedir (55, 56).

### **Dokosaheksaenoik Asit**

Omega-3 yağ asitlerinin büyük bölümünü oluşturan DHA, biyolojik sistemlerde bulunan en uzun zincirli doymamış yağ asididir (10, 15). Çeşitli enzimatik reaksiyonlar ile ALA'dan öncelikle eikosapentaenoik asit (EPA) ve son olarak da DHA üretilmektedir (10). Fakat ALA'nın yalnızca %5'i söz konusu metabolik yola girmektedir. Diyet ile alınan ALA doku EPA düzeyini artırırken DHA düzeyini etkilememektedir (10, 59).

Memelilerde DHA sinaptozomlar, sperm, retina ve serebral korteks gibi bazı dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Yüksek DHA seviyelerinin sınırlı doku dağılımı DHA'nın bu dokularda henüz belirlenmemiş özel bir görevi olduğu anlamına gelmektedir (60-62). Omega-3 yağ asitlerinden zengin (başlıca yağlı soğuk su balıkları) besin diyeti uygulaması yoluyla düşük DHA düzeyine sahip dokularda DHA içeriği 2-10 kat artırılabilir (59). Son zamanlarda omega-3 yağ asitleri ile yapılan çalışmalar birçok hastalıkta faydalarının olduğunu göstermektedir. Kalp hastalıkları, kanser, immün problemler, nöral fonksiyon bozuklukları, yaşlanma, baş ağrıları, sıtma, dermatit, ekzema, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve böbrek hastalıkları bunlardan bazılarıdır (63).

### **Dokosaheksaenoik Asit ve Sinir Sistemi**

Birçok dokuda uzun zincirli yağ asitlerinden sıklıkla omega-6 yağ asidi olan araşidonik asit (AA) bulunmaktadır. Sinir sistemi de uzun zincirli yağ asitlerinden zengindir ancak beyindeki fosfolipid fraksiyonlar çok az omega-6 içermektedir. Araşidonik asit önemli bir bileşen olmakla birlikte temel uzun zincirli çoklu doymamış yağ asidi DHA'dır ve hücre membranlarında konsantre olmuştur (64). DHA, serebral kortekste total yağ asitlerinin %25'ini, retina fotoreseptör hücre fosfolipidlerinin %60'dan fazlasını, total retina yağ asitlerinin ise %30'dan fazlasını oluşturmaktadır (61, 65). Merkezi sinir sisteminde DHA'nın birikmesi aktif olarak gelişim periyodunda olmaktadır. DHA diyet ile direkt olarak alınmakta ya da



karaciğerde prekürsörlerinden sentezlenip beyine taşınmaktadır. Bununla birlikte alternatif bir kaynak olarak beyinde de bir miktar DHA sentezlenebilmektedir (64).

DHA'nın kan beyin bariyerini geçerek hücelere girişi ve hücreler arasındaki transportu ile ilgili mekanizmalar henüz açık değildir. Serbest yağ asitlerinin hücre membranlarından hızlı difüzyonu adipositlerde gösterilmiş olsa da DHA'nın kan beyin bariyerini geçmesi ve beyin hücrelerine girişi aktif transport ile plazma membran yağ asidi bağlayıcı protein ve yağ asidi transport protein-4 aracılığı ile gerçekleşmektedir (64, 65). Nöronal hücreler içerisinde (nöronlar, astrositler, mikroglialar ve oligodendrositler) omega-3 prekürsörlerinden DHA sentezleme yeteneği sadece astrositlerde gösterilmiştir. Nöronlar DHA için major hedef hücreler olsa da desaturaz enzimi eksikliği nedeniyle DHA sentezleyememektedir. Astrositlerdeki DHA sentezi de dolaşımdaki DHA düzeyinden negatif olarak etkilenmektedir. Dolaşımdaki DHA düzeyi yeterli olduğunda astrositler minör kaynak olarak kullanılmaktadır. Beyin ve plazma arasında günde %2-8 bazal DHA döngüsü olduğu erişkin ratlarda gösterilmiştir. Düşük DHA içeren diyet ile bu bazal döngü sağlanamadığından nöronların ihtiyacı olan DHA sağlanamamaktadır (64). Beyinde DHA depolanması nörogenez ve hücre maturasyonunun olduğu fetal dönemde (gebeliğin ilk 6 ayı) ve yoğun sinaptogenezin olduğu erken postnatal dönemde gerçekleşmekte ve en az hayatın ilk iki yılı süresince devam etmektedir. Beyinde DHA birikiminin büyük bölümü ise postnatal hayatın ilk 6 ayında gerçekleşmektedir. Bu dönemde beyin hızla artan nöral hücre ve membranların biyosentezi için büyük miktarlarda DHA kullanmaktadır (65).

### **Dokosaheksaenoik Asitin Nöronlara Etkisi**

DHA nöronal membranlar, sinaptozomal membranlar, sinaptik veziküller, mitokondriler, mikrozomlar ve sinir büyüme konilerinde yüksek oranda bulunmaktadır (66, 67). Nöron hücre membranında DHA'nın indüklediği fosfolipid kompozisyonundaki değişiklik membran akışkanlığı, reseptör afiniteleri, iyon akışı ve membrana bağlı enzim afiniteleri gibi birçok membran fonksiyonunu değiştirebilmektedir. Nöronal membranların akışkanlığı nöronlardaki sinyal iletimini etkilemektedir. Membran akışkanlığını da omega-3 ve omega-6 çoklu doymamış yağ asitleri arasındaki denge etkilemektedir. Benzer şekilde diyet ile alınan çoklu



doymamış yağ asitleri, membran rijiditesine neden olan membrana bağlı kolesterolü düşürmekte ve membran akışkanlığını artırmaktadır (66).

DHA sinapslarda kolinerjik sinyal iletiminde rol almaktadır. Membran fosfolipidlerine tutunup kolinerjik nöron aktivasyonu ile salınan DHA sinyal iletimini kolaylaştırmaktadır. Bu şekilde nöronal sistemin fonksiyonlarının iyileştirilmesinde de önemli rol oynamaktadır (67). Ayrıca DHA, NMDA kaynaklı nörotoksisiteye karşı, beyindeki kolinerjik nöronların direncini arttırmaktadır. Gama-aminobütirik asit (GABA) cevaplarını düzenlemekte, noradrenerjik ve serotonerjik nörotransmisyonu etkileyerek beyin fonksiyonları ve davranışları üzerine olumlu etkiler oluşturabilmektedir (66). DHA iyon kanallarını ve nörotransmitter reseptörlerini düzenlemektedir. NMDA cevaplarını kolaylaştırarak ve  $K^+$  kanallarını bloke ederek nöronların uyarılabilirliğini artırmaktadır. Diğer taraftan da voltaj bağımlı  $Ca^+$  akımını ve  $Na^+$  kanallarını baskılayarak nöral membranları stabilize etmektedir (66, 67).

Fonksiyonel nöral membranlar yapılarını, akışkanlıklarını ve fonksiyonlarını korumak için optimal düzeyde doymamış yağ asidine ihtiyaç duymaktadır. Beyin dokusunda omega-3 yağ asitlerinin eksikliği membrana bağlı enzimlerin, iyon kanallarının ve reseptörlerin aktivitelerini etkilemektedir.  $Na^+-K^+$  ATPaz, protein kinaz C, fosfolipaz A<sub>2</sub>, fosfolipaz C ve sinaptotagmin gibi sinyal transdüksiyonu ile ilgili diğer enzimler omega-3 yağ asidi eksikliğinden belirgin olarak etkilenmektedir. Düşük kalsiyum iyonu konsantrasyonunda bu enzimler sitoplazmadan nöral membranlara taşınmakta, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi olaylar kaskadını başlatmaktadır. Nöral membranların yağ asit kompozisyonunda değişiklik bunun sonucunda membran akışkanlığındaki değişiklik, bu enzimlerin nöral membranlara bağlanmasını ve aktivitesini etkilemektedir (66).

DHA gen ekspresyonunu transkripsiyon seviyesinde düzenlemektedir. Bu duruma birçok transkripsiyon faktörü aracılık etmektedir. DHA bu transkripsiyon faktörlerini aktive etmekte ve birçok lipojenik enzimin mRNA stabilitesini değiştirmektedir. DHA transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini kontrol ederken bir hormon gibi hareket etmektedir. Bu etkisi diyetle bulunduğu sürece devam etmektedir (66, 67).

İmmün hücrelerin membran fosfolipidleri yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi içermektedir. Sitokinler, büyüme faktörleri, endotoksinler ve serbest oksijen radikallerinden gelen uyarılar fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi aktive etmektedir. Böylece immün hücrelerden AA salınmaktadır. AA, prostoglandinleri, lökotrienleri ve tromboksanları kapsayan bir grup biyoaktif molekül olan eikozonoidlere metabolize olmaktadır (67). Eikozonoidler de immün cevapların yoğunluğunu ve süresini düzenlemektedir. Bunlardan prostoglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ateş, vasküler permeabilitenin ve vazodilatasyonun artması gibi pek çok proinflamatuvar cevabı düzenlemekte, ağrı ve ödemi artırmakta, lenfosit çoğalmasını, NK hücrelerinin aktivitelerini baskılamakta, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-2 ve interferon (IFN)'ların üretimini inhibe etmektedir. Bu açıdan PGE<sub>2</sub> immün baskılayıcı ve anti-inflamatuvar özelliktedir (66). Diğer bir AA metaboliti olan lökotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ise, damarların geçirgenliğini, kan akımını, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu, lizozomal enzimlerin salınımını ve TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-2, IFN- $\alpha$  üretimini arttırırken, lenfosit çoğalmasını inhibe etmekte ve NK aktivitesini desteklemektedir. Bu durum AA'nın zıt etkilere sahip mediyatörlerin kaynağı olduğunu göstermektedir (66-68). DHA, AA'nın aktivasyonunu siklooksijenaz enzimi aracılığıyla inhibe etmektedir. Bu reaksiyon proinflamatuvar eikozonoid ve sitokinlerin üretimini baskılamaktadır. DHA'nın, sitokinler ve eikozonoidler arasındaki etkileşimi oldukça komplekstir. Ancak lenfosit çoğalmasını, proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu ve NK hücrelerinin aktivitesini azaltarak immün cevabı etkilemektedir (13, 14, 68).

DHA beyin dokusunda antioksidan özellik göstermektedir. Hossain ve ark. (17) tarafından yapılan hayvan çalışmasında, beyni reaktif oksijen radikalleri kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı koruma rolünü açıklamak için yaşlı ve hiperkolesterolemili ratlarda beyin GSH seviyeleri, GPx ve CAT aktiviteleri incelenmiş, DHA'nın GSH seviyesini, GPx ve CAT enzimlerinin serebral aktivitesini arttırarak antioksidan savunma mekanizmasını indüklediği gösterilmiştir. DHA'nın hayvan çalışmalarında beyni iskemik ve eksitotoksik hasara karşı koruduğu bildirilmiştir. Hipoksik-iskemi sonrasında yenidoğan dönemdeki ratlarda beyin fonksiyonlarında iyileşme sağladığı, volüm kaybını azalttığı, serbest oksijen radikallerini, inflamatuvar sitokinleri, biyoaktif lipid mediyatörlerinin etkisini azalttığı ve apoptozisi önlediği belirtilmektedir (18).

Hayvan alışmaları omega-3 yağ asidi eksikliğinin hayvanlarda motivasyon bozukluğu yarattığını ve renmede endişe oluşturduğunu, uzun süreli DHA uygulanmasının hafıza ilişkili renme kabiliyetini arttırdığını göstermektedir (69). DHA'nın beyinde kognitif fonksiyonları, renme ve hafızayı, nörotransmitter salınımını, membrana bağımlı enzimleri, iyon kanallarını, reseptörleri, immünite ve inflamasyonu, apoptozisi, gen ekspresyonunu, kan beyin bariyerini düzenlediği yapılan çalışmalarla saptanmıştır (66).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'na başvurularak onayı alınan (sayı: B.30.2.PAÜ.0.01.00.00.400-1/03, tarih: 05.01.2010) 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 Mayıs 2010 - Şubat 2011 tarihleri arasında yapıldı. Primer astrosit hücre kültürü için tek bir anneden doğan toplam 10 adet bir günlük rat yavruları kullanıldı.

### Çalışma Grupları

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

Grup II (n:6): Bilirubin grubu, astrosit hücre kültürüne 10 µM bilirubin (Sigma-Aldrich, B4126-1G) konsantrasyonu 72 saat süreyle uygulandı.

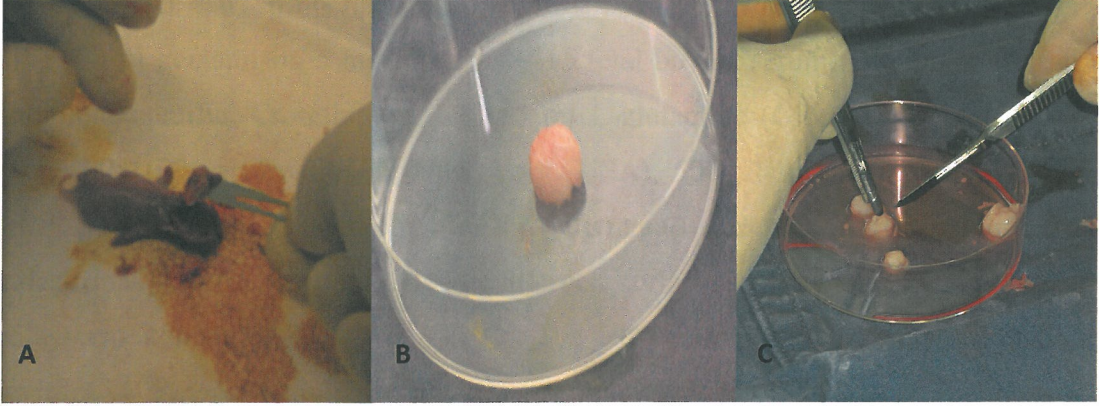
Grup III (n:6): DHA grubu, astrosit hücre kültürüne 5 µM DHA (Sigma-Aldrich, D2534-25MG) konsantrasyonu 72 saat süreyle uygulandı.

Grup IV (n:6): DHA + Bilirubin grubu, astrosit hücre kültürüne 5 µM konsantrasyonunda DHA uygulandı. Dört saat sonra 10 µM bilirubin konsantrasyonu astrosit hücre kültürüne eklendi ve birlikte 72 saat süreyle uygulandı.

### Astrosit Hücre Kültürünün Hazırlanması

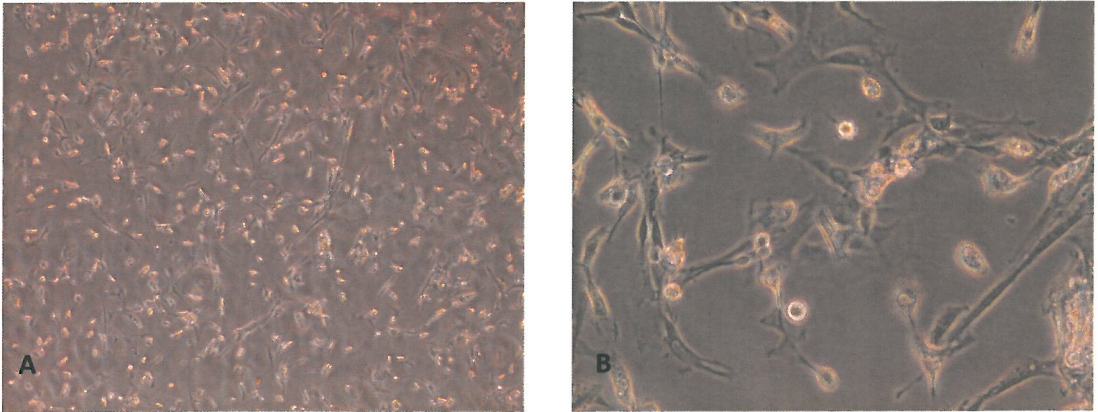
Astrosit primer hücre kültürü %95'in üzerinde saflıkta astrosit hücrelerinin elde edildiği kanıtlanmış McCarthy ve de Vellis yönteminden modifiye edilerek hazırlanan Cole-de Vellis yöntemi ile literatürde tanımlandığı şekilde hazırlandı (70, 71). Bir günlük rat yavrularına anestezik madde verilmeden steril şartlarda servikal dislokasyon ile dekapitasyon uygulandı. Beyin dokusu *Hanks Buffered Salt Solution* (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) (HBSS) içeren kültür kabına konuldu. Beyin dokusu mekanik olarak parçalandı (Şekil 2). Jöle kıvamına gelene kadar HBSS ile yıkanarak 500 µl tripsin (Trypsin/EDTA, 100 ml, %0.05/%0.02, Biochrom, Berlin, Germany), 50 µl DNaz-I (DNase I recombinant,

RNase-free, 10 U/ $\mu$ l, Roche, Mannheim, Germany) eklendi ve 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda 60 dk süreyle sallanarak inkübe edildi. Yetmiş mikronluk filtreden geçirilerek hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonu polilizin kaplı kültür kaplarına 20 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12* (DMEM/F12)(DMEM/Ham's F-12 1:1, 500 ml, Biochrom, Berlin, Germany) besiyeri içinde ekilerek primer nöron hücre kültürü hazırlandı (Şekil 3).



Şekil 2 (A,B,C): Beyin dokusunun elde edilmesi ve mekanik parçalanması.

Primer nöron hücre kültürleri 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde inkübe edilerek kültürlerin gelişimi faz kontrast mikroskobu altında incelendi ve besiyerleri üç günde bir taze besiyeri ile değiştirildi. Beşinci günden sonra çoğalan primer nöron hücre kültürlerinden astrosit hücre kültürleri elde edildi.



Şekil 3 (A,B): Faz kontrast mikroskobu primer nöron hücre kültürü. A:x10. B:x100.

Hücrelerin çoğalarak bitişik duruma geldiği primer nöron hücre kültürlerinde besiyeri aspire edilerek kültür kapları distile su ile yıkandı ve tripsin eklendi. Kültür kapları mekanik olarak sertçe sallanarak hücrelerin kültür kabı tabanından tamamen kalkması sağlandı. DMEM/F12 eklendikten sonra tüm besiyeri aspire edilerek yeni bir kültür kabına konuldu ve 45 dk süre ile 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde bekletildi. İnkübatörden çıkartıldıktan sonra kültür kaplarındaki besiyeri aspire edilerek taze besiyeri ile 1/3 dilüe edildi ve yeni kültür kaplarına ekildi. Bu kaplara 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) eklendi. Astrosit kültürünü saflaştırmak, mikroglia ve oligodendrositlerden kurtarmak için kültür kapları orbital sallayıcıya konularak 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda 80/dakika devirde 24 saat çalkalandı. Bu sürenin sonunda tabandan ayrılarak yüzer duruma geçen mikroglia ve oligodendrositler toplandı. Geriye kültür kabının tabanına yapışık astrosit hücreleri bırakıldı ve astrosit besiyeri değiştirildi. Takibinde 3-4 günde bir astrosit besiyeri değiştirildi. Astrosit hücreleri bitişik duruma gelene kadar çoğaldığında 1/3 oranında pasajlanarak hücre kültürü devam ettirildi ve deneylerde değişik pasajlara ait astrosit kültürleri kullanıldı (70, 71) (Şekil 4).

#### **Bilirubin Solüsyonunun Hazırlanması**

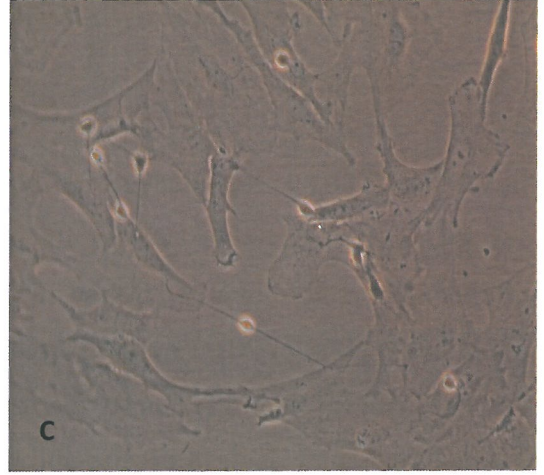
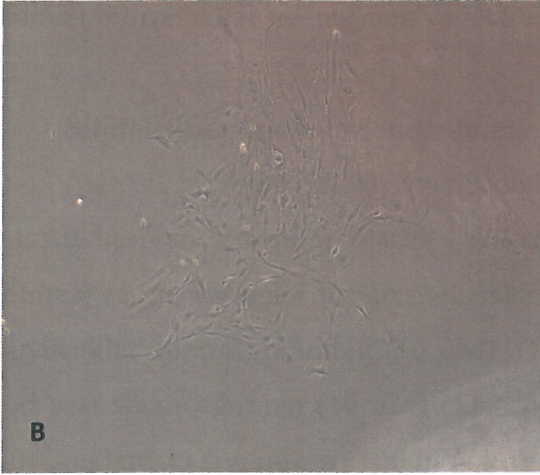
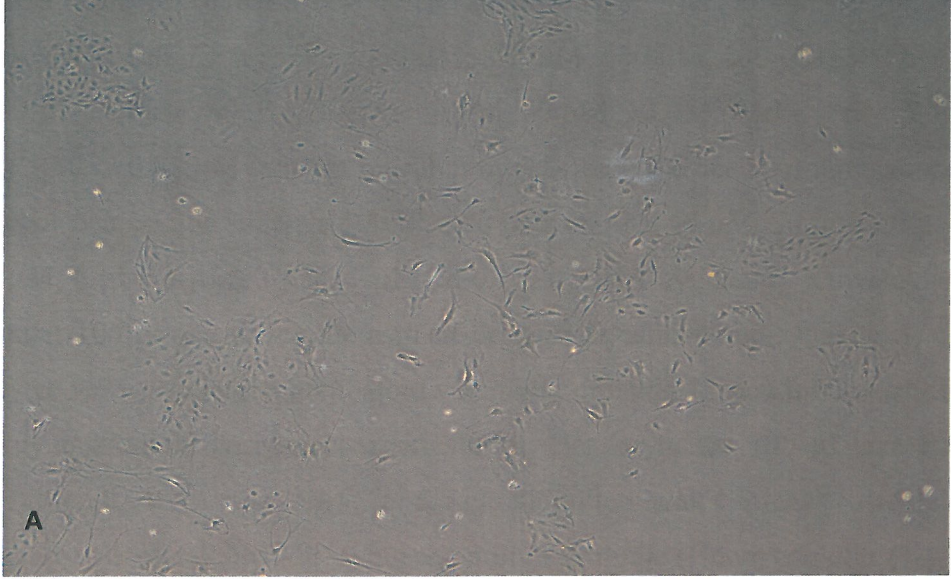
Astrosit hücre kültüründe kullanılan indirekt bilirubin 0.1 N sodyum hidroksit (NaOH) ile çözüldü ve ana stok 200 mM olacak şekilde astrosit besiyeri ile sulandırıldı. Bilirubin stok solüsyonu +4 °C'de ve karanlık ortamda saklandı. Deneyler sırasında stok solüsyonu istenilen bilirubin konsantrasyon değeri elde edilene kadar astrosit besiyeri ile sulandırıldı (72).

#### **Dokosaheksaenoik Asit Solüsyonunun Hazırlanması**

Dokosaheksaenoik asit astrosit besiyeri ile sulandırıldı ve 160 mM ana stok oluşturuldu. Ana stok -20 °C 'de saklandı. Deneyler sırasında ana stok solüsyonu



istenilen DHA konsantrasyonu elde edilene kadar astrosit besiyeri ile sulandırıldı (73).



**Şekil 4 (A, B, C):** Faz kontrast mikroskobu astrosit hücre kültürü.

(A:x10. B:x40. C:x100.)

#### **Bilirubin ve DHA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi**

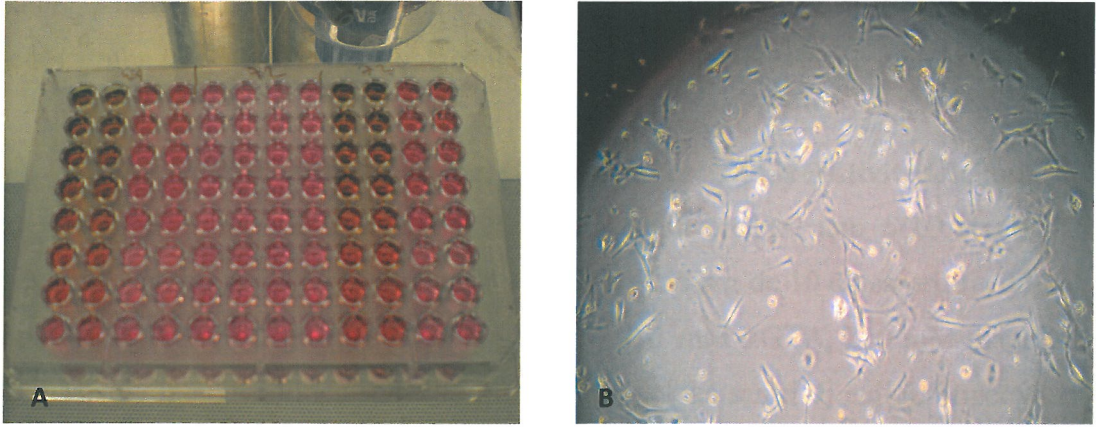
Astrosit hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta  $3 \times 10^4$  hücre/100  $\mu$ l astrosit besiyeri içerisinde olacak şekilde ekildi. Yirmi dört saat sonra kuyucuklar faz kontrast mikroskobunda incelenerek astrosit hücrelerinin varlığı ve canlılıkları tespit edildi (Şekil 5). Kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra plaklara her

kuyucukta 100 µl olacak şekilde astrosit besiyeri eklendi ve sıfırncı saat olarak kabul edildi. Sıfırncı saatteki absorbans ( $A_0$ ) *Cytotox-glo* (Promega) kit kullanılarak Glomaks Sistem (Promega) cihazı ile luminometrik olarak ölçüldü. Ölçüm sonrasında tüm plaklardaki besiyerleri uzaklaştırıldı. Her konsantrasyonda altı kuyucuk olacak şekilde sırasıyla 1000 µM, 800 µM, 600 µM, 500 µM, 300 µM, 200 µM, 100 µM, 80 µM, 60 µM, 50 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 8 µM, 4 µM, 2 µM, 1 µM, 0.1 µM ve 0.01 µM indirekt bilirubin uygulandı. Yine her konsantrasyonda altı kuyucuk olacak şekilde sırasıyla 100 µM, 80 µM, 60 µM, 50 µM, 30 µM, 20 µM, 15 µM, 8 µM, 6 µM, 5 µM, 3 µM, 1 µM ve 0.1 µM DHA uygulandı. Kuyucuklardaki sıvı miktarı 100 µl olacak şekilde astrosit besiyeri ile tamamlandı. Plaklar 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde, karanlık ortamda 72 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µl taze astrosit besiyeri eklendi. Absorbans ( $A_{72}$ ) *Cytotox-glo* kit kullanılarak Glomaks Sistem cihazı ile luminometrik olarak ölçüldü ve hücre canlılığı formülle (Hücre canlılığı (%))= 100 x  $A_{72} / A_0$ ) hesaplandı (74). Tespit edilen hücre canlılığına göre deneyde kullanılacak indirekt bilirubin konsantrasyonu ve DHA konsantrasyonu belirlendi.

### **Sitotoksitenin Değerlendirilmesi**

Astrosit hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta  $3 \times 10^4$  hücre/100 µl astrosit besiyeri içerisinde olacak şekilde ekildi ve 24 saat sonra kuyucuklar faz kontrast mikroskopunda incelenerek hücrelerin varlığı ve canlılıkları tespit edildi. Kuyucuklar kontrol, bilirubin (10 µM), DHA (5 µM) ve DHA (5 µM) eklendikten dört saat sonra bilirubin (10 µM) eklenen astrosit hücreleri olarak gruplara ayrıldı. Kuyucuklardaki sıvı miktarı 100 µl olacak şekilde astrosit besiyeri ile tamamlandı ve  $A_0$  *Cytotox-glo* kit kullanılarak Glomaks Sistem cihazı ile luminometrik olarak ölçüldü. Plaklar 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde, karanlık ortamda 72 saat inkübe edildi. Takibinde kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µl taze astrosit besiyeri eklendi ve  $A_{72}$  *Cytotox-glo* kit kullanılarak Glomaks Sistem cihazı ile luminometrik olarak ölçülerek hücre canlılığı hesaplandı (8, 74) .





Şekil 5 (A, B): A: 96 kuyucuklu plaklar. B: Kuyucuklardaki astrosit hücreleri (x40).

### Apoptozisin Belirlenmesi

Apoptozisin belirlenmesi amacıyla *deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)* tekniğinden yararlanıldı. Deneyleerde *ApoTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection* (Millipore, katalog no S7101) kiti kullanıldı.

Kontrol, bilirubin, DHA, DHA + bilirubin grupları kültür kaplarında 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde, karanlık ortamda 72 saat inkübe edildi. Takibinde kültür kaplarındaki astrosit besiyeri aspire edildi. Hücreler serum fizyolojik ile yıkandı ve tekrar aspire edildi. Tripsin uygulanarak hücreler tabandan kaldırıldı. Astrosit besiyeri ile kültür kabı yıkanarak hücrelerin tamamen kalkması sağlandı. Hücreler falkon tüpüne aktarılarak 1500/dakika devirde beş dakika santrifüj edildi. Hücre çözeltisi üzerine fiksatif solüsyonu (%1 paraformaldehit) konuldu ve 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Falkon tüpü iyice karıştırılarak 100 µl alındı. Lam üzerine yayılarak kurutuldu. Lam post fiksatif solüsyonuna (20 ml etanol + 10 ml asetik asit) konuldu ve -20 °C' de beş dakika bekletildi. Distile su ile yıkanan lam üzerine TdT solüsyonu eklendikten sonra 37 °C'de etüvde bir saat inkübe edildi. *Stop wash buffer* ile lamlar 15 sn yıkandıktan sonra beş dakika oda ısısında 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 ilave edildi ve 10 dk oda ısısında bekletildi. Lamlara n-bütanol eklendikten sonra 30 sn inkübe edilip ksilen kondu ve altı dakika inkübe edildi.

Lamlar kurutulularak entelan ve lamel ile kapatıldı. Faz kontrast mikroskopunda her deney grubu için altı alan sayılarak canlı ve apoptotik hücreler tespit edildi (75).

### **Süperoksid Dismutaz, Katalaz, Glutasyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü**

Astrosit hücre kültürlerinde SOD aktivitesinin ölçümü için *SOD Assay Kit* (Cayman, katalog no 706002) kullanıldı. Hücreler 1500xg'de 10 dk santrifüj edilerek toplandı ve 20 mM soğuk *HEPES buffer* (pH 7.2, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, 70 mM sukroz) eklendikten sonra 1500xg'de beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak çökelti buzda bekletildi. Ölçüm yapılacak kuyucuklara 200 µl radikal dedektör ve 10 µl örnek konuldu. Reaksiyonu başlatmak için 20 µl ksantin oksidaz eklendi. Oda ısısında 20 dk sallayıcıda inkübe edildikten sonra 450 nm absorbansta Glomaks Sistem cihazı ile ölçüm yapıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak verildi (76).

Katalaz aktivitesi ölçümü için *CAT Assay Kit* (Cayman, katalog no 707002) kullanıldı. Hücreler 1500xg'de 10 dk santrifüj edilerek toplandı. *Cold buffer* (potasyum fosfat, pH 7.0, 1 mM EDTA) eklendikten sonra 10000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak çökelti buzda bekletildi. Ölçüm yapılacak kuyucuklara 100 µl *assay buffer*, 30 µl metanol ve 20 µl örnek konuldu. Reaksiyonu başlatmak için 20 µl hidrojen peroksit eklendi. Oda ısısında 20 dk sallayıcıda inkübe edildikten sonra 30 µl potasyum hidroksit eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve 30 µl kromogen eklendi. Oda ısısında 10 dk sallayıcıda inkübe edilip 10 µl potasyum periodate eklendi. Oda ısısında 5 dk sallayıcıda inkübe edilerek 540 nm absorbansta Glomaks Sistem cihazı ile ölçüm yapıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak verildi (77).

Glutasyon peroksidaz aktivitesinin ölçümü için *GPx Assay Kit* (Cayman, katalog no 703102) kullanıldı. Hücreler 1500xg'de 10 dk santrifüj edilerek toplandı. *Cold buffer* (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM DTT ) eklendikten sonra 10000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak çökelti buzda bekletildi. Ölçüm yapılacak kuyucuklara 100 µl *assay buffer*, 50 µl substrat karışımı ve 20 µl örnek konuldu. Reaksiyonu başlatmak için 20 µl GPx kumen hidroperoksit eklenerek 340 nm absorbansta birer dakika ara ile en az beş değer ölçüldü. Sonuçlar U/ml olarak verildi (78).

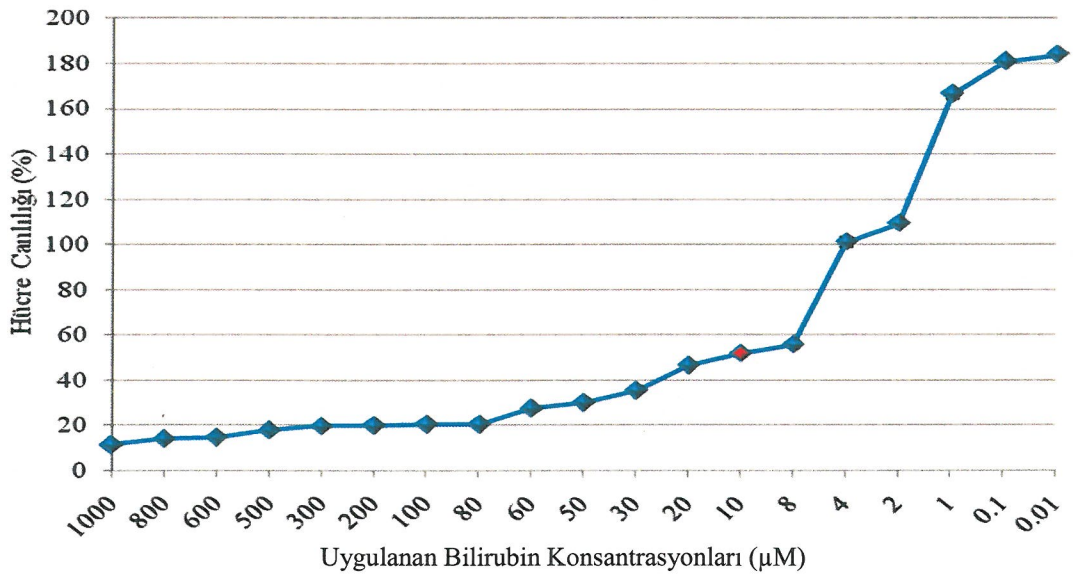
### **İstatistiksel Analiz**

Tüm veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Çalışma grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirlemede non-parametrik test (*Kruskal Wallis* ve *Mann-Whitney U* testi) kullanıldı. Verilerin bilgisayarda hesaplanmasında *statistical packages for social sciences* (SPSS) (*SPSS for Windows* 17.0; SPSS, Chicago, Illinois, A.B.D) yazılım programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0.05$  olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

### Bilirubin ve DHA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İndirekt bilirubin için uygulanan konsantrasyonlarda 72. saatteki hücre canlılığı belirlendi. Sonuçlar uygulanan konsantrasyon: % hücre canlılığı±standart sapma olarak verildi. Sırasıyla 1000  $\mu\text{M}$ : %11.5±0.9, 800  $\mu\text{M}$ : %13.9±1.3, 600  $\mu\text{M}$ : %14.6±1, 500  $\mu\text{M}$ : %17.8±0.5, 300  $\mu\text{M}$ : %19.6±0.3, 200  $\mu\text{M}$ : %20±1.07, 100  $\mu\text{M}$ : %20.4±0.85, 80  $\mu\text{M}$ : %20.4±0.1, 60  $\mu\text{M}$ : %27.5±0.85, 50  $\mu\text{M}$ : %30.1±0.59, 30  $\mu\text{M}$ : %35.4±0.8, 20  $\mu\text{M}$ : %46.4±1.44, 10  $\mu\text{M}$ : %51.6±1.8, 8  $\mu\text{M}$ : %55.7±1.6, 4  $\mu\text{M}$ : %102±2.08, 2  $\mu\text{M}$ : %109.1±0.85, 1  $\mu\text{M}$ : %166.3±1.8, 0.1  $\mu\text{M}$ : %180.6±0.64 ve 0.01  $\mu\text{M}$ : %183.6±0.8 saptandı (Şekil 6). İndirekt bilirubin için astrosit hücrelerinin %50'sine toksik olan konsantrasyon ( $\text{TC}_{50}$ ) değeri 10  $\mu\text{M}$  olarak tespit edildi ve sitotoksisite, apoptozis, SOD, CAT ve GPx aktivite ölçümü deneylerinde bu konsantrasyon kullanıldı.

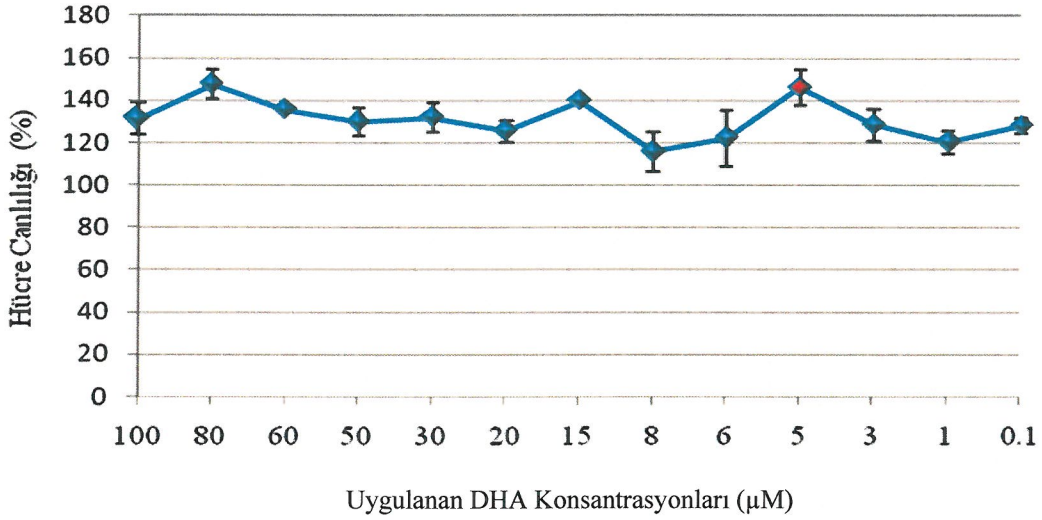


Şekil 6: Uygulanan bilirubin konsantrasyonları ve  $\text{TC}_{50}$  değeri

Dokosaheksaenoik asit için uygulanan konsantrasyonlarda 72. saatteki hücre canlılığı belirlendi. Sonuçlar uygulanan konsantrasyon: % hücre canlılığı±standart sapma olarak verildi. Sırasıyla 100  $\mu\text{M}$ : %131.2±7.6, 80  $\mu\text{M}$ : %145.7±7.02, 60  $\mu\text{M}$ : %135.5±1.28, 50  $\mu\text{M}$ : %129.8±6.4, 30  $\mu\text{M}$ : %132±7.05, 20  $\mu\text{M}$ : %125.6±5.1, 15



$\mu\text{M}$ : %139.7 $\pm$ 1.28, 8  $\mu\text{M}$ : %115.7 $\pm$ 9.6, 6  $\mu\text{M}$ : %122.1 $\pm$ 13.4, 5  $\mu\text{M}$ : %146.1 $\pm$ 8.3, 3  $\mu\text{M}$ : %128.4 $\pm$ 7.6, 1  $\mu\text{M}$ : %120.4 $\pm$ 5.3 ve 0.1  $\mu\text{M}$ : %127.8 $\pm$ 3.7 saptandı (Şekil 7). DHA için toksik konsantrasyon tespit edilemedi ve hücre canlılığını en fazla arttıran konsantrasyon 5  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi. Sitotoksosite, apoptozis, SOD, CAT ve GPx aktivite ölçümü deneylerinde bu konsantrasyon kullanıldı.



Şekil 7 : Uygulanan DHA konsantrasyonları ve seçilen DHA konsantrasyonu

### Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Grupların hücre canlılığı 72. saatte değerlendirildi. Başlangıçtaki hücre canlılığı %100 olarak değerlendirildi. Kontrol grubunda hücre canlılığının başlangıça göre %61 $\pm$ 4.5 arttığı, bilirubin grubunda ise başlangıçtaki hücrelerin %51 $\pm$ 1.8'inin canlı kaldığı görüldü. Kontrol grubuna göre bilirubin grubunda hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p<0.001$ ). Hücre canlılığının DHA grubunda %146 $\pm$ 8 arttığı, DHA+bilirubin grubunda ise %110 $\pm$ 6.3 arttığı görüldü. Kontrol ve bilirubin gruplarına göre DHA ve DHA+bilirubin gruplarında hücre canlılığındaki artış ve DHA grubuna göre DHA+bilirubin grubunda hücre canlılığındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p<0.001$ ). Tüm gruplar karşılaştırıldığında başlangıça göre 72. saatte hücre canlılığındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p<0.001$ ) (Tablo 2, Şekil 8).

**Tablo 2:** Grupların hücre canlılığındaki değişim (%)

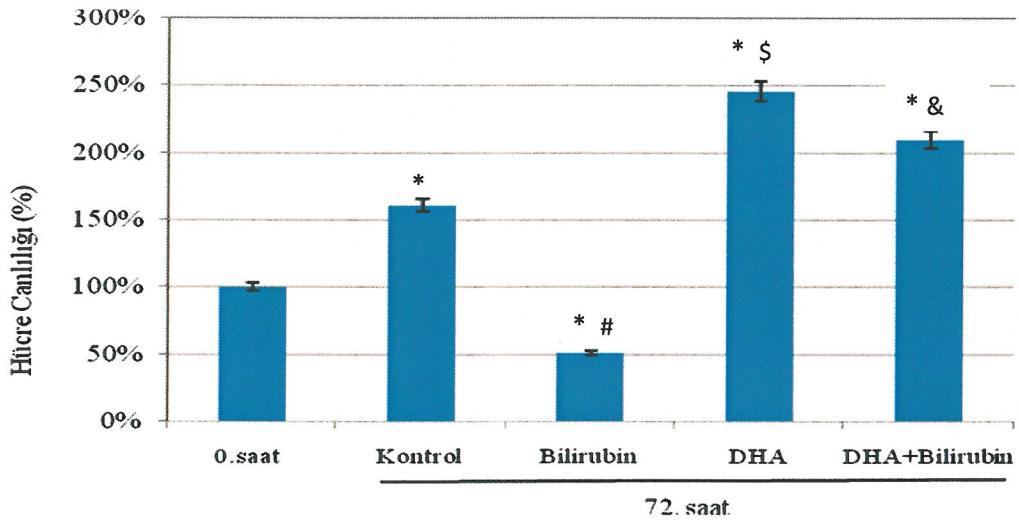
Gruplar *	Hücre canlılığındaki değişim (%)
Kontrol	61±4.5
Bilirubin	51±1.8 #
DHA	146±8 <sup>§</sup>
DHA+bilirubin	110±6.3 &

\*Tüm gruplar 0-72. saat hücre canlılığında değişim açısından karşılaştırıldığında (p=0.000)

#Bilirubin grubunda hücre canlılığındaki azalma kontrol, DHA, DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında (p=0.000)

<sup>§</sup>DHA grubunda hücre canlılığındaki artış kontrol, bilirubin, DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında (p=0.000)

&DHA+bilirubin grubunda hücre canlılığındaki artış kontrol ve bilirubin gruplarıyla karşılaştırıldığında (p=0.000)



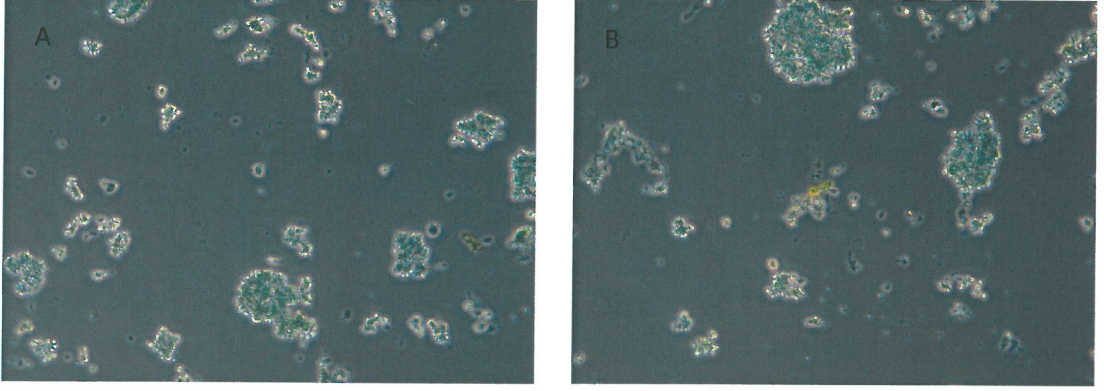
**Şekil 8:** Grupların hücre canlılığındaki değişim (%).

### Apoptozisin Değerlendirilmesi

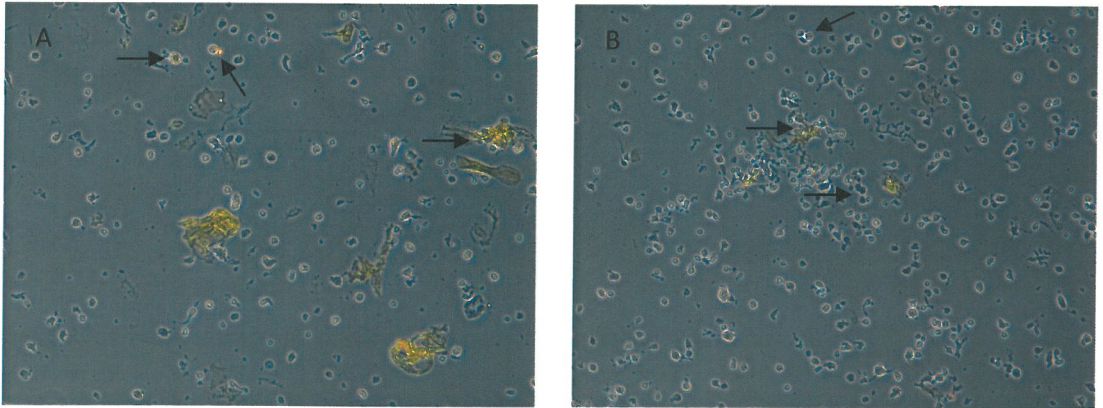
Grupların astrosit hücrelerindeki apoptozisi 72. saatte değerlendirildi. Kontrol grubunda apoptozis (Şekil 9-A) %1.75±0.8, DHA grubunda apoptozis (Şekil 9-B) %1.6±0.5, bilirubin grubunda apoptozis (Şekil 10) %25.27±2.1, DHA+bilirubin grubunda apoptozis (Şekil 11) %10.9±0.5 saptandı. Bilirubin grubundaki apoptozis, kontrol, DHA, DHA+bilirubin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.001). DHA+bilirubin grubundaki apoptozis, kontrol ve DHA grubu ile karşılaştırıldığında ve apoptozisteki azalma bilirubin grubu ile



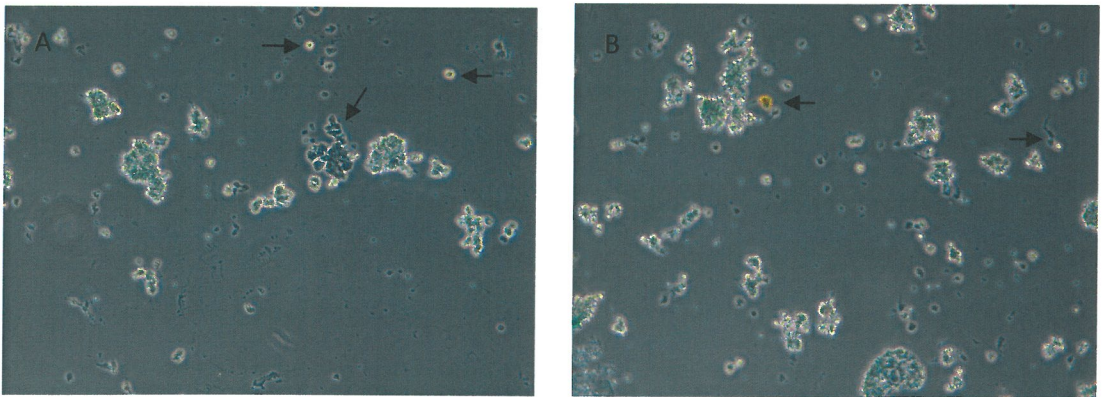
karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p < 0.001$ ). Kontrol grubu DHA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık saptanmadı ( $p > 0.05$ ) (Tablo 3, Şekil 12).



Şekil 9: TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. A: Kontrol grubu (x40). B: DHA grubu (x40).



Şekil 10 (A, B): TUNEL boyama ile astrosit hücreleri. İndirekt bilirubine bağlı apoptozis (x40).



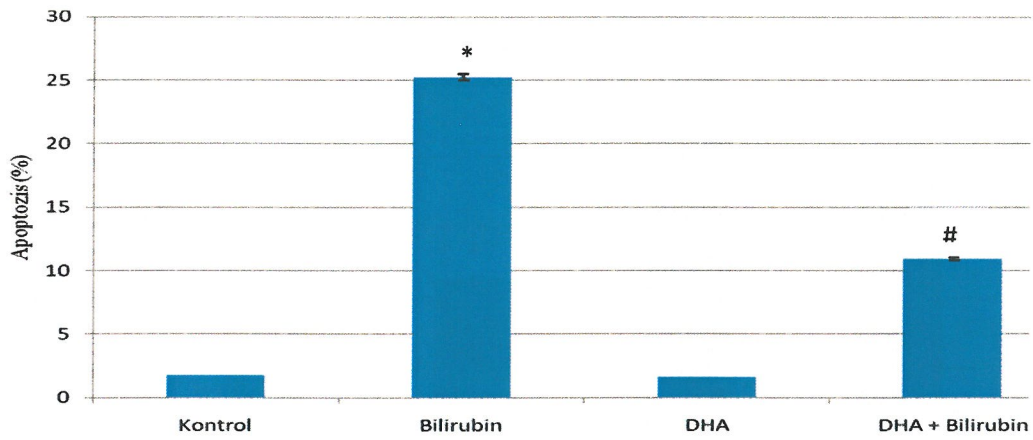
Şekil 11 (A, B): TUNEL boyama ile astrosit hücreleri, DHA+bilirubin grubu (x40).

**Tablo 3:** Grupların astrosit hücrelerindeki apoptozisin değerlendirilmesi

Gruplar	Apoptozis (%)
Kontrol	1.75±0.8
Bilirubin	25.27±2.1*
DHA	1.6±0.5
DHA+bilirubin	10.9±0.5 <sup>#</sup>

\*Bilirubin grubundaki apoptozis kontrol, DHA, DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında (p=0.000)

<sup>#</sup>DHA+bilirubin grubundaki apoptozis kontrol, DHA grupları ile ve apoptozisteki azalma bilirubin grubu ile karşılaştırıldığında (p=0.000)



**Şekil 12:** Grupların astrosit hücrelerindeki apoptozisin değerlendirilmesi

### Süperoksid Dismutaz Aktivite Ölçümünün Değerlendirilmesi

Grupların SOD aktivitesi 72. saatte değerlendirildi. Kontrol grubunda SOD aktivitesi 0.24±0.05 U/mg protein, bilirubin grubunda SOD aktivitesi 0.22±0.02 U/mg protein, DHA grubunda SOD aktivitesi 0.42±0.0007 U/mg protein, DHA+bilirubin grubunda SOD aktivitesi 0.38±0.02 U/mg protein olarak tespit edildi. DHA grubundaki SOD aktivite artışı kontrol, bilirubin ve DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla p<0.01, p<0.001, p<0.05). DHA+bilirubin grubundaki SOD aktivite artışı kontrol ve bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı saptandı (sırasıyla p<0.01, p<0.001). Bilirubin grubundaki aktivite azalması kontrol, DHA ve DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (sırasıyla p<0.05, p<0.001, p<0.01) (Tablo 4, Şekil 13).



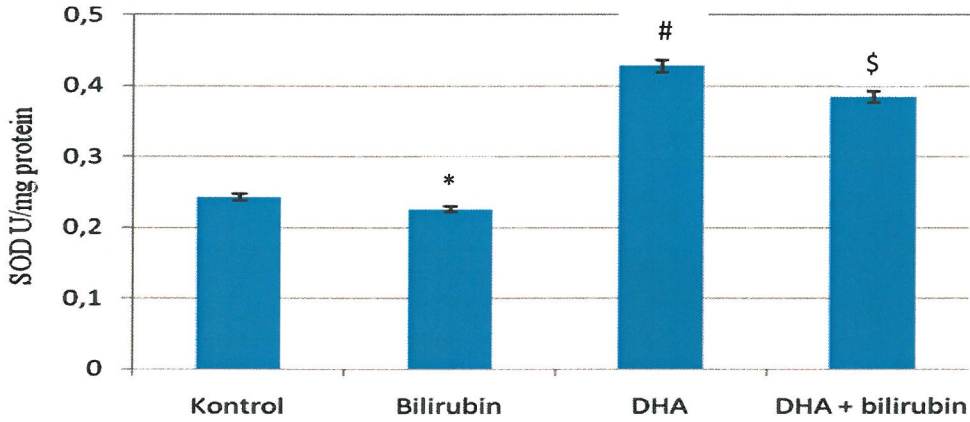
**Tablo 4:** Grupların SOD aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi

Gruplar	SOD Aktivitesi (U/mg protein)
Kontrol	0.24±0.05
Bilirubin	0.22±0.02 *
DHA	0.42±0.0007 #
DHA+bilirubin	0.38±0.02 \$

\*Bilirubin grubunda SOD aktivitesindeki azalma kontrol, DHA, DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla p=0.026, p=0.000, p=0.003)

#DHA grubunda SOD aktivitesindeki artış kontrol, bilirubin, DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla p=0.001, p=0.000, p=0.013)

\$DHA+bilirubin grubunda SOD aktivitesindeki artış kontrol ve bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla p=0.002, p=0.003)



**Şekil 13:** Grupların SOD aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi.

### Katalaz Aktivite Ölçümünün Değerlendirilmesi

Gruplarda CAT aktivitesi 72. saatte değerlendirildi. Kontrol grubunda CAT aktivitesi 1.2±0.01 U/mg protein, bilirubin grubunda CAT aktivitesi 0.22±0.004 U/mg protein, DHA grubunda CAT aktivitesi 5.75±0.002 U/mg protein, DHA+bilirubin grubunda CAT aktivitesi 2.5±0.004 U/mg protein saptandı. DHA grubunda CAT aktivite artışı kontrol, bilirubin, DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında (p<0.001), DHA+bilirubin grubunda CAT aktivite artışı kontrol ve bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0.001). Bilirubin grubunda CAT aktivite azalması kontrol, DHA,

DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (sırasıyla  $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ )(Tablo 5, Şekil 14).

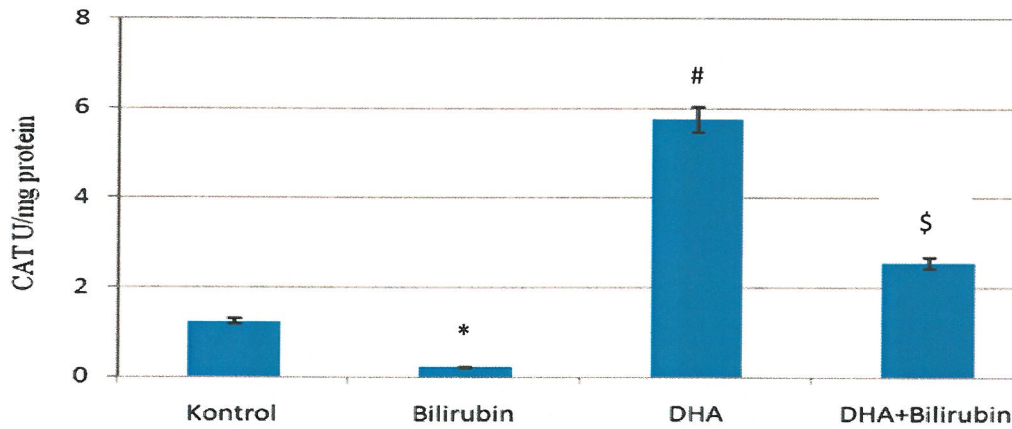
**Tablo 5:** Grupların CAT aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi

Gruplar	CAT Aktivitesi (U/mg protein)
Kontrol	1.2±0.01
Bilirubin	0.22±0.004 *
DHA	5.75±0.002 #
DHA+bilirubin	2.5±0.004 \$

\*Bilirubin grubunda CAT aktivite azalması kontrol, DHA, DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla  $p=0.011$ ,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$ )

#DHA grubunda CAT aktivite artışı kontrol, bilirubin, DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında ( $p=0.000$ )

\$DHA+bilirubin grubunda CAT aktivite artışı kontrol, bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında ( $p=0.000$ )



**Şekil 14:** Grupların CAT aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi.

### Glutasyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü

Grupların GPx aktivitesi 72.saatte değerlendirildi. Kontrol grubunda GPx aktivitesi  $0.6±0.015$  U/ml, bilirubin grubunda GPx aktivitesi  $0.44±0.010$  U/ml, DHA grubunda GPx aktivitesi  $1.02±0.011$  U/ml, DHA+bilirubin grubunda GPx aktivitesi  $0.64±0.011$  U/ml olarak tespit edildi. DHA grubunda GPx aktivite artışı kontrol, bilirubin ve DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0.001$ ). DHA+bilirubin grubunda GPx aktivite artışı kontrol ve bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel

olarak anlamlı olduğu saptandı (sırasıyla  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ). Bilirubin grubunda GPx aktivite azalması kontrol, DHA ve DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık tespit edildi ( $p<0.001$ )(Tablo 6, Şekil 15).

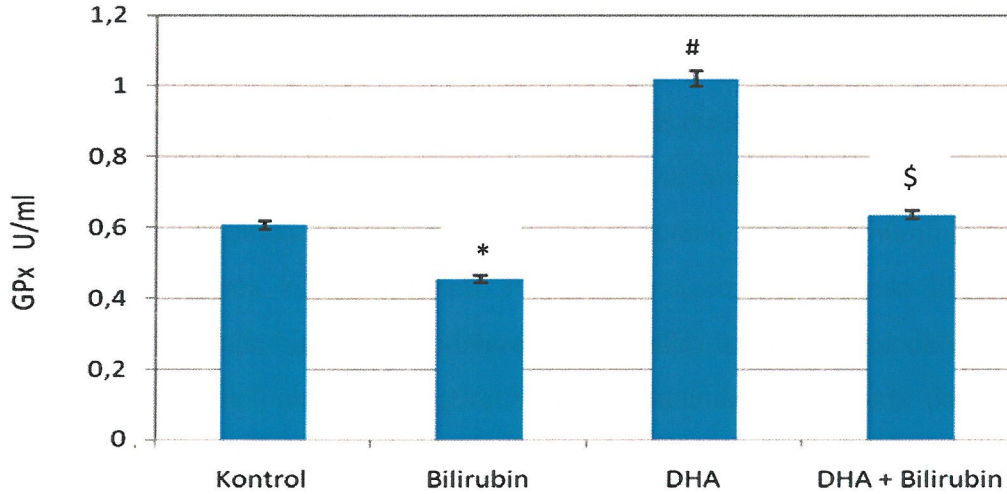
**Tablo 6:** Grupların GPx aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi

Gruplar	GPx Aktivitesi (U/ml)
Kontrol	0.6±0.015
Bilirubin	0.44±0.010 *
DHA	1.02±0.011#
DHA+bilirubin	0.64±0.011 <sup>§</sup>

\*Bilirubin grubunda GPx aktivite azalması kontrol, DHA ve DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında ( $p=0.000$ )

#DHA grubunda GPx aktivite artışı kontrol, bilirubin, DHA+bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında ( $p=0.000$ )

<sup>§</sup>DHA+bilirubin grubunda GPx aktivite artışı kontrol ve bilirubin grupları ile karşılaştırıldığında (sırasıyla  $p=0.002$ ,  $p=0.001$ )



**Şekil 15:** Grupların GPx aktivitesi ölçümünün değerlendirilmesi.

## TARTIŞMA

Yenidoğan sarılığı bebeklerin hemen hemen tümünde yaşamın ilk günlerinde görülen, büyük bir kısmı fizyolojik sarılık olarak nitelendirilen, değişik derecelerde bilirubin yüksekliği ile seyreden sarı turuncu renkteki bilirubin pigmentinin dokularda birikmesiyle karakterize bir durumdur (3). Sarılığın birçok nedeni olmasına rağmen temel mekanizma bilirubinin sentezi, transportu ve metabolizmasındaki bozukluktur (1).

Bilirubin hem katabolizmasının biyolojik aktif son ürünüdür (1, 2). Ortaya çıkan bilirubin pigmentinin herhangi bir özelliği olmayan bir son ürün ve atık madde mi yoksa bunun ötesinde fizyolojik rolü bulunan önemli bir molekül mü olduğu halen açıklık kazanmamıştır (4). Bilirubin düşük düzeylerde antioksidan ve nöroprotektif, yüksek düzeylerde ise oksidan ve nörotoksiktir (1). Zamanında tanı konulup tedavi edilmeyen yüksek bilirubin düzeyleri akut bilirubin ensefalopatisi, kernikterus ve bilirubinin indüklediği nörolojik disfonksiyona (BİND) neden olur (56). BİND hafif ve belirsiz nörolojik bozukluklardan (izole işitsel nöropati, hareket bozuklukları, distoni, bilişsel bozukluklar, hafif zeka geriliği), akut bilirubin ensefalopatisi ve post ikterik sekelleri de içine alan geniş bir spektrum gösterir (20).

Fizyolojik şartlarda insanlardaki plazma bilirubin konsantrasyonu 5-17  $\mu\text{M}$  (17  $\mu\text{M}$ =1 mg/dl) arasında değişir ve bu bilirubinin hemen tamamı albumine bağlı olarak bulunur. Plazma konsantrasyonu 300  $\mu\text{M}$ 'ün üzerine çıktığında bilirubin beynin bazı bölgelerinde birikebilir ve hücre fonksiyonları üzerindeki toksik etkileri nedeniyle nörolojik disfonksiyon geliştirebilir (37). Bununla birlikte orta derecede bilirubin yüksekliğinin nörolojik bozukluklara yol açtığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Soorani-Lunsing ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 233-444  $\mu\text{mol/L}$  (13.6-25 mg/dl) düzeylerinde bilirubin yüksekliğinin hayatın ilk yılında minor nörolojik bozukluklara yol açtığı, özellikle bilirubin düzeyi 335  $\mu\text{mol/L}$  (20 mg/dl)'nin üzerine çıktığında nörolojik anormalliklerin daha belirgin olduğu görülmüştür (79).

Gürses ve ark.'nın (80) yaptığı çalışmada 16-33 mg/dl aralığında bilirubin düzeylerine sahip term yenidoğanlara elektroensefalogram (EEG) çekilmiş, EEG'de bilirubin yüksekliğinin elektrokortikal aktivitede değişiklikler yaptığı ve bu yenidoğanlarda elektrokortikal maturasyonu geciktirdiği saptanmıştır. Yüksek

plazma indirekt bilirubin düzeylerinde santral sinir sistemine bilirubin girişinin arttığı, nörotoksisite ve bilirubin ensefalopatisine yol açtığı, bu durumun genellikle plazma indirekt bilirubin düzeyleri 300  $\mu\text{M}$ 'ün üzerine çıktığında görülmesine rağmen yenidoğanlar için fizyolojik sayılan düzeyden hafifçe yüksek düzeylerde bile (200  $\mu\text{M}$ =11.7 mg/dl) görülebileceği belirtilmektedir (81).

Yüksek bilirubin düzeylerinin pekçok hücreye toksik etkisinin olduğu saptanmakla birlikte bilirubine en hassas hücrelerin nöronal hücreler olduğu gösterilmiştir (82). Nöral ve glial hücrelerin indirekt bilirubin toksisitesine hassas olduğu gösterildikten sonra bu hücreler hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır (72). Glial hücrelerden olan astrositler nöronlara metabolik destek sağlamakta ve kan beyin bariyerinin yapısına katılmaktadır. Ayrıca astrositler, indirekt bilirubinin nöronlara taşınmasında ve bilirubinin toksik etkileri ile hasarlanan nöronlardan salınan toksik metabolik atıkların temizlenmesinde rol oynamaktadır (51, 52, 83). Aynı zamanda astrositlerin kan beyin bariyeri yetmezliğinde indirekt bilirubin ile temas eden ilk hücreler olduğu belirtilmektedir (72). Bu nedenle biz de çalışmamızda bilirubin nörotoksisitesini değerlendirmek için astrosit hücrelerini kullandık.

İndirekt bilirubinin astrosit hücrelerine olan toksik etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Kumral ve ark.'nın (72) yaptıkları çalışmada neonatal indirekt hiperbilirubinemili hastalardan alınan serumların, belirli konsantrasyon ve zaman dilimine bağlı olarak astrositlere toksik etkileri olduğu ve apoptotik hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. Silva ve ark. (83) astrositleri 17  $\mu\text{M}$  ve 86  $\mu\text{M}$  indirekt bilirubin ile sırasıyla 4, 8, 16 ve 22 saat süreyle inkübe ederek, astrositlerdeki nekrotik ve apoptotik gelişimi incelemiştir; konsantrasyon ve zamana bağlı olarak astrositlerde nekroz ve apoptoziste artış olduğunu, en yüksek hücre ölümünün 86  $\mu\text{M}$  indirekt bilirubin konsantrasyonunda ve 22 saatlik inkübasyonda olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da en yüksek astrosit hücre ölümü uyguladığımız en yüksek indirekt bilirubin konsantrasyonu olan 1000  $\mu\text{M}$ 'de %90 oranında saptadık. Silva ve ark.'nın (83) çalışmasında uygulanan dozlara yakın dozlarda indirekt bilirubin uyguladığımızda da 80  $\mu\text{M}$ 'de astrosit hücrelerinin yaklaşık %80'inin, 20  $\mu\text{M}$ 'de ise %45'inin 72. saatte öldüğünü belirledik. Önceki çalışmalarla benzer şekilde astrositlere uygulanan indirekt bilirubin konsantrasyonu ve astrositlerin indirekt bilirubine maruz kaldığı süre arttıkça hücre ölümünün arttığını tespit ettik.



Rhine ve ark. (50) primer rat serebral astrosit hücre kültüründe bilirubin toksik etkilerini araştırmış, 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  ve 2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında indirekt bilirubini ortama ekleyerek 120 saate kadar inkübe etmiş, en belirgin toksik etkinin 200  $\mu\text{M}$  ve 2000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ve 1.5-24 saat aralığında olduğunu tespit etmiştir. 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında toksik etki saptamamıştır. Çalışmamızda 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda 72 saatlik indirekt bilirubin inkübasyonu sonunda %80 civarında astrosit hücre ölümü gerçekleştiğini gösterdik. Bu çalışmaya benzer şekilde indirekt bilirubin 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda astrosit hücrelerine toksik etkisinin olmadığını saptadığımız gibi Rhine ve ark.'nın (50) çalışmasından farklı olarak 1  $\mu\text{M}$  indirekt bilirubin konsantrasyonunda astrosit hücre canlılığının arttığını gördük. Bu sonuç indirekt bilirubin düşük dozda nöroprotektif olduğu gibi hücre canlılığını da arttırdığını göstermektedir.

Taştekin ve ark.'nın (84) yaptıkları çalışmada, primer hücre kültüründe indirekt bilirubin 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  ve 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında kullanılmış, dört saatlik inkübasyondan sonra 1000  $\mu\text{M}$  indirekt bilirubin konsantrasyonunda %90 hücre ölümü saptanmış, 0.01  $\mu\text{M}$ -100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları arasında ise hücre ölümünü daha az olmakla birlikte %37- %47 aralığında tespit edilmiştir. Çalışmamızda indirekt bilirubin 10  $\mu\text{M}$  ve 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında benzer oranda astrosit hücre ölümü olduğunu gösterdik. Ancak Taştekin ve ark.'nın (84) çalışmasından farklı olarak 0.01  $\mu\text{M}$  ve 0.1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında hücreye toksik etkisinin olmadığını ve hücre canlılığını arttırdığını saptadık.

Berns ve ark. (85) rat kortikal nöron hücre kültürlerinde ibuprofenin bilirubin nörotoksitesine etkisini araştırdıkları çalışmada, 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda indirekt bilirubin hücre canlılığını %52 oranında azalttığını, 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda ise hücre canlılığını azaltıcı etkisinin olmadığını tespit etmiştir. Çalışmamızda Berns ve ark. (85) ile Taştekin ve ark.'nın (84) çalışmasındakine benzer şekilde astrosit hücrelerinde 10  $\mu\text{M}$  indirekt bilirubin konsantrasyonunda %50 oranında hücre ölümü gerçekleştiğini saptadık.

Çalışmamızda indirekt bilirubini sırasıyla 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ,

300 µM, 500 µM, 600 µM, 800 µM ve 1000 µM konsantrasyonlarında uyguladık. 1000 µM konsantrasyonunda hücrelerin büyük çoğunluğunun öldüğünü, uygulanan konsantrasyon azaldıkça hücre ölüm oranlarının da azaldığını tespit ettik. Dört µM'ün altındaki konsantrasyonlarda ise hücre ölümü görülmediği gibi hücre canlılığını da arttırdığı saptandı. Bu sonuç literatürde belirtilen indirekt bilirubin yüksek dozda oksidan ve nörotoksik, düşük dozda ise antioksidan ve nöroprotektif olduğu görüşünü desteklemektedir. İndirekt bilirubin astrosit hücreleri için TC<sub>50</sub> değeri 10 µM olarak tespit ettik ve sitotoksisite, apoptozis, SOD, CAT ve GPx enzim aktivitesi deneylerinde bu konsantrasyonu kullandık.

Dokosaheksaenoik asidin çeşitli fizyolojik sistemler üzerindeki etkileri geçen 25 yıl süresince çeşitli çalışmalara konu olmuştur (10). Santral sinir sistemi, retinal fonksiyonlar, otoimmün hastalıklar ve immunité, inflamasyon ve romatizmal hastalıklar, kalp hastalıkları, kanser gibi birçok konuda DHA'nın etkileri araştırılmaktadır (12-18, 63). Son yıllarda ise eritrositler, lökositler, endotel hücreleri ve pankreatik beta hücreleri gibi çok sayıdaki hücrede hücre fonksiyonları, hücre içi yapılar ve hücre membranları üzerine etkileri değerlendirilmektedir. DHA farklı dozlarda değişik hücre gruplarında farklı etkiler göstermektedir (10). DHA sinir sisteminin major yapısal komponentlerinden biridir ve eksikliği nöral fonksiyon bozukluğuna ve nöral hücre yapılarında etkilenmeye yol açabilir (10-12).

Lim ve ark.'nın (12) çalışmasında yenidoğan fareler postnatal 2. günden 15. haftaya kadar omega-3 yağ asitlerinden yoksun diyet ile beslenmiş, beyin DHA düzeylerinde %60 azalma ve beyin öğrenme ile ilgili fonksiyonlarında eksiklik saptanmıştır. Bermen ve ark.'ı (18) ratlara sırasıyla 1 mg/kg, 2.5 mg/kg ve 5 mg/kg DHA'yı intraperitoneal olarak uygulamış ve dört saat sonra hipoksi oluşturmuştur. DHA ile profilaksi uygulanan grupta beyin dokusunda özellikle de hipokampusta hacim kaybının azaldığı, motor fonksiyonları gösteren testlerin normale yakın sonuçlar verdiği böylece perinatal hipoksik-iskemide DHA'nın nöroprotektif etkisinin olduğu gösterilmiştir. Uygulanan tüm dozlarda benzer şekilde etkili sonuçlar rapor edilmiştir.

Shimazawa ve ark. (15) retinal ganglion hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikallerine karşı DHA'nın etkili olduğu minimum konsantrasyonları sırasıyla 0.1 µM, 10 µM ve 100 µM olarak bildirmiştir.

Bu konsantrasyonlardan 0.1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  DHA'nın hidrojen peroksitin indüklediği hücre canlılığındaki azalmayı inhibe ettiği, 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  DHA'nın reoksijenasyona bağlı hücre canlılığındaki azalmayı inhibe ettiği ve DHA'nın retinal ganglion hücrelerini oksidatif stresten koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında DHA'nın hücrelere toksik etki yaratmadığını, aksine hücre canlılığını artırdığını saptadık. Bu sonuçla DHA'nın astrosit hücreleri üzerinde bu dozlarda olumlu etkilerinin olduğunu gösterdik.

Kaur ve ark. (73) metil civanın indüklediği nörotoksisitede DHA'nın koruyucu etkisini primer nöral hücre kültürlerinde araştırmıştır. Serebellar astrosit ve nöron hücre kültürlerini hazırladıktan sonra DHA'yı 30  $\mu\text{M}$  ve 90  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bu kültürlerle uygulamış ve 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda ortama 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda metil civa eklemiştir. Her iki konsantrasyonda da hem nöron hem de astrosit hücre kültürlerinde DHA'nın metil civanın nörotoksik etkisine karşı koruyucu etkisi tespit edilmiştir. Çalışmamızda 30  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda DHA'yı astrosit hücrelerine 72 saat süreyle uyguladığımızda hücre canlılığını %132 oranında artırdığını saptadık.

Retinal fotoreseptörlerle ilgili yapılan çalışmalarda DHA'nın 2  $\mu\text{M}$ -6.7  $\mu\text{M}$  aralığı gibi dar bir aralıkta koruyucu olduğu ancak 10  $\mu\text{M}$ 'ün üzerindeki konsantrasyonlarda ise hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (86, 87). Çalışmamızda DHA'nın bu çalışmalarda belirtilen 2  $\mu\text{M}$ -6.7  $\mu\text{M}$  aralığında hücre canlılığını artırdığı ve toksik etkisinin olmadığını, ancak bu çalışmalardan farklı olarak 10  $\mu\text{M}$ 'ün üzerindeki konsantrasyonlarda astrosit hücreleri üzerine toksik etkisinin olmadığını tam tersine hücre canlılığını artırdığını tespit ettik. Bu sonuçlar DHA'nın astrosit hücre yaşamı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu görüşümüzü desteklemektedir.

Literatürde değişik hücre türlerinde farklı konsantrasyonlarda DHA'nın farklı etkiler gösterdiği bildirilmiştir (12, 15, 18, 73, 86, 87). Bu nedenle çalışmamızda DHA'nın astrosit hücrelerine karşı olan toksik etkisini de araştırdık. Sırasıyla 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında DHA'yı astrosit hücre kültürü ortamına uyguladık. Bu konsantrasyonlarda toksik etki saptamadığımız gibi %115-%146



aralığında değişik oranlarda hücre canlılığını arttırdığı tespit ettik. Hücre canlılığını en fazla arttıran konsantrasyonun 5  $\mu\text{M}$  olduğu belirledik. Bu konsantrasyon literatürde de etkili koruyucu konsantrasyon aralığında bildirilmektedir (86, 87). Ayrıca literatürde bildirilenlerin aksine 10  $\mu\text{M}$ 'ün üzerindeki DHA konsantrasyonlarında hücre ölümü saptamadık. Çalışmamızda sitotoksisite, apoptozis, SOD, CAT ve GPx enzim aktivite ölçümü deneylerinde en etkili konsantrasyon olarak saptadığımız 5  $\mu\text{M}$  DHA'yı kullandık.

Son yıllarda çeşitli maddelerin bilirubin nörotoksisitesinde koruyucu etkisini araştırmak amacıyla çalışmalar yapılmıştır (84, 88, 89). L-Karnitin'in bilirubinin indüklediği nöronal hücre ölümünü önleyici etkisini araştıran bir çalışmada, serebellar granüler hücre kültüründe 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda indirekt bilirubinin %47.7 oranında hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir. L-Karnitin hücre kültürlerine 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  ve 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında uygulanarak 45 dk inkübe edilmiş, takibinde 100  $\mu\text{M}$  indirekt bilirubin hücre kültürüne eklenmiş ve 20 saatlik inkübasyon uygulanmıştır. Nöronal hücre ölümü tripan mavisi ile ışık mikroskopunda değerlendirilmiş ve sonuçlar oransal (%) hücre canlılığı olarak verilmiştir. L-Karnitin'in 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında indirekt bilirubin nörotoksisitesine etkisinin olmadığı, 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda hücre ölümünü %43 azalttığı, 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda ise indirekt bilirubinin neden olduğu hücre ölümünü arttırdığı saptanmıştır (84).

Zhang ve ark.'nın (88) taurinin bilirubinin indüklediği nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisini araştırdığı bir çalışmada, primer nöron hücre kültürlerini 0.4 mM, 1.6 mM, 6.4 mM konsantrasyonlarında taurin ile dört ve sekiz saat süreyle inkübe ettikten sonra sırasıyla 5  $\mu\text{mol/L}$ , 12.5  $\mu\text{mol/L}$ , 25  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$  ve 100  $\mu\text{mol/L}$  konsantrasyonlarında indirekt bilirubin ekleyerek, 12 ve 24 saat süreyle inkübe etmiştir. Hücre canlılığı değerlendirildiğinde 12.5  $\mu\text{mol/L}$  indirekt bilirubin ile 12 saatlik inkübasyon sonunda hücre canlılığında %30 azalma saptamış, taurinin uygulanan tüm dozlarında ise hücre canlılığını istatistiksek olarak anlamlı derecede arttırdığı ve bilirubinin oluşturduğu nörotoksisitede koruyucu etkisi tespit edilmiştir.

Ciddi hiperbilirubinemide toksik etkiler ortaya çıkmadan kullanılacak nöroprotektif bir ajan bulma çalışmaları devam etmektedir. Bu amaçla anti inflamatuvar ve anti apoptotik özellikleri bulunan tetrasiklin türevi bir antibiyotik olan

minosiklin çalışmasında, albumine bağlanmada bilirubin ile yarışan ve plazma bilirubin düzeyini arttıran sulfadimetoksin (uzun etkili sulfonamid) verilerek bilirubin nörotoksitesisi oluşturulmuş sarılıklı Gunn ratlarda, akut beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyelinin (BAEP) ölçümüyle minosiklinin koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Sulfadimetoksin verilmesinden 15 dk önce intraperitoneal olarak uygulanan 50 mg/kg minosiklinin akut bilirubin nörotoksitesisinin bulgularından olan santral işitsel sinir sistemi disfonksiyonuna karşı koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir (89).

İndirekt bilirubinin meydana getirdiği nörotoksitesinin önlenmesine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte araştırmalarımızda, literatürde indirekt bilirubin nörotoksitesinde DHA'nın koruyucu etkisini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda DHA'nın uyguladığımız tüm konsantrasyonlarında ve 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda astrosit hücrelerinde proliferatif etki oluşturduğu ve hücre canlılığını arttırdığı, kontrol grubuna göre ortama 5 µM DHA eklendiğinde astrosit hücrelerindeki artışın en belirgin oranda olduğu görüldü. Ortamda 5 µM DHA bulunmasının indirekt bilirubin TC<sub>50</sub> konsantrasyonunda ortama eklendiğinde meydana gelmesi beklenen nörotoksitesiyi engellediği, aynı zamanda astrositlerdeki proliferasyonu kontrol ve bilirubin gruplarına göre belirgin arttırdığı saptandı. Literatürde ilk olan bu çalışma ile ortamda 5 µM konsantrasyonunda DHA bulunması indirekt bilirubinin astrosit hücrelerinde oluşturduğu nörotoksitesiyi engellediğini gösterdik.

İndirekt bilirubine bağlı hücre ölümünün nekroz ya da apoptozis olmak üzere iki şekilde gerçekleştiği bilinmektedir (1, 2). İndirekt bilirubinin oluşturduğu apoptozis birçok çalışma ile gösterilmiştir (7, 28, 30, 72). Falcao ve ark. (7) yaptıkları çalışmada immatür nöronlara indirekt bilirubin uygulamış ve indirekt bilirubinin apoptotik hücre ölümü üzerine kısa ve uzun dönem etkilerini incelemiştir. İmmatür nöronlar 17-18 günlük gebe Wistar ratların fetuslarından elde edilmiş, in vitro üçüncü gün 50 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında indirekt bilirubin ile 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İndirekt bilirubin içeren kültür ortamı 24 saatin sonunda uzaklaştırılmış, bir grup hücre kültürü kısa dönem apoptotik etkiler için hemen, diğer grup hücre kültürleri ise uzun dönem apoptotik etkiler için 8. ve 18. günlerde TUNEL yöntemi ile incelenmiştir. Nöronlarda zamana bağlı apoptotik

hücre ölümü geliştiği ve immatür nöronlarda daha yüksek oranda apoptozis meydana geldiği saptanmıştır. Üçüncü gün 24 saat süreyle 50 µM konsantrasyonunda indirekt bilirubin ile inkübe edilen immatür nöronlarda apoptotik hücre ölümü 1.5 kat fazla iken, indirekt bilirubin ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra bile apoptotik hücre ölümünün artarak devam ettiği (8. günde 2.2 kat, 18. günde 2.4 kat) görülmüş, 100 µM konsantrasyonda apoptozis en yüksek oranda saptanmıştır.

Grojean ve ark. (28) 14 günlük rat embriyo beyinlerinden hazırladıkları nöral hücre kültürlerine dört gün süreyle indirekt bilirubin uygulmuş, 0.5 µM konsantrasyonda total nöron sayısının %15'inde apoptotik hücreler gösterilmiştir. Rodrigues ve ark. (30) 17-18 günlük Wistar rat embriyolarından elde ettikleri primer kortikal nöron hücre kültürlerinde 86 µmol/L konsantrasyonda indirekt bilirubin ile dört saatlik inkübasyon sonucunda %25 apoptozis saptanmıştır.

Kumral ve ark. (72) 37 haftanın üzerinde doğan ve doğum ağırlığı 2500 gramın üzerinde olan indirekt hiperbilirubinemili yenidoğanlardan elde ettikleri serumu bir iki günlük yenidoğan BALB/C farelerden hazırladıkları astrosit hücre kültürlerinde kullanarak indirekt bilirubinin apoptotik etkisini araştırmış, %1-%20 arasında değişen konsantrasyonlarda 24, 48, 72 saat süreyle astrosit hücre kültürlerini inkübe etmiş, astrositlerdeki apoptotik hücre ölümünün doza ve zamana bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Çalışmamızda 10 µM konsantrasyonunda indirekt bilirubin astrosit hücrelerine 72 saat süreyle uygulandığında %25 oranında apoptozis geliştirdiğini gösterdik. Bu sonucu indirekt bilirubinin apoptotik etkisinin gösterildiği çalışmalarla uyumlu olduğu, farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde indirekt bilirubin ile oluşan apoptozisin değişik hücre türlerinde farklı oranlarda gerçekleşebileceği şeklinde değerlendirdik.

Apoptotik hücre ölümünü önlemede DHA'nın etkisini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur (16, 90-94). Retina fotoreseptörleri üzerine yapılan iki çalışmada bir iki günlük yenidoğan Wistar-albino ratlardan hazırlanmış fotoreseptör nöron hücre kültürleri kullanılmış, 6.7 µM konsantrasyonda DHA in vitro birinci gün kültür ortamına eklenmiştir. Normalde kültür ortamında fotoreseptörler üçüncü, dördüncü günde gelişip, takibinde apoptotik yola girmekte ve altıncı gün civarında apoptozis görülmekteyken DHA'nın fotoreseptörlerdeki apoptozisi belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (16, 90). Rotstein ve ark. (91) retinal fotoreseptör hücre kültürlerinde

yaptıkları çalışmada, dördüncü günde %20 fotoreseptörün apoptoza uğradığını ortama DHA eklenmesi ile bu oranın yarı yarıya azaldığını, 24 µM paraquat ile 24 saat süreyle oksidatif stres oluşturulduğunda fotoreseptörlerin %65'den fazlasında apoptoz gelişirken, ortamda DHA bulunduğunda bu oranın %40'ın altında kaldığını rapor edilmiştir.

İnsan nöroblastom hücre kültürleri kullanılarak yapılan bir çalışmada amiloid beta peptide bağlı gelişen apoptotik hücre ölümünü DHA'nın belirgin olarak azalttığı TUNEL yöntemi kullanılarak gösterilmiştir (92). Hipokampusta ve prefrontal kortekste serebral iskemi ve reperfüzyona bağlı gelişen hasarda DHA'yı da içeren omega-3 yağ asitlerinin nöroprotektif etkili olduğu ve ortamda bulunduğunda apoptotik hücre ölümünü belirgin olarak azalttığı hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir (93, 94).

Araştırmalarımızda literatürde indirekt bilirubinin oluşturduğu apoptotik hücre ölümünde DHA'nın koruyucu etkisini değerlendiren bir çalışmaya rastlamadık. Literatürde ilk olan çalışmamızda DHA'nın astrosit hücre kültüründe apoptozis oluşturmadığı, astrosit hücre kültür ortamında 5 µM konsantrasyonunda DHA bulunduğunda indirekt bilirubinin TC<sub>50</sub> konsantrasyonunda astrosit hücrelerinde meydana getirmesini beklediğimiz apoptotik hücre ölümünü %50'den fazla oranda azalttığını saptadık. Bu sonuç ile bilirubinin oluşturduğu apoptozisin DHA'nın koruyucu etkisi ile önlenebileceğini gösterdik.

Serbest oksijen radikalleri birçok biyolojik düzenlemenin parçasıdır. Mokeküler oksijen tüm aerobik organizmalarda bulunur ve bir elektron kazanarak serbest oksijen radikallerine dönüşür. Bu durum birçok hastalığın gelişiminde önemli bir yer tutar. Metabolizma kendini serbest oksijen radikallerinin toksik etkisine karşı enzimatik mekanizmalar (SOD, CAT, GPx gibi) ve non enzimatik mekanizmalar (antioksidan vitaminler) ile savunur. Bilirubin serbest oksijen radikallerinin güçlü bir uyaranıdır ve yüksek düzeylerde oksidatif strese yol açar (43).

Brito ve ark.'nın (4) çalışmasında indirekt bilirubinin sinaptosomal membranlarda serbest oksijen radikallerini arttırarak oksidatif strese, protein oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna yol açarak nöronal hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir. Nöron ve astrosit hücre kültürlerinde yapılan çalışmada da indirekt bilirubinin serbest oksijen radikallerini konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı

gösterilmiştir (8). Dani ve ark'nın (42) preterm infantlarda yaptıkları çalışmada, plazma indirekt bilirubin seviyelerindeki azalmanın plazma antioksidan kapasitesinde artışa ve oksidatif strese azalmaya yol açtığı bildirilmiştir.

Preterm infantlarda indirekt hiperbilirubineminin oluşturduğu oksidan etkiyi ve antioksidan enzim düzeylerini göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada total bilirubin düzeyi 15 mg/dl'nin üzerinde olan 20 preterm infant ve total bilirubin düzeyi 4-6 mg/dl arasında olan 15 sağlıklı preterm infant değerlendirilmiştir. Eritrositlerdeki ortalama antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT ve GPx) indirekt hiperbilirubinemili preterm infantlarda belirgin olarak düşük saptanmıştır (44).

Bracci ve ark.'nın (45) 152 yenidoğan üzerinde yaptıkları çalışmada, bilirubin düzeyi < 214 µmol/L olan infantlarla, bilirubin düzeyi > 214 µmol/L olan infantların SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri karşılaştırılmış, üç enzimin aktivitesinin de bilirubin düzeyi yüksek olanlarda hem doğumda hem de postnatal dördüncü günde belirgin düşük olduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada bilirubin düzeyi < 128 µmol/L olan infantlarla bilirubin düzeyi > 128 µmol/L olan infantlar karşılaştırıldığında GPx düzeyinin postnatal dördüncü günde ve SOD düzeyinin hem doğumda hem de dördüncü günde belirgin düşük olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda indirekt bilirubin astrosit hücrelerinde oluşturduğu oksidatif stres değerlendirildiğinde TC<sub>50</sub> konsantrasyonunda (10 µM) indirekt bilirubin astrosit hücre kültüründe 72 saat süreyle inkübe edildiğinde SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda belirgin şekilde azalttığını tespit ettik. Bu sonuç literatürde belirtildiği gibi indirekt bilirubin oksidatif hasar oluşturduğu ve anti oksidan enzim aktivitelerini azalttığı görüşünü desteklemektedir.

DHA'nın oksidatif strese karşı nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (15, 91). Beyinde antioksidan enzim aktivitesini artırarak aktif oksijen radikallerine karşı antioksidan savunmasını indüklemeye önemli bir rolü olduğu ileri sürülmektedir (17). Aynı zamanda DHA'nın serebellar astrosit hücre kültürlerinde serbest oksijen radikallerinin etkilerini önlediği de gösterilmiştir (73).

Kolesterolü yüksek diyetle beslenen Wistar grubu ratların diyetine 12 hafta süre ile DHA eklenerek yapılan çalışmada, DHA almayan grup ile karşılaştırıldığında DHA alan grupta CAT ve GPx enzim aktivitelerinin sırasıyla %23 ve % 26.3 oranında arttığı ve böylece antioksidan olduğu rapor edilmiştir (17).

Çalışmamızda ortamda 5 µM DHA bulunduğunda astrosit hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda CAT aktivitesini 4.8 kat, GPx aktivitesini ise 1.7 kat arttırdığı böylece DHA'nın antioksidan etkisinin olduğu gösterildi. Omega-3 yağ asidi kullanılan hipoksik iskemik bir havyan modeli çalışmasında diyetle omega-3 eklendiğinde hipokampus incelemesinde SOD aktivitesinin belirgin şekilde arttığı, CAT aktivitesinin ise azaldığı bildirilmiştir (94). Benzer başka bir çalışmada ise DHA içeren omega-3 yağ asitleri eklenmiş diyet ile beslenen ratlarda hipoksik iskemi modeli oluşturulmuş ve prefrontal kortekste SOD ve CAT aktivitesi değerlendirilmiştir. SOD aktivitesinin belirgin olarak azaldığı, CAT aktivitesinin ise belirgin olarak arttığı rapor edilmiştir (95). Literatürde bu konuyla ilgili çelişkili veriler bildirilmektedir. Çalışmamızda ise astrosit hücre kültürüne DHA eklediğimizde hem SOD hem de CAT enzim aktivitesinin belirgin olarak arttığını saptadık.

Kwan ve ark'nın (95) beyin infarktüsünde diyetsel omega-3 yağ asitlerinin nöroprotektif etkisini ve antioksidan enzimler üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmada, omega-3 eklenen grupta iskemi öncesinde GPx, CAT ve SOD enzim aktivitelerinin arttığı, iskemi sonrasında reperfüzyon aşamasında CAT aktivitesinin yüksekliği 48. saate kadar devam ederken, GPx ve SOD enzim aktivitelerinin yalnızca iki saat süreyle yüksek kaldığı saptanmıştır. Omega-3 eklenmeyen grupta ise iskemi sonrasında antioksidan enzim aktivitelerinin düştüğü gösterilmiştir.

Liu ve ark.'nın (96) çalışmasında, doymamış yağ asitlerinin fare lösemi hücrelerine (P388) ve doksorubisin dirençli alt tipine (P388/DOX) etkileri araştırılmış, doymamış yağ asitleri ile tedavinin bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini etkilediği gösterilmiştir. Her iki hücre tipine de 50 µM DHA 48 saat süre ile uygulandığında SOD aktivitesinin belirgin arttığı, CAT aktivitesinin sadece P388 hücre serisinde arttığı, GPx aktivitesinin ise her iki hücre serisinde de değişmediği rapor edilmiştir. Çalışmamızda her üç enzim aktivitesinin de ortamda 5 µM DHA bulunan astrosit hücre kültüründe 72. saatte belirgin arttığını gösterdik. Bu sonucu DHA'nın farklı hücrelerde antioksidan aktivite üzerine değişik etkileri olduğu şeklinde değerlendirdik.

Vanderbroucke ve ark. (97) düşük doz DHA ile yüksek doz DHA'nın oksidan ve antioksidan etkilerini endotel kaynaklı hücrelerde araştırmış, sıgır retinal endotel

hücrelerinde (*Bovine Retinal Endotelial Cells*-BREC) ve sığır aort endotel hücrelerinde (*Bovine Aortic Endotelial Cells*-BAEC) primer hücre kültürleri kullanılarak sitozolik GPx (cGPx) aktivitesi değerlendirilmiştir. DHA 10 µM ve 100 µM konsantrasyonlarda kültür ortamına eklendikten sonra 10 gün süreyle inkübe edilmiş, 10 µM konsantrasyonda DHA uygulanan BREC hücre kültürlerinde cGPx aktivitesinde kontrol hücrelerine göre %13 azalma saptanmış, 100 µM DHA uygulanan BREC hücrelerinde ise cGPx aktivitesinin değişmediği veya kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir artış olduğu rapor edilmiştir. BAEC hücrelerinde ise 10 µM DHA cGPx aktivitesini değiştirmezken 100 µM DHA uygulandığında cGPx aktivitesinin %50 arttığı gösterilmiştir. DHA'nın cGPx aktivitesi üzerine etkisinin uygulanan DHA konsantrasyonuna ve/veya hücre tipine bağlı olarak değişebileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Leonardi ve ark. (98) omega-3 yağ asitlerinin nörolojik hastalıklardaki tedavi edici ve koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında, glial hücrelerde DHA'nın kısa ve uzun dönem etkilerini incelemiş, 25 µM, 50 µM ve 75 µM konsantrasyonlarda DHA'yı 24, 48 ve 72 saat süreyle glial hücrelere uygulamışlardır. DHA'nın glial hücrelerde herhangi bir toksik etkisi olmadığı gibi, düşük doz DHA'nın GPx ve CAT aktivitesini arttırarak ve lipid peroksidasyonu azaltarak hücrel antioksidan sistemi güçlendirdiği rapor edilmiştir. Bu etkinin 24 saat süresince yüksek seyrettiği ve 48 saat sonunda kaybolduğu bildirilmiş, hücrelerdeki DHA etkisinin zaman ve doza bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir. Biz de çalışmamızda Leonardi ve ark.'nın (98) çalışmasına benzer şekilde, düşük konsantrasyonda (5 µM) DHA'nın toksik etki oluşturmadığını, GPx ve CAT aktivitesini arttırdığını, ancak belirtilen çalışmadan farklı olarak bu etkinin 72. saat süreyle devam ettiğini gösterdik.

Çalışmamızda astrosit hücre kültüründe DHA'nın SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, 5 µM DHA'nın kontrol grubuna göre her üç enzim aktivitesini de belirgin olarak arttırdığını saptadık. 5 µM DHA'nın bulunduğu ortama 10 µM konsantrasyonunda indirekt bilirubin eklendiğinde dahi astrosit hücre kültürlerinde SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerindeki azalmanın görülmediği; SOD, CAT ve GPx aktivitelerindeki artışın devam ettiği tespit edildi. Bu sonuçlar indirekt bilirubinin oluşturduğu oksidatif strese karşı DHA'nın koruyucu



etkisini göstermektedir. Böylece indirekt bilirubinun neden olduğu antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmanın DHA tarafından önlendiği bu çalışma ile gösterildi.

İndirekt bilirubinun neden olduğu nörotoksisite oksidatif stres, eksitotoksisite, inflamasyon, nöron gelişiminin bozulması, iyon dengesinin bozulması, membran ve hücre iskelet bütünlüğünün bozulması sonucuyla oluşmaktadır (4-9). Nörotoksisite nedenlerinin başında gelen oksidatif strese ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hücre bütünlüğünün bozulmasına, sinir hücrelerinin disfonksiyonuna, nekroz veya apoptozis yoluyla hücre ölümüne neden olmaktadır (4). Çalışmamızda indirekt bilirubinun astrosit hücrelerine toksik etkisinin olduğu, apoptozis oluşturduğu, antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GPx aktivitelerini azalttığı tespit edildi. DHA membran fonksiyonlarının düzenlenmesinde, iyon geçişinde, membran ilişkili proteinlerin aktivitesinin düzenlenmesinde, membran elastisitesinin oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır (10). Aynı zamanda fototransdüksiyon ve nöronal fonksiyonlarda önemlidir. Retinada ışığa yanıtı düzenlemekte, görme keskinliğinde ve karanlığa adaptasyonda rol oynamaktadır (11,12). DHA'nın eksikliği nörolojik gelişimi olumsuz etkileyerek normal gelişimi geciktirmekte veya inhibe etmektedir (12). Ayrıca lenfosit çoğalmasını, proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu ve NK hücrelerin aktivitesini azaltarak immün cevabı da etkilemektedir (14). DHA oksidatif streste nöroprotektif etki göstermekte ve apoptozisi önlemektedir (15,16). DHA, antioksidan enzimlerin serebral aktivitesini arttırarak antioksidan savunma mekanizmasını da indüklemektedir (17). Literatürde ilk olan bu çalışmamız ile DHA'nın nörotoksik etkisinin olmadığı, astrosit hücrelerindeki canlılığı indüklediği, indirekt bilirubinun oluşturduğu apoptozisi azalttığı, antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GPx aktivitelerini arttırdığı saptandı.

Sonuç olarak, bu çalışma ile DHA'nın indirekt bilirubinun oluşturduğu nörotoksisiteyi ve apoptozisi önlediği, antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GPx aktivitelerini arttırdığı ve böylece astrosit hücrelerine karşı nöroprotektif etkili olduğu gösterildi.



## SONUÇLAR

1. İndirekt bilirubin astrosit hücre kültüründe 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda %90 hücre ölümüne yol açtığı, indirekt bilirubin konsantrasyonu azaldıkça astrosit hücre ölüm oranının azaldığı saptandı.
2. İndirekt bilirubin astrosit hücrelerinde 4  $\mu\text{M}$  ve altındaki konsantrasyonlarda toksik etki oluşturmadığı, hücre canlılığını arttırdığı, konsantrasyon azaldıkça hücre canlılığının daha fazla oranda arttığı tespit edildi.
3. İndirekt bilirubin için astrosit hücre kültüründe  $\text{TC}_{50}$  konsantrasyonu 10  $\mu\text{M}$  olarak saptandı.
4. DHA'nın uygulanan 0.1-100  $\mu\text{M}$  aralığındaki konsantrasyonlarında astrosit hücre kültüründe toksik etkisi tespit edilmedi.
5. DHA'nın 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda hücre canlılığını en fazla oranda arttırdığı (%146 $\pm$ 8) tespit edildi.
6. Astrosit hücre kültüründe DHA 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda ortamda bulunduğu  $\text{TC}_{50}$  konsantrasyonunda indirekt bilirubin oluşturduğu sitotoksiteyi engellediği saptandı ( $p < 0.001$ ).
7. Astrosit hücre kültüründe DHA 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda ortamda bulunduğu apoptozis oluşturmadığı,  $\text{TC}_{50}$  konsantrasyonunda indirekt bilirubin %25 apoptozis oluşturduğu, ortamda DHA bulunduğu indirekt bilirubin oluşturduğu apoptozisi %57 oranında azalttığı saptandı ( $p < 0.001$ ).
8. Antioksidan enzim aktiviteleri açısından gruplar değerlendirildiğinde:
  - a. SOD aktivitesinin bilirubin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı ( $p < 0.05$ ), DHA grubunda kontrol grubuna göre 1.75 kat arttığı ( $p < 0.01$ ), DHA+bilirubin grubunda bilirubin grubuna göre belirgin olarak arttığı ( $p < 0.01$ ) tespit edildi.
  - b. CAT aktivitesinin bilirubin grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı ( $p < 0.05$ ), DHA grubunda kontrol grubuna göre 4.8 kat arttığı ( $p < 0.001$ ), DHA+bilirubin grubunda bilirubin grubuna göre belirgin olarak yükseldiği ( $p < 0.001$ ) saptandı.

- c. GPx aktivitesinin bilirubin grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı ( $p<0.001$ ), DHA grubunda kontrol grubuna göre 1.7 kat arttığı ( $p<0.001$ ), DHA+bilirubin grubunda bilirubin grubuna göre belirgin olarak arttığı ( $p=0.001$ ) saptandı.
9. Astrosit hücre kültüründe ortamda DHA bulunduğunda indirekt bilirubin oluşturduğu nörotoksitesiyi ve apoptozisi önleyerek, antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak bilirubin toksisitesine karşı koruyucu olduğu görüldü.

## KAYNAKLAR

1. Wong R, DeSandre G, Sibley E, Stevenson D. Neonatal jaundice and liver disease. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh M, eds. Fanaroff and Martin's neonatal-perinatal medicine diseases of the fetus and infant. 8th Ed. Philadelphia: Mosby Elsevier 2006:1419-65.
2. Maisels MJ. Jaundice. In: MacDonald MG, Seshia MK, Mullet MD, eds. Avery's neonatology. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2005:769-844.
3. Alpay F, Sarılık. Yurdakök M, Erdem G. ed. Neonatoloji. Ankara: Türk Neonatoloji Derneği 2004:559-78.
4. Brito MA, Brites D, Butterfield DA. A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes. Brain Res 2004;1026:33-43.
5. McDonald JW, Shapiro SM, Silverstein FS, Johnston MV. Role of glutamate receptor-mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the Gunn rat model. Exp Neurol 1998;150:21-9.
6. Fernandes A, Falcao AS, Silva RF, Gordo AC, Gama MJ, Brito MA, et al. Inflammatory signalling pathways involved in astroglial activation by unconjugated bilirubin. J Neurochem 2006;96:1667-79.
7. Falcao AS, Silva RF, Pancadas S, Fernandes A, Brito MA, Brites D. Apoptosis and impairment of neurite network by short exposure of immature rat cortical neurons to unconjugated bilirubin increase with cell differentiation and are additionally enhanced by an inflammatory stimulus. J Neurosci Res 2007;85:1229-39.

8. Brito MA, Rosa AI, Falcao AS, Fernandes A, Silva RF, Butterfield DA, et al. Unconjugated bilirubin differentially affects the redox status of neuronal and astroglial cells. *Neurobiol Dis* 2008;29:30-40.
9. Ostrow JD, Pascolo L, Brites D, Tiribelli C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends Mol Med* 2004;10(2):65-70.
10. Gorjao R, Azevedo-Martins AK, Rodrigues HG, Abdulkader F, Arcisio-Miranda M, Procopio J, et al. Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacol Ther* 2009;122:56-64.
11. Koo WW. Efficacy and safety of docosahexaenoic acid and arachidonic acid addition to infant formulas: can one buy better vision and intelligence? *J Am Coll Nutr* 2003;22(2):101-7.
12. Lim SY, Hoshiba J, Moriguchi T, Salem N Jr. N-3 fatty acid deficiency induced by a modified artificial rearing method leads to poorer performance in spatial learning tasks. *Pediatr Res* 2005;58:741-8.
13. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000;71: 343-8.
14. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 2002;56(3):14-9.
15. Shimazawa M, Nakajima Y, Mashima Y, Hara H. Docosahexaenoic acid (DHA) has neuroprotective effects against oxidative stress in retinal ganglion cells. *Brain Res* 2009;1251: 269-75.
16. German OL, Insua MF, Gentili C, Rotstein NP, Politi LE. Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *J Neurochem* 2006;98:1507-20.

17. Hossain MS, Hashimoto M, Gamoh S, Masumura S. Antioxidative effects of docosahexaenoic acid in the cerebrum versus cerebellum and brainstem of aged hypercholesterolemic rats. *J Neurochem* 1999;72:1133-8.
18. Berman DR, Mozurkewich E, Liu Y, Barks J. Docosahexaenoic acid pretreatment confers neuroprotection in a rat model of perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:305.e1-6.
19. Stoll BJ, Piazza AJ. Digestive system disorders. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, eds. *Nelson textbook of pediatrics*. 18th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier 2007:756-66.
20. Can G, Çoban A, İnce Z. Yenidoğanda sarılık. Neyzi O, Ertuğrul T, ed. *Pediyatri*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2010:467-90.
21. Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol* 2003;29:410-21.
22. Wennberg RP, Ahlfors CE, Bhutani VK, Johnson LH, Shapiro SM. Toward understanding kernicterus: a challenge to improve the management of jaundiced newborns. *Pediatrics* 2006;117:474-85.
23. Cashore WJ. The neurotoxicity of bilirubin. *Clin Perinatol* 1990;17(2):437-47.
24. Brodersen R, Stern L. Deposition of bilirubin acid in the central nervous system-a hypothesis for the development of kernicterus. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:12-9.
25. Levine RL, Fredericks WR, Rapaport SI. Entry of bilirubin into the brain due to opening of the blood-brain barrier. *Pediatrics* 1982;69(3):255-9.
26. Bratlid D. How bilirubin gets into the brain. *Clin Perinatol* 1990;17(2): 449-65.

27. Roseth S, Hansen TW, Fonnum F, Walaas SI. Bilirubin inhibits transport of neurotransmitters in synaptic vesicles. *Pediatr Res* 1998;44(3):312-6.
28. Grojean S, Koziel V, Vert P, Daval JL. Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons. *Exp Neurol* 2000;166:334-41
29. Deganuto M, Cesaratto L, Bellarosa C, Calligaris R, Vilotti S, Renzone G, et al. A proteomic approach to the bilirubin-induced toxicity in neuronal cells reveals a protective function of DJ-1 protein. *Proteomics* 2010;10:1645-57.
30. Rodrigues CM, Sola S, Brites D. Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons. *Hepatology* 2002;35:1186-95.
31. Rodrigues CM, Sola S, Brito MA, Brites D, Moura JJ. Bilirubin directly disrupts membrane lipid polarity and fluidity, protein order, and redox status in rat mitochondria. *J Hepatol* 2002;36:335-41.
32. Rodrigues CM, Sola S, Castro RE, Laires PA, Brites D, Moura JJ. Perturbation of membrane dynamics in nerve cells as an early event during bilirubin-induced apoptosis. *J Lipid Res* 2002;43:885-94.
33. Vaz AR, Delgado-Esteban M, Brito MA, Bolanos JP, Brites D, Almeida A. Bilirubin selectively inhibits cytochrome c oxidase activity and induces apoptosis in immature cortical neurons: assessment of the protective effects of glycoconjugate deoxycholic acid. *J Neurochem* 2010;112:56-65.
34. Falcao AS, Fernandes A, Brito MA, Silva RF, Brites D. Bilirubin-induced immunostimulant effects and toxicity vary with neural cell type and maturation state. *Acta Neuropathol* 2006;112:95-105.

35. Fernandes A, Silva RF, Falcao AS, Brito MA, Brites D. Cytokine production, glutamate release and cell death in rat cultured astrocytes treated with unconjugated bilirubin and LPS. *J Neuroimmunol* 2004;153:64-75.
36. Falcao AS, Bellarosa C, Fernandes A, Brito MA, Silva RF, Tiribelli C, Brites D. Role of multidrug resistance-associated protein 1 expression in the in vitro susceptibility of rat nerve cell to unconjugated bilirubin. *Neuroscience* 2007;144: 878-88.
37. Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:5918-22.
38. Yamaguchi T, Horio F, Hashizume T, Tanaka M, Ikeda S, Kakinuma A, et al. Bilirubin is oxidized in rats treated with endotoxin and acts as a physiological antioxidant synergistically with ascorbic acid in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214(1):11-9.
39. Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rodgers PA, Stevenson DK. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med* 1995;19(4):395-404.
40. Gatton DD, Gold J, Axer-Siegel R, Wielunsky E, Naor N, Nissenkorn I. Evaluation of bilirubin as possible protective factor in the prevention of retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 1991;75:532-4.
41. Pauly TH, Smith M, Gillespie M. Bilirubin as an antioxidant: effect on group B streptococci-induced pulmonary hypertension in infant piglets. *Biol Neonate* 1991;60:320-6.
42. Dani C, Martelli E, Bertini G, Pezzati M, Filippi L, Rossetti M, et al. Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:119-23.

43. Yiğit S, Yurdakök M, Kilin K, Oran O, Erdem G, Tekinalp G. Serum malondialdehyde concentration in babies with hyperbilirubinaemia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;80:235-7.
44. Turgut M, Başaran O, Cekmen M, Karataş F, Kurt A, Aygün AD. Oxidant and antioxidant levels in preterm newborns with idiopathic hyperbilirubinaemia. *J Paediatr Child Health* 2004;40:633-7.
45. Bracci R, Buonocore G, Talluri B, Berni S. Neonatal hyperbilirubinemia. Evidence for a role of the erythrocyte enzyme activities involved in the detoxification of oxygen radicals. *Acta Paediatr Scand* 1988;77:349-56.
46. Grojean S, Lievre V, Koziel V, Vert P, Daval JL. Bilirubin exerts additional toxic effects in hypoxic cultured neurons from the developing rat brain by the recruitment of glutamate neurotoxicity. *Pediatr Res* 2001;49:507-13.
47. Rodrigues CM, Sola S, Silva RF, Brites D. Aging confers different sensitivity to the neurotoxic properties of unconjugated bilirubin. *Pediatr Res* 2002;51:112-8.
48. Hansen TW, Allen JW. Oxidation of bilirubin by brain mitochondrial membranes—dependence on cell type and postnatal age. *Biochem Mol Med* 1997;60:155-60.
49. Decleves X, Regina A, Laplanche JL, Roux F, Boval B, Launay JM, et al. Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 2000;60:594-601.
50. Rhine WD, Schmitter SP, Yu AC, Eng LF, Stevenson DK. Bilirubin toxicity and differentiation of cultured astrocytes. *J Perinatol* 1999;19(3):206-11.



51. Chen HC, Tsai DJ, Wang CH, Chen YC. An electron microscopic and radioautographic study on experimental kernicterus. I. Bilirubin transport via astroglia. *Am J Pathol* 1969;56:31-58.
52. Chen HC, Wang CH, Tsan KW, Chen YC. An electron microscopic and radioautographic study on experimental kernicterus. II. Bilirubin movement within neurons and release of waste products via astroglia. *Am J Pathol* 1971;64:45-66.
53. Kimelberg HK. Primary astrocyte cultures-a key to astrocyte function. *Cell Mol Neurobiol* 1983;3(1):1-16.
54. Hansen TW. Bilirubin brain toxicity. *J Perinatol* 2001;21:48-51.
55. Stevenson DK, Fanaroff AA, Maisels MJ, Young BW, Wong RJ, Vreman HJ, et al. Prediction of hyperbilirubinemia in near-term and term infants. *J Perinatol* 2001;21:63-72.
56. Rice AC, Shapiro SM. A new animal model of hemolytic hyperbilirubinemia-induced bilirubin encephalopathy (kernicterus). *Pediatr Res* 2008;64:265-9.
57. Cohen RS, Wong RJ, Stevenson DK. Understanding neonatal jaundice: a perspective on causation. *Pediatr Neonatol* 2010;51(3):143-8.
58. Ahlfors CE. Predicting bilirubin neurotoxicity in jaundiced newborns. *Curr Opin Pediatr* 2010;22: 129-33.
59. Mantzioris E, Cleland LG, Gibson RA, Neumann MA, Demasi M, James MJ. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000;72:42-8.
60. Neill AR, Masters CJ. Metabolism of fatty acids by ovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1973;34:279-87.

61. Okada M, Amamoto T, Tomonaga M, Kawachi A, Yazawa K, Mine K, et al. The chronic administration of docosahexaenoic acid reduces the spatial cognitive deficit following transient forebrain ischemia in rats. *Neuroscience* 1996;71:17-25.
62. Stillwell W, Shaikh SR, Zerouga M, Siddiqui R, Wassall SR. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:559-79.
63. Stillwell W. Docosahexaenoic acid: a most unusual fatty acid. *Chem Phys Lipids* 2008;153:1-2.
64. Kim HY. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. *J Biol Chem* 2007;282(26):18661-5.
65. Guesnet P, Alessandri JM. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie* 2011;93:7-12.
66. Horrocks LA, Farooqui AA. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:361-72.
67. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:383-99.
68. Corey EJ, Shih C, Cashman JR. Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3581-4.

69. Gamoh S, Hashimoto M, Sugioka K, Shahdat Hossain M, Hata N, Misawa Y, et al. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 1999;93:237-41.
70. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980;85:890-902.
71. Cole R, de Vellis J. A dissection and tissue culture manual of the nervous system. In: Shaha 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
72. 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.
73. Kaur P, Heggland I, Aschner M, Syversen T. Docosahexaenoic acid may act as a neuroprotector for methylmercury-induced neurotoxicity in primary neural cell cultures. *Neurotoxicology* 2008;29:978-87.
74. Gultekin F, Patat S, Akca H, Akdogan M, Altuntas I. Melatonin can suppress the cytotoxic effects of chlorpyrifos on human hepG2 cell lines. *Hum Exp Toxicol* 2006;25:47-55.
75. 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.
76. Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 2002;8:323-34.

77. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 1990;184:193-9.
78. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
79. Soorani-Lunsing I, Woltil HA, Hadders-Algra M. Are moderate degrees of hyperbilirubinemia in healthy term neonates really safe for the brain? *Pediatr Res* 2001;50:701-5.
80. Gürses D, Kiliç I, Sahiner T. Effects of hyperbilirubinemia on cerebrocortical electrical activity in newborns. *Pediatr Res* 2002;52:125-30.
81. Ostrow JD, Pascolo L, Shapiro SM, Tiribelli C. New concepts in bilirubin encephalopathy. *Eur J Clin Invest* 2003;33:988-97.
82. Ngai KC, Yeung CY, Leung CS. Difference in susceptibilities of different cell lines to bilirubin damage. *J Paediatr Child Health* 2000;36:51-5.
83. Silva RF, Rodrigues CM, Brites D. Bilirubin-induced apoptosis in cultured rat neural cells is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 2001;34:402-8.
84. Tastekin A, Gepdiremen A, Ors R, Buyukokuroglu ME, Halici Z. Protective effect of L-carnitine against bilirubin-induced neuronal cell death. *Brain Dev* 2006;28:436-9.
85. Berns M, Toennesen M, Koehne P, Altmann R, Obladen M. Ibuprofen augments bilirubin toxicity in rat cortical neuronal culture. *Pediatr Res* 2009;65:392-6.

86. Rotstein NP, Aveldano MI, Barrantes FJ, Politi LE. Docosahexaenoic acid is required for the survival of rat retinal photoreceptors in vitro. *J Neurochem* 1996;66:1851-9.
87. Rotstein NP, Politi LE, Aveldano MI. Docosahexaenoic acid promotes differentiation of developing photoreceptors in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2750-8.
88. Zhang B, Yang X, Gao X. Taurine protects against bilirubin-induced neurotoxicity in vitro. *Brain Res* 2010;1320:159-67.
89. Geiger AS, Rice AC, Shapiro SM. Minocycline blocks acute bilirubin-induced neurological dysfunction in jaundiced Gunn rats. *Neonatology* 2007;92:219-26.
90. Rotstein NP, Aveldano MI, Barrantes FJ, Roccamo AM, Politi LE. Apoptosis of retinal photoreceptors during development in vitro: protective effect of docosahexaenoic acid. *J Neurochem* 1997;69:504-13
91. Rotstein NP, Politi LE, German OL, Girotti R. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2252-9
92. Hashimoto M, Katakura M, Hossain S, Rahman A, Shimada T, Shido O. Docosahexaenoic acid withstands the A $\beta$ (25-35)-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem* 2011;22:22-9.
93. Bas O, Songur A, Sahin O, Mollaoglu H, Ozen OA, Yaman M, et al. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurochem Int* 2007;50:548-54.

94. Ozen OA, Cosar M, Sahin O, Fidan H, Eser O, Mollaoglu H, et al. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat prefrontal cortex. *Neurol Sci* 2008;29: 147-52
95. Choi-Kwon S, Park KA, Lee HJ, Park MS, Lee JH, Jeon SE, et al. Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. *Brain Res Dev Brain Res* 2004;152: 11-8.
96. Liu QY, Tan BK. Effects of cis-unsaturated fatty acids on doxorubicin sensitivity in P388/DOX resistant and P388 parental cell lines. *Life Sci* 2000;67:1207-18.
97. Delton-Vandenbroucke I, Véricel E, Januel C, Carreras M, Lecomte M, Lagarde M. Dual regulation of glutathione peroxidase by docosahexaenoic acid in endothelial cells depending on concentration and vascular bed origin. *Free Radic Biol Med* 2001;30:895-904.
98. Leonardi F, Attorri L, Benedetto RD, Biase AD, Sanchez M, Tregno FP, et al. Docosahexaenoic acid supplementation induces dose and time dependent oxidative changes in C6 glioma cells. *Free Radic Res* 2007;41:748-56.