

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

**CİDDİ HİPERBİLİRÜBİNEMİLİ YENİDOĞANLARDA
MİKRO RNA EKSPRESYON PROFİLLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. AYKUT DEMİR**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HACER ERGİN**

DENİZLİ-2021

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

**CİDDİ HİPERBİLİRÜBİNEMİLİ YENİDOĞANLARDA
MİKRORNA EKSPRESYON PROFİLLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. AYKUT DEMİR**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HACER ERGİN**

DENİZLİ-2021

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin **24.12.2019** tarih ve **2019TIPF022** nolu kararı ile desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	2
BİLİRÜBİN METABOLİZMASI	2
YENİDOĞANLARDA SARILIK VE CİDDİ HİPERBİLİRUBİNEMİ	3
Bilirubin Toksisitesi	4
Bilirubin İndüklediği Nörolojik Disfonksiyon (BİND):	5
Akut Bilirubin Ensefalopatisi (ABE):	5
Kernikterus:	7
Bilirubin Nörotoksisitesinin moleküler fizyolojisi ve patofizyolojisi:	7
CİDDİ HİPERBİLİRÜBİNEMİ VE NÖROİNFLAMASYON	8
Fizyolojik sarılık.....	8
Ciddi hiperbilirubinemi:	8
Ciddi hiperbilirubinemi ve nörotoksisite risk faktörleri:	9
UGT1A1 Enzimi ve Polimorfizmi:	10
Nöroinflamasyonda Glial Hücrelerin rolü:	11
Tedavi:.....	12
EPIGENETİK	13

MikroRNA'lar	14
MikroRNA Sentezi	15
MikroRNA'ların fonksiyonu:	16
miRNA ve Kanser:	16
miRNA ve Sepsis:	17
miRNA ve Otoimmün Hastalıklar:	17
miRNA ve Prematüre Retinopatisi:	18
miRNA ve Bronkopulmoner Displazi	18
miRNA ve Nekrotizan Enterokolit:	18
miRNA ve Hipoksik İskemik Ensefalopati:	19
miRNA ve Travmatik Beyin Hasarı (TBH):	19
miRNA ve İskemik İnme:	20
Ciddi Hiperbilirubinemi ve Nörotoksisite Gelişmesinde miRNA'lar:	20
GEREÇ VE YÖNTEM	21
miRNA seçimi:	23
miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Ölçümü	23
miRNA izolasyonu Protokolü:	23
cDNA elde edilmesi:	24
Real-Time PCR Reaksiyonu:	24
UGT1A1 promoter polimorfizmi:	24
Sekanslama Reaksiyonu Ürünleri Saflaştırılması:	26
İstatistiki Değerlendirme:	28
Etik kurul onayı ve maddi destek:	28
BULGULAR	29
TARTIŞMA	60
SONUÇLAR	88
KAYNAKÇA	94
Ek-1	110

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	: ATP bağlayıcı kaset
ABE	: Akut Bilirubin Ensefalopatisi
ABR	: Auditory Brainstem-Evoked Response
APA	: Amerikan Pediatri Akademisi
BİND	: Bilirubinün İndüklediği Nörolojik Disfonksiyon
BPD	: Bronkopulmoner Displazi
C/S	: Sezaryen
CO	: Karbonmonoksit
CRP	: C-reaktif protein
TcB	: Transkutan Bilirubin
DB	: Direkt Bilirubin
DC	: Direkt Coombs
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ETCO₂	: End-Tidal Karbon Monoksit Konsantrasyonu
FB	: Fenobarbital
FT	: Fototerapi
G6PD	: Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz
Hb	: Hemoglobin
HİE	: Hipoksik İskemik Ensefalopati
HO	: Hem Oksijenaz
Htk	: Hematokrit
İ/T oranı	: İmmatür Nötrofil / Total Nötrofil sayısına oranı
İB	: İndirekt Bilirubin
İKH	: İntrakranial Hemoraji
İVİG	: İntravenöz İmmunglobulin
İYE	: İdrar Yolu Enfeksiyonu
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
KBE	: Kronik Bilirubin Ensefalopatisi
KD	: Kan Değişimi
LPS	: Lipopolisakkarit
MCHC	: Ortalama Korpusküler Hemoglobin Konsantrasyonu
miRNA	: MikroRNA
mRNA	: MessengerRNA
MRP2	: Multidrug Resistance-associated Protein-2
NADPH	: Nikotinamid Dinükleotid Fosfat
NEK	: Nekrotizan Enterokolit
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NSVY	: Normal Spontan Vaginal Doğum
OATP	: Organik Anyon Taşıyıcı Proteinler
Ort	: Ortalama
P-gp	: P-Glikoprotein
PK	: Pirüvat Kinaz
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RDS	: Respiratuar Distress Sendromu
RES	: Retikuloendotelial Sistem
Ret	: Retikülosit

RNA	: Ribonükleik Asit
ROP	: Prematüre Retinopatisi
SLCO1B1	: Solute carrier organic anion transporter 1B1
SSS	: Santral Sinir Sistemi
sTB/Alb	: Serum Total Bilirübini/Albumin oranı
sTB	: Serum Total Bilirübin
TA	: Timin-Adenin
TBH	: Travmatik Beyin Hasarı
TFT	: Tiroid Fonksiyon Testi
TLR	: Toll Like Reseptör
IL	: İnterlökin
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
UGT	: Üridildifosfat Glukronil Transferaz
UGT1A1	: Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase 1A1
3'-UTR	: 3' translate edilmemiş bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SayfaNo
Şekil 1. Bilirubin sentezi, taşınması ve metabolizması.....	3
Şekil 2. Postnatal yaş ve transkutan veya total serum bilirubin değerlerine göre bebeklerin risk durumu	9
Şekil 3. İnsan UGT1 gen kompleksinin şematik görünümü	11
Şekil 4. Mikroglia M1 ve M2 polarizasyonu, etkileri.....	12
Şekil 5. ≥ 35 hafta bebeklerde postnatal yaşa göre fototerapi sınırları	13
Şekil 6. Santral dogmanın moleküler biyolojisi.....	13
Şekil 7. MikroRNA Sentezi	16
Şekil 8. UGT1A1 Promoter Bölgeye Ait Gen Dizisi.....	27
Şekil 9. UGT1A1 genine ait Promoter bölgedeki genotiplerin DNA dizi analiz sistemindeki görünümü.....	27
Şekil 10. Serum Total Bilirubin düzeyi ile BİND skoru ilişkisi	34
Şekil 11. Serum TB/Alb oranı ile BİND skoru arası ilişki	34
Şekil 12. Kontrol, Sarılık ve Sarılık alt gruplarında işitme testi sonuçları	37
Şekil 13. BİND skoruna göre grupların işitme testi sonuçları	38
Şekil 14. Kontrol ve Sarılık gruplarının miRNA up-regülasyon değişimleri	45
Şekil 15. Kontrol ve Sarılık gruplarının miRNA down-regülasyon değişimleri	45
Şekil 16. Kontrol, Sarılık ve Sarılık altgrupları miRNA up-regülasyon değişimi	46
Şekil 17. Kontrol, Sarılık ve Sarılık altgrupları miRNA down-regülasyon değişimi	47
Şekil 18. Kontrol ve Sarılık gruplarında UGT1A1 ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri.....	49
Şekil 19. Kontrol ve Sarılık gruplarında nöroinflamasyonla ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri	49
Şekil 20. Kontrol ve Sarılık grubunda istatistiki olarak anlamlı miRNA'ların kat	

değişimleri.....	50
Şekil 21. Kontrol ve Sarılık altgruplarında UGT1A1 ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri.....	50
Şekil 22. Kontrol ve Sarılık alt gruplarında nöroinflamasyonla ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri.....	51
Şekil 23. ABE gelişmeyen ve gelişen olguların UGT1A1 ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri	52
Şekil 24. ABE gelişmeyen/gelişen olguların nöroinflamasyon ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri	53
Şekil 25. Kan değişimi yapılmayan/yapılan hastaların UGT1A1 ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerlerinin karşılaştırması.....	54
Şekil 26. Kan değişimi yapılan/yapılmayan hastaların nöroinflamasyonla ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri	54
Şekil 27. BİND skoruna göre grupların miRNA up-regülasyon değişimleri.....	56
Şekil 28. BİND skoruna göre grupların miRNA down-regülasyon değişimleri.....	57

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Yenidoğanlarda indirekt hiperbilirubinemi nedenleri.....	4
Tablo 2. Klinik BİND skoru.....	6
Tablo 3. Kontrol, Sarılık ve Sarılık alt gruplarının özellikleri.....	30
Tablo 4. Ciddi hiperbilirubinemili yenidoğanlarda etyoloji.....	31
Tablo 5. Ciddi hiperbilirubinemili yenidoğanlarda ikterojenik faktörlerin değerlendirilmesi.....	31
Tablo 6. Ciddi hiperbilirubinemili yenidoğanlarda laboratuvar bulguları.....	33
Tablo 7. Tedavi.....	33
Tablo 8. Ciddi hiperbilirubinemili hastaların BİND skoru açısından değerlendirilmesi.....	35
Tablo 9.1. Ciddi hiperbilirubinemili hastaların mental durum değerlendirilmesi.....	35
Tablo 9.2. Ciddi hiperbilirubinemili hastaların kas tonusu değerlendirilmesi.....	35
Tablo 9.3. Ciddi hiperbilirubinemili hastaların ağlama paterni değerlendirilmesi.....	36
Tablo 10. Sarılık Grubunda işitme testi sonuçları.....	36
Tablo 11. Sarılık Grubunda BİND skoruna göre işitme testi sonuçları.....	37
Tablo 12. Kan değişimi yapılan ve yapılmayan hastaların karşılaştırması.....	38
Tablo 13. Sarılık grubunda ABE gelişen ve gelişmeyen hastaların karşılaştırması ...	39
Tablo 14. Sarılık Grubu'nda işitme testinden geçen ve kalan hastaların karşılaştırması.....	40
Tablo 15. Ciddi hiperbilirubinemiyle ilişkili risk faktörleri: tekli lojistik regresyon analizi.....	41
Tablo 16. Kan değişimi ile ilişkili risk faktörleri: tekli lojistik regresyon analizi.....	42
Tablo 17. ABE gelişmesi ile ilişkili risk faktörleri; tekli lojistik regresyon analizi ..	42
Tablo 18. İşitme kaybı ile ilişkili risk faktörleri; tekli lojistik regresyon analizi.....	43

Tablo 19. Kontrol, Sarılık ve Sarılık alt gruplarının miRNA ekspresyonları	44
Tablo 20. Sarılık ve Kontrol gruplarının miRNA relatif kantitatif değerlerinin karşılaştırması	48
Tablo 21. ABE gelişmeyen ve gelişen olguların miRNA relatif kantitatif değerleri.	52
Tablo 22. Kan değişimi yapılmayan ve yapılan hastaların miRNA relatif kantitatif değerleri	53
Tablo 23. BİND skorlarına göre kontrol/sarılık gruplarının miRNA ekspresyon Değişimleri.....	55
Tablo 24. Ciddi hiperbilirubinemi ilişkili miRNA'ların lojistik regresyon analizi ..	58
Tablo 25. ABE gelişiminde etkili miRNA'ların lojistik regresyon analizi.....	58
Tablo 26. Kan değişimi gereksinimini etkileyen miRNA'ların lojistik regresyon analizi	59
Tablo 27. İşitme kaybı gelişmesinde etkili miRNA'ların lojistik regresyon analizi..	59

ÖZET

Ciddi Hiperbilirubinemi Yenidoğanlarda MikroRNA Ekspresyon Profilleri

Dr. Aykut Demir

Ciddi hiperbilirubinemi, bebeklerin %2'sinden azında görülmesine rağmen; bilirubinün indüklediği nörolojik disfonksiyon (BİND) ve kernikterus tüm dünyada önlenebilir halk sağlığı sorunu olmayı sürdürmektedir. MikroRNA'lar (miRNA), tek iplikçikli, 18-24 nükleotid uzunluğunda kodlanmayan RNA molekülleridir. Hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, metabolizma ve immün yanıt gibi biyolojik süreçlerde rol alan miRNA'lar, hedef genlerin 3'translate edilmemiş bölgesine (3'-UTR) bağlanıp; hedef mRNA'nın bozunmasını sağlayarak veya protein translasyonunu inhibe ederek gen ekspresyonunu baskırlar. Bu çalışmada ciddi hiperbilirubinemi ile UGT1A1 enzim ekspresyonu ve nöroinflamasyon ile ilişkili miRNA'lar arasındaki ilişki prospektif olarak araştırıldı.

Gebelik yaşı ≥ 35 hafta, sTB < 13 mg/dl olan sağlıklı bebekler kontrol (n:30), sTB ≥ 20 mg/dl olan bebekler sarılık grubunu (n:115) oluşturdu. Sarılık grubu, demografik, klinik, laboratuvar, tedavi verileri kaydedilerek, sTB düzeyine göre Grup1 (sTB ≥ 20 - ≤ 25 mg/dl), Grup2 (sTB > 25 - ≤ 30 mg/dl), Grup3 (sTB > 30 mg/dl), BİND skoruna göre normal (0 puan), hafif (1-3 puan), orta (4-6 puan), ağır (7-9 puan) akut bilirubin ensefalopatisi (ABE) olarak gruplandırıldı. Ticari kit kullanılarak, periferik kan örneklerinden miRNA izolasyonu yapıldı ve real-time PCR analiziyle, UGT1A1 enzim ekspresyonu (miR-21-3p, miR-491-3p, miR-141-3p) ve nöroinflamasyonla ilişkilendirilen (miR-Let7a, miR-124, miR-155, miR-146a, miR-210, miR-384, miR-376c-3p, miR-374a-5p, miR-93, miR-181c) miRNA'ların ekspresyon değişimleri ve relatif kantitatif değerleri incelendi.

Kontrol ve sarılık gruplarında gebelik yaşı ($38,1 \pm 1,1/37,9 \pm 1,5$ hf), doğum ağırlığı ($3139 \pm 338/3126 \pm 493$ gr), prematürelilik (%10/25,2), cinsiyet (erkek %63,3/44,3), kardeşte fototerapi öyküsü farksız ($p > 0,05$); sezaryen doğum kontrol grubunda (%76,6/44,3) ($p = 0,002$), akraba evliliği sarılık grubunda (%29,9/3,3) ($p = 0,01$) ve Grup3'te (Grup1/2/3: %22,3/21,9/56,2) yüksekti ($p = 0,017$). Ciddi hiperbilirubinemi etyolojisinde prematürite %25,2, ABO/Rh/subgrup uyumsuzluğu %37,4/7,8/14,7, immün hemolitik hastalık %20,9, ≥ 10 kilo kaybı %17,3, G6PD/pirüvat kinaz eksikliği %14,7, klinik/kesin sepsis %10,4, kültür (+) üriner infeksiyon %9,5, MCHC ≥ 36 %8,7, hipotiroidi %6,1, polisitemi %3,4, sefal hematom %1,7, Crigler Najjar tip2 %0,9, heterozigot/homozigot promoter polimorfizmi

%23,4/%7,4 sıklıkta saptandı; %0,9'unda neden bulunamadı.

Sarılık grubundaki bebeklerin %21,7'si işitme testinden kaldı; %23,4'üne kan değişimi yapıldı. Grup1/2/3'te sTB arttı (21,6±1,3/26,7±1,3/33,9±4,8) (p<0,001), sTB/Alb oranı (6,08±0,69/7,5±0,94/9,31±1,59) (p<0,001), retikülosit (2,1±2,6/3,3±2,4 3,3±3,8) (p<0,001), işitme testinden kalanlar (%14,9/28,1/37,5) (p=0,092) arttı. BİND skorlamasına göre normal/hafif/orta/ağır ABE sıklığı %34,8/40,9/14,8 /9,5 olup; BİND skoru ile sTB düzeyi (r:0,712) (p<0,001) ve sTB/Alb oranı (r:0,564) (p<0,001) pozitif korelasyon gösterdi. Sarılık şiddeti arttıkça ağır ABE sıklığı (Grup 1/2/3'te % 0/6,3/56,2) (p<0,001); ABE şiddeti arttıkça işitme testinden kalanların oranı arttı (p<0,001). Lojistik regresyon analizine göre ciddi hiperbilirubinemi riskini akraba evliliği 10,7 kat, ABO uyumsuzluğu 5,4 kat, normal doğum 4,1 kat, ABE riskini sTB/Alb≥6,8 olması 6,3 kat (p<0,001), D.Coombs pozitifliği 3 kat (p=0,049), ABO uyumsuzluğu 2,8 kat (p=0,018) arttırdı

Kontrol grubuna göre sarılık grubunda miR-491-3p (p=0,025), miR-210 (p=0,047), miR-21-3p (p<0,001) ve miR-93'ün (P<0,001) upregüle, miR-124'ün (p=0,019) downregüle olduğu, miR-491-3p (p=0,03), miR-21-3p (p<0,001), miR-93'ün (p<0,001) relatif kantitatif değerleri yüksek iken; miR-Let7a (p=0,020) ve miR-124'ün (p=0,038) relatif kantitatif değerleri düşük saptandı. ABE gelişenlerde miR-124 ekspresyonunun relatif kantitatif değerleri azalırken (p=0,007), miR-146a (p=0,002), miR-21-3p (p=0,001), miR-93'ün (p=0,001) relatif kantitatif değerleri artış gösterdi. ABE şiddetine göre miRNA ekspresyonları değerlendirildiğinde; miR-491-3p, (p=0,03), miR-21-3p (p<0,001) ve miR-93'ün (p<0,001) upregülasyonunun ağır ABE'lerde en çok arttığı; miR-146a (p=0,007) ve miR-181c (p=0,026) down-regülasyonunun en fazla azaldığı, miR-374a-5p (p=0,015) down-regülasyonunun en fazla olduğu görüldü. MiR-21-3p, miR-491-3p, miR-124, miR-210 ve miR-93 dahil diğer aday miRNA'ların, mimik ve antimimiklerinin farklı etnisiteden, çok sayıda olguda çalışılması, BİND ve kernikterusun önlenmesinde yeni ufuklar açacaktır.

Anahtar Kelimeler: Yenidoğan, ciddi hiperbilirubinemi, bilirubin nörotoksitesi, miRNA

SUMMARY

MicroRNA Expression Profiles in Newborns with Severe Hyperbilirubinaemia

Dr. Aykut Demir

Although severe hyperbilirubinaemia is seen in less than 2% of infants; bilirubin-induced neurological dysfunction (BIND) and kernicterus continue to be preventable public health problems around the world. MicroRNAs (miRNA) are single-stranded, 18-24 nucleotide long non-coding RNA molecules. MiRNAs, which play a role in biological processes such as cell growth, proliferation, differentiation, apoptosis, metabolism and immune response, bind to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of target genes, and they suppress gene expression by causing degradation of target mRNA or inhibiting protein translation. In this study, the relationship between severe hyperbilirubinaemia and of miRNA's expression associated with UGT1A1 enzyme and neuroinflammation were investigated prospectively.

The infants with gestational age ≥ 35 weeks constituted Control Group (sTB <13 mg/dl, n:30), and Jaundice Group (sTB ≥ 20 mg/dl, n:115). Jaundice group were classified as Group1 (sTB ≥ 20 -25 mg/dl), Group2 (sTB > 25 - ≤ 30 mg/dl), Group3 (sTB > 30 mg/dl) according to severity of jaundice, and mild (1-3 points), moderate (4-6 points), and severe (7-9 points) acute bilirubin encephalopathy (ABE) according to the BIND score. Using a commercial kit, miRNA isolation was performed from peripheral blood samples and the expression changes and relative quantitative values of miRNAs associated with UGT1A1 enzyme expression (miR-21-3p, miR-491-3p, miR-141-3p) and neuroinflammation (miR-Let7a, miR-124, miR-155, miR-146a, miR-210, miR-384, miR-376c-3p, miR-374a-5p, miR-93, miR-181c) were investigated by real-time PCR analysis.

While gestational age ($38.1 \pm 1.1 / 37.9 \pm 1.5$ w), birth weight ($3139 \pm 338 / 3126 \pm 493$ gr), prematurity (10/25.2%), male gender (63.3/44.3%), sibling phototherapy history was not different ($p > 0.05$) between control and jaundice groups, cesarean birth in control group (76/44.3%) ($p = 0.002$), consanguineous in jaundice group (29.9/3.3%) ($p = 0.01$) and Group3 (Group1/2/3:22.3/21.9/56.2%) were higher ($p = 0.017$). The etiology of severe hyperbilirubinemia were determined as prematurity (25.2%), ABO/Rh/subgroup incompatibility (37.4%/7.8%/14.7%), immune hemolytic disease (20.9%), $\geq 10\%$ weight loss (17.3%), G6PD/pyruvate kinase deficiency (14.7%), clinical/proven sepsis (10.4%), urinary infection (9.5%), MCHC ≥ 36 (8.7%), hypothyroidism (6.1%), polycythemia (3.4%), cephalic

hematoma (1.7%), Crigler Najjar type 2 (0.9%), hetero-/homo-zygous promoter polymorphism (23.4/ %7.4%), and idiopathic (0.9%).

In the jaundice group, 21,7% infants failed the hearing test, and 23.4% of them were exposed to exchange transfusion. As sTB increases in Group 1/2/3 (21.6±1.3/ 26.7±1.3/ 33.9±4.8) ($p<0.001$), sTB/Alb ratio (6.08±0.69/7.5±0.94 /9.31±1.59) ($p<0.001$), reticulocyte counts (2.1±2.6/3.3±2.4/3.3±3.8)($p<0.001$) and those who failed the hearing test (%14.9/28.1/37.5)($p=0.092$) increased. According to the BIND scoring, the frequency of normal/mild/moderate/severe ABE were 34.8/40.9/14.8/9.5%. BIND score were positively correlated with sTB levels ($r:0.712$)($p<0.001$) and sTB/Alb ratio ($r:0.564$) ($p<0.001$). As the severity of jaundice increases, the frequency of severe ABE (Group 1/2/3 %0/6.3/56.2) increased ($p<0.001$). Similarly, as the severity of ABE increased, the percentage of those who failed the hearing test increased ($p<0.001$). According to logistic regression analysis, while consanguineous marriage (10.7 times), ABO incompatibility (5.4 times), and vaginal birth (4.1 times) increased the risk of severe hyperbilirubinemia, sepsis+urinary infection (6.4 times), sTB/Alb \geq 6,8 (6,3 times, $p<0,001$), D. Coombs positivity (3 times, $p=0.049$) and ABO incompatibility (2.8 times, $p= 0.018$) increased the risk of ABE.

In the Jaundice group, miR-21-3p ($p<0.001$), miR-93 ($p<0.001$), miR-491-3p ($p=0.025$), and miR-210 ($p=0.047$) expression were upregulated, miR-124 ($p=0.019$) was downregulated; while relative quantitative values of miR-21-3p ($p<0.001$), miR-93 ($p<0.001$), miR-491-3p ($p=0.03$) were higher; relative quantitative values of miR-Let7a ($p=0.020$) and miR-124 ($p=0.038$) were lower than Control group. Relative quantitative values of miR-124 expression decreased ($p=0.007$) while the relative quantitative values of miR-21-3p ($p=0.001$), miR-93 ($p=0.001$), miR-146a ($p=0.002$) increased in those who developed ABE. When miRNA expressions are evaluated according to ABE severity, upregulation of miR-491-3p ($p=0.03$), miR-21-3p ($p<0.001$) and miR-93 expression ($p<0.001$) increased the most those severe ABE develop. It was observed that miR-146a ($p=0.007$) and miR-181c ($p=0.026$) down-regulation decreased the most, miR-374a-5p ($p=0.015$) down-regulation was greatest. Investigating candidate miRNAs including miR-21-3p, miR491-3p, miR-124, miR-210 and miR-93, and their mimics and antimimics in a large number of cases of different ethnicity, will open new horizons for prevention of BIND and kernicterus.

Keywords: Newborn, severe hyperbilirubinaemia, bilirubin neurotoxicity, miRNA

GİRİŞ ve AMAÇ

Yenidoğan sarılığı yaşamın ilk haftasında hastaneye yatışın en sık nedenidir (1-3). Gelişmiş ülkelerde akut bilirubin ensefalopatisi 1/10.000, kernikterus 0,4-2.7/100.000 sıklıkta bildirilirken (2); gelişmekte olan ülkelerde ciddi sarılık sıklığının gelişmiş ülkelere göre yaklaşık 100 kat fazla olduğu; sarılık nedeniyle hastaneye yatırılan yenidoğanların %3'ünde akut bilirubin ensefalopatisi (ABE) geliştiği bildirilmektedir (2-3). İndirekt bilirubin (İB), fizyolojik konsantrasyonlarda antioksidan etkili iken; serumda yüksek düzeylere ulaştığında nörotoksik etkilidir; ancak ABE'nin moleküler mekanizmaları ve hangi bilirubin düzeyinde ortaya çıktığı iyi bilinmemektedir (4-6). Serum TB düzeyinin >20 mg/dl, >25mg/dl olması veya kan değişimi gerekecek kadar yüksek olması ciddi hiperbilirubinemi; sTB>30 mg/dl olması şiddetli hiperbilirubinemi olarak kabul edilmektedir (7). ABE erken tanınmaz ve tedavi edilmezse, kernikterus gelişmektedir.

Son kanıtlar, ciddi hiperbilirubinemili fare modelinde, nöroinflamasyonun, ABE gelişiminde anahtar rol oynadığını (8), ABE'li term bebeklerde, beyin-omirilik sıvısındaki eksozomların immün/inflamasyonla ilişkili proteinler içerdiğini gösterdi (9). Beynin nöroimmün hücreleri mikroglialar, toksik düzeyde bilirubin veya ölen nöronlardan salgılanan hasar ilişkili moleküler patternler tarafından aktive edilince, reaktif oksijen/nitrojen türleri, sitokinler ve inflamasyonla ilişkili miRNA'lar salgırlar. Kodlanmayan küçük RNA'lar olan miRNA'lar, hedef genlerin 3'translate edilmemiş (3'UTR) bölgesine bağlanıp hedef mRNA'yı yıkarak veya translasyonunu inhibe ederek gen ekspresyonunu baskılayabilirler (10,11). Gen ekspresyonunun miRNA aracılı regülasyonu, sepsis, kanser gelişiminde, prematüre retinopatisi, bronkopulmoner displazi, nekrotizan enterokolit, hipoksik iskemik ensefalopati, travmatik beyin hasarı, iskemik inme gibi yenidoğan hastalıklarının patogenezinde araştırılmışken; ciddi hiperbilirubinemi ve akut bilirubin ensefalopatisi gelişiminde miRNA'ların rolü araştırılmamıştır.

Çalışmamızda ≥ 35 hafta bebeklerde miR-21-3p, miR-491-3p, miR-141-3p, miR-374a-5p, miR-93, miR-124, miR-Let7a, miR-146a, miR-155, miR-210, miR-384, miR-376c-3p, miR 181c'nin ciddi hiperbilirubinemi ile ilişkisi araştırıldı.

GENEL BİLGİLER

BİLİRÜBİN METABOLİZMASI

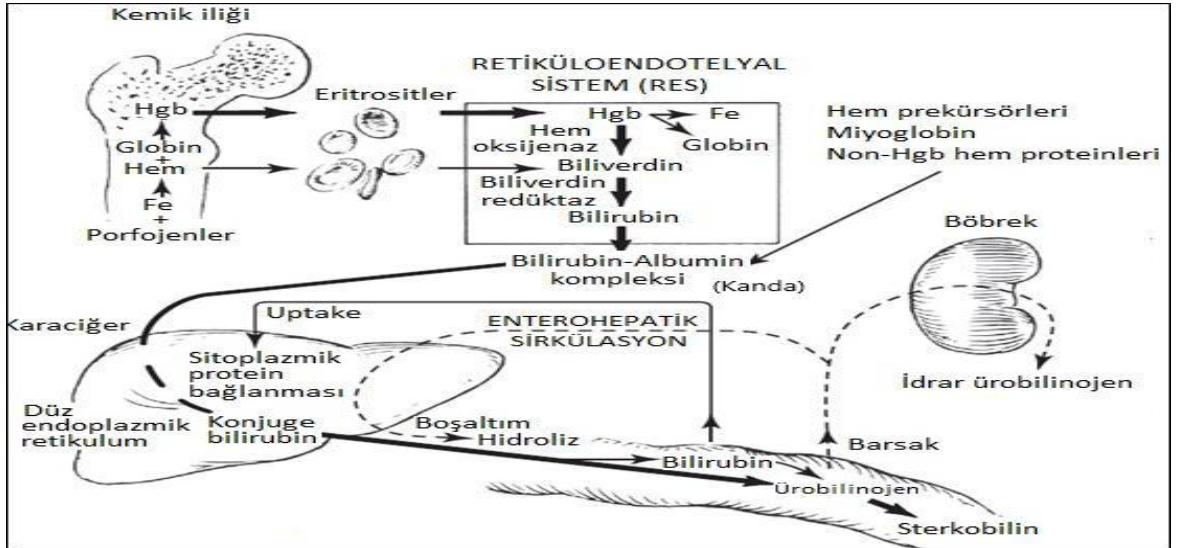
Sarılık, bilirübinin deri ve mukozalarda birikimi sonucu oluşan, serum total bilirübin (sTB) düzeyi 5 mg/dl'yi aştığında gözle farkedilebilen bir klinik durumdur. Çoğu zaman iyi seyirli olmakla birlikte, yaşamın ilk haftasında hastaneye yatışın da en sık nedenidir (1-3). İndirekt bilirübin (İB), fizyolojik konsantrasyonlarda antioksidan etkili iken; patolojik düzeylerde nörotoksik olup, akut bilirübin ensefalopatisi ve kernikterusa yol açmaktadır (4,5).

Bilirübin metabolizması üretim, taşınma, hepatositler tarafından tutulum, konjugasyon, atılım ve enterohepatik dolaşım aşamalarından oluşur (6). Bilirübinin yaklaşık %80'i eritrositlerin yıkımından, %20'si myoglobin, katalaz, peroksidaz, sitokrom, guanil siklaz ve nitrik oksit sentaz gibi diğer hemoproteinlerin yıkımından oluşmaktadır. Retikuloendotelial sistemden dolaşıma salınan konjuge olmamış bilirübin (indirekt bilirübin: İB) pH'ı 7.4 olan suda 0.01 mg/dl'den daha az çözüldüğünden (lipofilik), çoğunlukla albümine bağlanarak taşınır (12).

Bilirübin metabolizmasında ilk aşama, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve oksijen eşliğinde, hem halkasının hem oksijenaz (HO) tarafından açılması olup; biliverdin oluşur, karbonmonoksit (CO) ve demir açığa çıkar. Demir hemoglobin sentezi için tekrar kullanıma sokulurken; CO solunum yolu ile atılır. Biliverdin, karaciğer ve dalakta bulunan biliverdin IX α -redüktaz enzimi ile bilirübine metabolize olur. (Şekil1) (12). Bilirübin dolaşımında dört formda bulunabilir (6,13,14): 1. Albümine geri dönüşümlü bağlanan İB (en fazla), 2. Albümine bağlanmamış serbest İB (Unbound bilirübin), 3. Konjuge bilirübin (safra ve böbrek yoluyla atılabilir), 4. Albümine kovalan bağlı konjuge bilirübin (delta bilirübin).

Dolaşımda albümine bağlı olarak karaciğere taşınan İB, hepatosit zarında albüminden ayrılır; pasif difüzyon ve kısmen de organik anyon taşıyıcı proteinler (OATP) aracılığıyla hepatosit sitoplazmasına aktarılır (7). İB hepatosit içinde B-ligandine (Y protein) bağlanarak düz endoplazmik retikuluma taşınır. Burada üridildifosfat glukronil transferaz (UGT) enzimi yardımıyla iki glukronil grubunun eklenmesiyle mono ve diglukronid formuna, suda eriyen, idrar, safrayla atılabilen direk bilirübine (DB) dönüşür (6,14).

Konjuge bilirubin, hepatosit apikal yüzeyinde kanaliküler membranda bulunan, ATP bağı taşıyıcı multidrug resistance-associated protein-2 (MRP2) ve ATP bağlayıcı kaset (ABC) proteini yardımı ile safraya atılmaktadır (7). Direkt Bilirubin bağırsaktan emilmez (6). Bilirubinün mono-/diglukronid formları barsağın proksimalindeki hafif alkali ortamda non-enzimatik olarak ya da mukozal enzim β -glukronidaz aracılığıyla İB'e dönüşmekte, ~%25'i duodenum ve kolondan emilerek karaciğere geri dönmektedir. Bu dönemde barsak içeriğinin steril olması emilimi arttırmaktadır (6,12,14). Barsakta DB'nin ~%10'u değişmeden, kalanı ürobilinojen, sterkobiline dönüştürüldükten sonra gayta ile atılırken; ürobilinojenin bir kısmı barsaktan emilerek karaciğer ve böbrekten ekskrete edilmektedir (Şekil 1)(15).



Şekil 1: Bilirubin sentezi, taşınması ve metabolizması (6)

YENİDOĞANLARDA SARILIK VE CİDDİ HİPERBİLİRUBİNEMİ

Yenidoğan döneminde sarılık, indirekt ve direkt hiperbilirubinemi olarak iki başlıkta incelenir (16). Yenidoğanlarda sıklıkla indirekt hiperbilirubinemi görülmektedir (Tablo 1). Serum TB <5mg/dl olduğunda DB>1 mg/dl ise veya sTB>5 mg/dl olduğunda DB> sTB'nin %20 ise direkt hiperbilirubinemi olarak adlandırılır. DB>2 mg/dl olması her zaman patolojiktir (2).

Tablo 1. Yenidoğanlarda indirekt hiperbilirübinemi nedenleri (12)

A. HEPATİK BİLİRÜBİN YÜKÜNÜN ARTMASI	B. HEPATİK BİLİRÜBİN KLİRENSİNİN AZALMASI
1. Hemolitik hastalık: eritrosit membran defektleri a. Herediter sferositoz b. Eliptositozis c. Stomatositozis d. Piknositozis	1. Prematürite 2. Hormon eksikliği a. Hipotiroidizm b. Hipopitüitarizm
2. Hemolitik hastalık: eritrosit enzim bozuklukları a. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz eksikliği b. Pirüvat kinaz eksikliği	3. Hepatik bilirübin alımının bozulması a. Patent duktus venozus b. SLCO1B1 gen polimorfizmi
3. Hemolitik hastalık-hemoglobinopati a. Alfa talassemi b. Gama talassemi	4. Bilirübin konjugasyon bozuklukları-UGT1A1 gen varyantları a. Crigler-Najjar sendromu tip 1 b. Crigler-Najjar sendromu tip 2 (Arias hastalığı) c. Gilbert sendromu
4. Hemolitik hastalık: Direkt Coombs testi pozitif a. Rh izoimmünizasyonu b. ABO uyumsuzluğu c. Minör kan grubu uyumsuzluğu	5. Enterohepatik sirkülasyonun artışı a. İntestinal obstruksiyon, pilor stenozu b. İleus, mekonyum tıkaçı, kistik fibrozis c. Anne sütü ile beslenme
5. Enterohepatik bilirübin sirkülasyonunun artması a. İntestinal obstruksiyon, pilor stenozu b. İleus, mekonyum tıkaçı, kistik fibrozis c. Anne sütü ile beslenme	<i>SLCO1B1: Solute carrier organic anion transporter 1B1</i> <i>UGT1A1: Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1</i>
6. Ekstravasküler kan: Sefal hematom	
7. Polistemi	

Bilirübin Toksisitesi

Lipofilik olması nedeniyle membran lipidlerine kolayca bağlanabilen ve kan beyin bariyeri (KBB)'nden kolaylıkla geçebilen İB, serumda yüksek düzeylere ulaştığında beyin için toksik etki göstermektedir (5,6). Serbest bilirübin arttığında, KBB'ni oluşturan kapiller endotel hücreleri ve aralarındaki sıkı bağlantı kavşaklarına rağmen, konsantrasyon gradyentini dengelemek için bilirübin, kandan beyne pasif ya da kolaylaştırılmış difüzyonla geçmektedir (1,6). Hiperkarbi, beyin kan akımının artışı, şiddetli hiperglisemiye bağlı hiperozmolalite, intravenöz hiperalimentasyon, böbrek yetmezliği, asfiksi ve menenjit beyine bilirübin girişini arttırmaktadır (6). Asidozda albüminin bilirübini bağlama kapasitesinin azalması, sepsis ve hipoksemide artan serbest yağ asitleri, parenteral verilen lipidler, sulfisoksazol, indometazin ve salisilat gibi albümine bağlanmada bilirübin ile yarışan ilaçlar serumdaki serbest bilirübin oranını artırmaktadır. G6PD eksikliği hemoliz yoluyla bilirübin üretimini artıran, UGT1A1 ve SLCO1B1 gen mutasyonları bilirübin konjugasyonu ve atılımında defekte yol açan ciddi hiperbilirübinemi nedenleridir (13). Beyinde kapiller endotel hücreleri ve astrositlerde bol miktarda eksprese edilen P-glikoprotein (P-gp), kapiller endotel hücreleri, koroid pleksus epiteli ve astrosit membranında eksprese edilen multidrug resistance-associated protein 1 (Mrp-1)"

gibi ATP bağımlı membran eflux pompaları ise IB'in merkezi sinir sistemine geçişini sınırlamaktadır (17). Mitokondriyal bilirubin oksidaz enzimi, beyni IB'nin toksik etkilerinden koruyan bir diğer mekanizmadır. Bilirubin maruziyeti sırasında SSS'nin matürasyonu, bilirubin konjugasyonu ve eliminasyonu, mitokondriyal ve oksidatif fonksiyonlar, hemoliz, asidoz, inflamasyon varlığı ve çeşitli genetik faktörler nörogelişimsel sonuçları etkilemektedir (18).

Bilirubin nörotoksitesinin tanımlanmasında akut bilirubin ensefalopatisi (ABE), kronik bilirubin ensefalopatisi (KBE), kernikterus ve bilirubin kaynaklı nörolojik disfonksiyon (BİND) gibi terimler kullanılmaktadır (6,19). Amerikan Pediatri Akademisi (APA), farklı terminolojilere bağlı karışıklığı önlemek için, ilk bir haftada görülen bilirubin toksitesisi bulguları için "akut bilirubin ensefalopatisi", kronik ve kalıcı sekel için "kernikterus" terimini kullanmayı önermektedir (18,19).

Bilirubin İndüklediği Nörolojik Disfonksiyon (BİND):

İzole işitsel nöropati, hareket bozuklukları, distoni, bilişsel bozukluklar, hafif zeka geriliği gibi hafif ve belirsiz nörolojik bozukluklardan, akut bilirubin ensefalopatisi ve nöromotor/işitsel post-ikterik sekellere kadar geniş bir spektrumu tanımlamaktadır (2,20). Bilirubin beyinde en sık bazal gangliyonlarda depolanmakta, merkezi ve periferik işitsel ve görsel yollar, hipokampus, diensefalon, subtalamik çekirdekler, orta beyin, serebellum ve serebellar vermis bölgeleri ile pontin çekirdek, beyin sapının okülomotor fonksiyon, solunum, nörohumoral ve elektrolit kontrolü ile ilgili kısımları etkilenmektedir (21).

Akut Bilirubin Ensefalopatisi (ABE):

Ciddi hiperbilirubinemisi olan bebek üç klinik evreden geçer. İlk birkaç günde bebek letarjik ve hipotoniktir, emmesi zayıftır. İlk haftanın sonuna doğru orta derecede stupor, hipertoni, tiz sesle ağlama, ateş ve konvülziyonlar ile ikinci evre bulguları ortaya çıkar. Ateş diensefalik tutulum ile ilgili olabilir. Çoğu bebekte retrokollis ve opistotonus görülür. Moro refleksi kaybolur, apne, derin stupor, koma, bazen konvülziyon ve ölüm olabilir. Rijidite, solunum düzensizliği ve pulmoner kanamalar terminal belirtilerdir. Hayatta kalanlarda birinci haftanın sonunda hipertoni geriler ve hastanın durumu iyileşiyor izlenimi verir. Bu bebekler yaklaşık

altı haftalık olduğunda kronik ensefalopati bulguları yerleşmeye başlar (2). Akut evrede mortalite (~%7) solunum yetmezliği, progresif koma veya inatçı nöbetlerden kaynaklanmaktadır (21). Pretermlerde klasik nöromotor belirtiler daha siliik olduğundan, tekrarlayan apne ve desatürasyon atakları tek klinik bulgu olabilir (22). Erken dönem bulguları sepsis, asfiksi, hipoglisemi, intrakranial kanama bulgularından ayıramayabilir. Nörolojik disfonksiyonun diğer nedenleri saptanamayan bebeklerde akut bilirubin ensefalopatisinin varlığı ve ciddiyeti BİND skoru ile belirlenebilir. Mental durum, kas tonusu ve ağlama paterni gibi klinik bulgularla hesaplanan BİND skoruna göre 0 puan normal, 1-3 puan hafif, 4-6 puan orta, 7-9 puan ise şiddetli ABE'yi tanımlamaktadır (23) (Tablo 2).

Bilirubin toksisitesi başlangıçta geçici ve geri dönüşlüdür. Orta derece hiperbilirubinemde (sTB:10-20 mg/dl) *brainstem auditory evoked response* (BAER) testinde, sekizinci kraniyal sinir hasarını gösteren tipik dalga değişiklikleri görülmektedir. Bilirubin nörotoksitesinde işitme merkezi ve nöral yapılar etkilenirken koklea etkilenmediğinden, otoakustik emisyon (OAE) testi normal saptanabilir. MR'de T1 ve T2 sekanslarında karakteristik olarak hipokampüsün medial lobu ve globus pallidusta fokal değişiklikler gözlenmektedir. OAE testi normalken, anormal BAER testi ve MR bulguları ABE'ni düşündürmelidir (6,24).

Tablo 2. Klinik BİND skoru (23)

KLİNİK BULGULAR	PUAN
MENTAL DURUM	
Normal	0
Uyku hali, beslenmede azalma	1
Letarjik, sinirli, gergin	2
Beslenememe, nöbet, apne, semikoma-koma	3
KAS TONUSU	
Normal esnek tonus	0
Hipotoni/hipertoni	1
Boyun sertliği, fleksör spazmı, boyun başlangıcı ve sırt arkında kemerleşme	2
Persistan retrocollis ve opustotonos, bisiklet hareketi, ellerde ve ayaklarda seğirme, gevşeklikle beraber şiddetli hipotonik duruş	3
AĞLAMA PATERNİ	
Normal	0
Yüksek perdeden/tiz sesli ağlama	1
Seyrek ağlama	2
Zayıf ağlama veya ağlamanın olmaması, durdurulamayan ağlama	3
Toplam BİND skoru	9

Kernikterus:

Bilirubin toksisitesinin beyinde oluşturduğu patolojik bulguları tanımlar (6,18). APA tarafından önlenebilir bir hastalık olarak tanımlanan kernikterus, çoğunlukla sarılığı fark edilmeyen, yaşa göre sarılık derecesi değerlendirilmeyen, hemoliz, prematürite, hipoalbuminemi, emzirme sorunları gibi risk faktörleri olan yenidoğanlarda gelişmektedir (2,6,19). Nöronal immatürite ve hipoalbuminemi gibi nedenlerle pretermelerde düşük bilirubin düzeylerinde kernikterus görülebilmektedir (22). Gelişmiş ülkelerde tahmini akut bilirubin ensefalopatisi sıklığı 1/10.000, kernikterus sıklığı 0.4-2.7/100.000'dir. Akut bilirubin ensefalopatisi erken dönemde saptanamazsa veya tedavi edilmezse, kalıcı nörolojik bozukluğa ilerleyecektir. Yaşayan hastalarda bazal ganglion, hipokampal korteks, subtalamik çekirdek ve serebellar nöronlarda nekroz ve sarıya boyanma görülmekte, serebral korteks genellikle korunmaktadır. Kernikteruslu bebeklerin yaklaşık yarısında otopside gastrointestinal kanama, renal tübülülerde, intestinal mukoza ve pankreas hücrelerinde nekroz gözlenmiştir (6). İlk yıl hastaların beslenmeleri kötü, motor gelişimleri geri ve tonusları hipotoniktir. Kronik bilirubin ensefalopatisinin klasik sekel tetradı bir yaştan sonra, yıllar içinde ortaya çıkmaktadır. 1.Koreatetoik serebral palsy: atetoz ve distoniden başka spastisite ve hipotoni de gelişebilmektedir. 2.Yüksek frekanslı sensorinöronal işitme kaybı, 3.Okulomotor bozukluklar (strabismus, yukarı bakış, lateral bakış anormallikleri), 4.Diş minesini hipoplazisi. Mental retardasyon daha az sıklıkla görülür (2,12,20,25)

Bilirubin Nörotoksitesinin moleküler fizyolojisi ve patofizyolojisi:

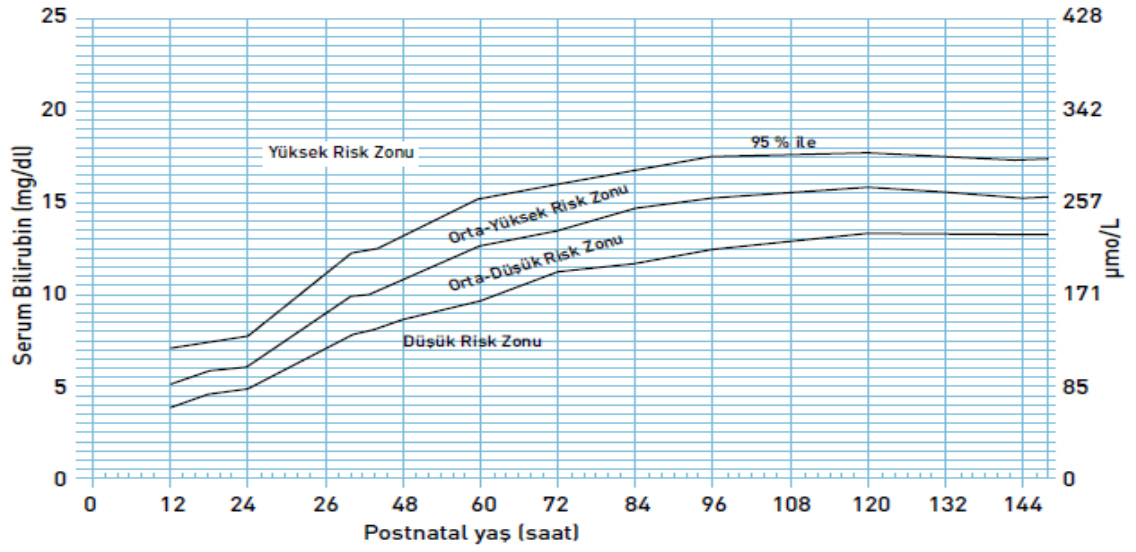
Bilirubin nörotoksitesinin mekanizması net olarak anlaşılamamasına rağmen, nöronal hasarın membran seviyesinde başladığı düşünülmektedir. Bilirubin lipofilik özelliği nedeniyle membran polaritesini değiştirerek, fagositoz için tanınma sinyali olan fosfotidilserinin eksternalizasyonuna, membrana bağlı Mg ATPaz, Na-K ATPaz'ın inhibisyonuna neden olmaktadır. Serum albumin düzeyi düşük (<3g/dl), Bil/Alb molar oranı yüksek olduğunda, sTB düzeyi düşük de olsa, artan serbest bilirubin (100-500 nM) KBB'ni geçebilmektedir. Bilirubin, nöronal eksitotoksitesinin aktivasyonu, mitokondriyal enerji yetmezliği ve hücre içi Ca artışı yoluyla membran permeabilitesi ve fonksiyonlarını bozarak, sitoplazma, mitokondri

ve endoplazmik retikulumda hasara yol açmaktadır. Sonuç olarak bilirubin, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen radikallerinin (ROS) artışını indükleyerek nörotoksisite oluşturmaktadır (1,22,26,27)

CİDDİ HİPERBİLİRÜBİNEMİ VE NÖROİNFLAMASYON

Fizyolojik sarılık: Hayatın ilk haftasında yenidoğanların üçte ikisinde görülen, sTB düzeylerinin normal sınırlarda olduğu geçici hiperbilirubinemidir. Normal koşullarda kord kanı İB düzeyi 1-3 mg/dl, yükselme hızı 5mg/dl/24 saattir. Bu nedenle sarılık hayatın 2-3. günde gözle görülür hale gelir; 2-4.günlerde 5-6 mg/dl 'ye ulaşır; 5-7. günlerinde <2 mg/dl olur. Term bebeklerin %6-7'sinde İB>13 mg/dl ve %3'ünden azında İB>15 mg/dl'ye ulaşabilmektedir. Hayatın ilk 24-36 saatinde görülen, sTB düzeyi 24 saatte 5 mg/dl'den daha hızlı artan, hayatın 10-14. gününden sonra devam eden, term bebekte sTB>12 mg/dl ve preterm bebekte sTB>10-14 mg/dl aşan, herhangi bir zamanda DB>2 mg/dl saptanan sarılığın nedeni araştırılmalıdır (28).

Ciddi hiperbilirubinemi: Tek bir tanımı yoktur. SerumTB>20 mg/dl, >25 mg/dl olması veya kan değişimi gerekecek kadar yüksek olması ciddi hiperbilirubinemi; sTB>30 mg/dl olması şiddetli hiperbilirubinemi olarak kabul edilir (7,18,29). Ciddi hiperbilirubinemi geliştirme riski olan bebeklerin belirlenmesi ve tedavisi için, APA 2004'te ≥ 35 hafta doğan bebekler için bir klinik uygulama kılavuzu hazırlamış; 2009'da klinik ve laboratuvar risk faktörleri eklenerek kılavuz güncellenmiştir (30).



Şekil 2. Postnatal yaş ve transkutan veya sTB değerlerine göre bebeklerin risk durumu. ≥ 2 farklı zamanda alınan bilirubin değerleri nomogram üzerine işaretlenerek, bilirubinün yükselme hızı değerlendirilir. Bilirubin düzeyi üst persantil eğrilerine doğru yükseliyorsa hemoliz düşünülür ve buna göre takip ve tetkik edilir (2 nolu kaynaktan alınmıştır)

Ciddi hiperbilirubinemi ve nörotoksisite risk faktörleri:

APA'nın 2004 kılavuzunda gebelik yaşı ≥ 35 hafta olan yenidoğanlarda ciddi hiperbilirubinemi gelişimi için **majör risk faktörleri** (19): 1.Hastaneden taburcu olmadan önceki sTB-cTB düzeyinin yüksek riskli zonda olması, 2.Gebelik yaşının 35-36 hafta olması, 3.İlk 24 saat içinde sarılık görülmesi, 4.Kan grubu uyuşmazlığı, direkt Coombs pozitifliği, diğer hemolitik hastalıklar, glukoz 6-fosfatdehidrogenaz eksikliği, end-tidal karbon monoksit konsantrasyonunda artış saptanması (ETCOc), 5.Sefal hematoma veya belirgin ekimoz varlığı, 6.Fototerapi almış kardeş öyküsü, 7.Sadece anne sütü ile (yetersiz emzirme) beslenme ve aşırı kilo kaybı; **minör risk faktörleri** ise 1.Hastaneden taburcu olmadan önceki sTB-cTB düzeyinin yüksek-orta zonda olması, 2.Gebelik yaşının 37-38 hafta olması, 3. Taburcu olmadan önce sarılık görülmesi, 4.Sarılıklı kardeş öyküsü, 5.Diyabetik annenin makrozomik bebeği, 6.Anne yaşının ≥ 25 yaş olması, 7.Erkek cinsiyet olarak bildirilmiş. **Riski azaltan faktörler**, 1.Taburculuk öncesi sTB-cTB düzeyinin düşük risk bölgesinde bulunması, 2.Mamayla beslenme, 3.Siyahi ırk, 4.Gebelik yaşının ≥ 41 hafta olması, 5.Hastaneden taburculuğun 72 saatten sonra olması olarak saptanmış.

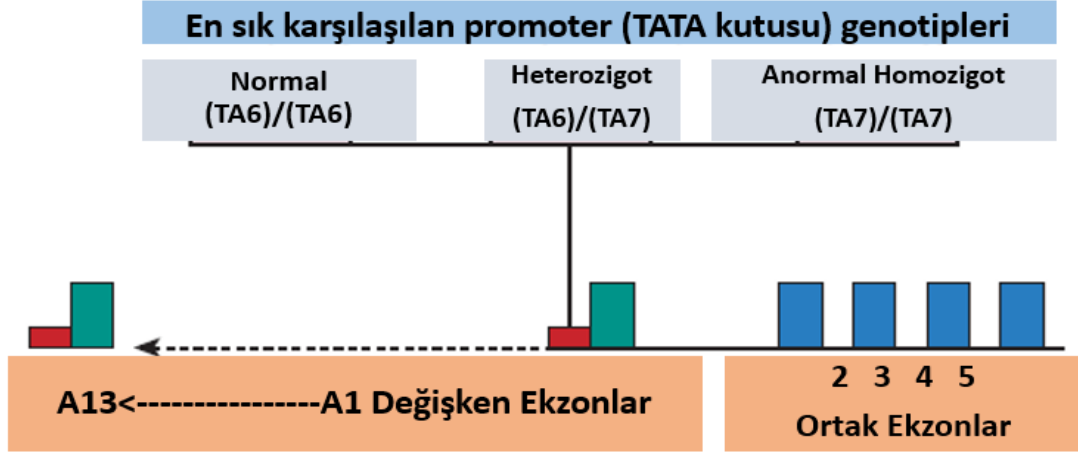
APA'nin laboratuvar ve klinik faktörler dikkate alınarak yapılan güncellemesinde, ciddi hiperbilirubinemi ve nörotoksitite için risk faktörleri: immün hemolitik hastalık, G6PD eksikliği, asfiksi, sepsis, asidoz varlığı ve albüminin <3 gr/dl olması olarak bildirilmiş (30). APA 2004 kılavuzu ve Türk Neonatoloji Derneği rehberinde (2016) sTB/Alb oranının tek başına tedavi kararı vermek için değil, tedavi kararını desteklemek amacıyla kullanılabileceği belirtilmiş (2,19).

UGT1A1 Enzimi ve Polimorfizmi:

Üridin difosfat glukuronosil-transferaz (UGT) enzimleri, bilirubin, steroid hormonları, safra asitleri, yağ asitleri gibi endojen bileşiklerin, ilaçlar, çevresel maddeler, ksenobiyotikler gibi kimyasal maddelerin detoksifikasyonunda rol oynarlar (31). İB'in ~%90'ı, hepatositte bilirubin glukuronidasyonu yapabilen tek UGT olan UGT1A1 enzimi tarafından glukuronik asitle konjüge edilerek veya oksidasyon, hidrosilasyon veya indirgeme yolları ile suda çözünür maddelere dönüştürülür (6,32,33). UGT'ler, karaciğerden başka KBB'nin endotel hücrelerinde ve astrositlerde eksprese edilse de beyinde UGT1A1 aracılı bilirubin konjugasyonu gösterilememiştir (32). Bilirubinün konjugasyonu, toksik düzeydeki İB'in beyne difüzyonunu önleyerek, KBB'den geçişini yavaşlatarak ve safrayla atılımını sağlayarak nörotoksiteyi kontrol eden hız sınırlayıcı bir metabolik bariyerdir (32).

Ritter ve arkadaşları tarafından 1991'de klonlanan UGT1A1 geni, dört ortak ekzon (2, 3, 4, 5) ve 13 değişken ekzondan (A1-A13) oluşur. A1 ekzonu sadece bilirubin metabolizmasında, kalan eksonlar çeşitli kimyasal maddelerin detoksifikasyonunda rol oynarlar (6) (Şekil 3). UGT1A1 geninde ekzon A1, promoter bölgesi, ekzon 2-5 bölgesindeki ve miRNA'ların yapıştığı 3' untranslated region (UTR) bölgesindeki mutasyonlar bilirubin konjugasyonunda defekte neden olur (34). Ciddi hiperbilirubinemi gelişmesinde UGT1A1 geni ile ilişkili 50'den fazla mutasyon ve polimorfizm tanımlanmıştır (6,11). Crigler Najjar Tip 1'de UGT1A1 enzimi hiç sentezlenmez. Bebeklik döneminde uzun süren ciddi (sTB: 25-40 mg/dl) indirekt hiperbilirubinemi belirgindir. Crigler Najjar Tip 2'de enzim aktivitesi kısmen korunmuş olup; sTB 6-20 mg/dl düzeyinde seyretmektedir. Gilbert sendromunda UGT1A1 geninin 5' promoter bölgesinin TATAA kısmına iki ekstra bazın (TA) girmesi, normal A(TA)₆TAA yerine A(TA)₇TAA sekansı ile sonuçlanmakta;

heterozigot/homozigot promoter polimorfizm ile beraber G6PD eksikliği, ABO uyumsuzluğu varlığında ciddi hiperbilirubinemi riski artmaktadır (6,35).

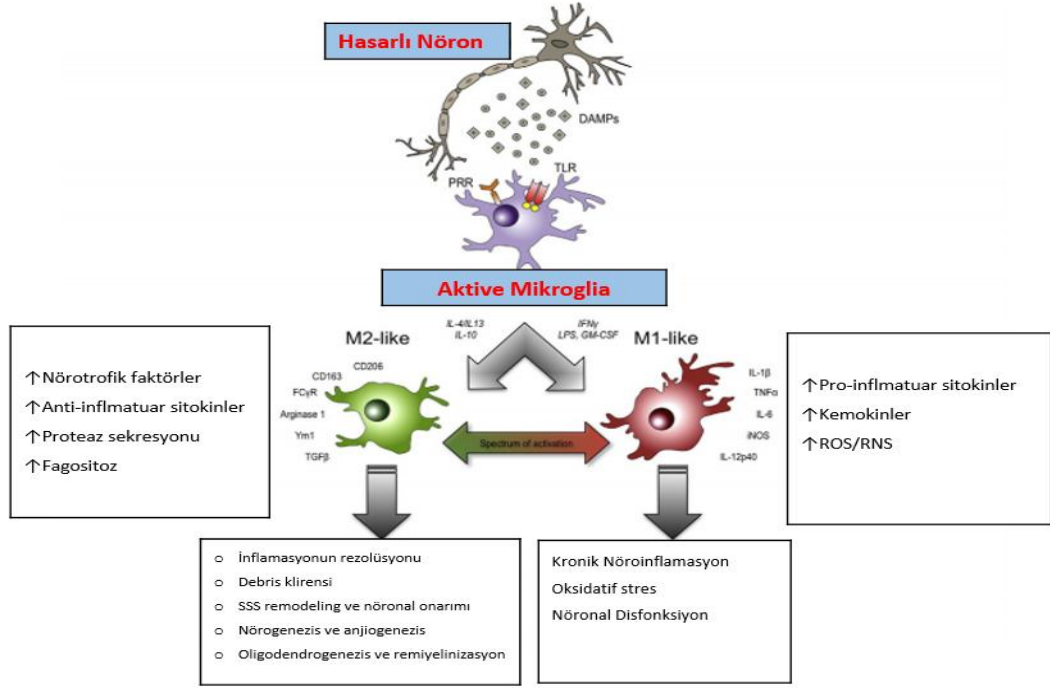


Şekil 3: İnsan UGT1 gen kompleksinin görünümü. UDP glukuronosiltransferaz enzimini, ekson 1A1 ve ortak eksonlar 2-5, kodlarken; değişken eksonlar 1A2-1A13 bilirubin metabolizmasına katılmaz. (6)

Nöroinflamasyonda Glial Hücrelerin rolü:

Astrositler, mikroglia, oligodendrositlerden oluşan glial hücreler, nöronların korunması, göçü ve miyelin yapımında görevlidir (36). Glial hücrelerin ~%10-20'sini oluşturan mikroglialar, sinir dokusunun yerleşik immün hücreleri, makrofajları olup; inflamasyonda birincil rol oynarlar (36-40). Mikroglia hücreleri istirahat halinde (M0/polarize olmayan) dinamik, uyarılmış ancak aktive değildirler (41,42). Travma, enfeksiyon, iskemi, dejenerasyon gibi beyin hasarı ile seyreden durumlarda, istirahat halindeki dallanmış yapıdan hızla ameboid fenotipe dönüşerek beyinin hasarlanan bölgesine göç ederler (37,43); enfekte veya ölü hücreleri fagosite ederler (37,38). M1 mikroglia/makrofajlar proinflamatuvar sitokinler; M2 mikroglia/makrofajlar hasarın sınırlanmasında etkili olan antiinflamatuvar faktörler üretirler (44-46).

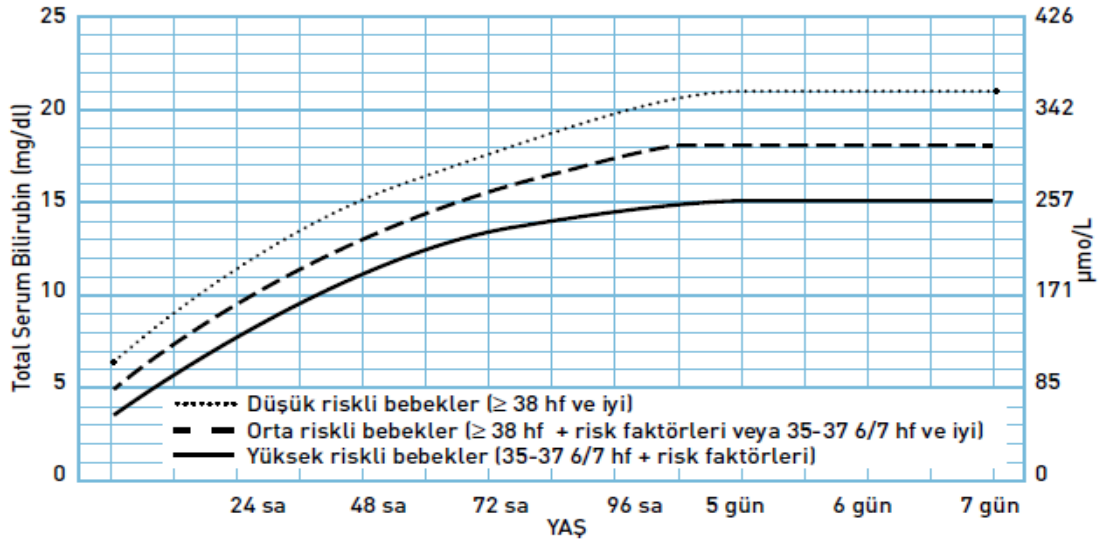
Deneysel çalışmalarda İB'in mikroglia ve astrositlerden sitokin, glutamat salınımını indüklediği; oligodendrositlerde nöronal miyelinizasyonu azalttığı, glial hücrelerin apoptotik ve nekrotik ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (37). Kernikteruslu bebeklerin beyinde mikroglia içinde bilirubin pigmentinin görülmesi, mikroglia'nın ciddi hiperbilirubinemiye bağlı ensefalopati gelişmesi sürecinde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir (37,43). Mikroglia aktivasyonunun modülasyonu, gelecekte BİND'ı önlemek için umut verici bir terapötik hedef olabilir (36,43).



Şekil 4: M1/M2 mikroglia polarizasyonu ve etkileri (47)

Tedavi:

Hiperbilirubinemi tedavisinde farmakolojik tedavi yöntemleri kullanılmaz. İVİG tedavisi dışında yenidoğan sarılığında farmakolojik tedavi önerilmemektedir (2). Hiperbilirubinemi önlemek ve tedavi etmek için en sık kullanılan tedavi şekli fototerapidir. Kan değişimi, bilirubin hızla uzaklaştırılmasında en etkili hayat kurtarıcı bir yöntemdir. Yoğun fototerapiye rağmen şiddetli hiperbilirubinemi devam eden, BİND gelişen bebeklerde kullanılmaktadır. İVİG, izoimmün hemolitik hastalığa bağlı hiperbilirubinemi tedavisinde kullanılmaktadır. Fototerapiye rağmen sTB düzeyi exchange düzeylerine yaklaşan hastalarda 0,5-1 g/kg/dozda kullanımı önerilmektedir. İVİG, ABO ve Rh hemolitik hastalığında hemolizi azaltarak kan değişim ihtiyacını azaltmaktadır (28,48). Fenobarbital, ursodeoksikolik asit (UDCA), metaloporfirinler ve klofibrat gibi farmakolojik ajanlar, hemolizin inhibisyonu, bilirubin konjugasyonu ve atılımının artırılması, safra akışının artırılması veya bilirubin oluşumunun inhibisyonu amacıyla kullanılabilir (49).

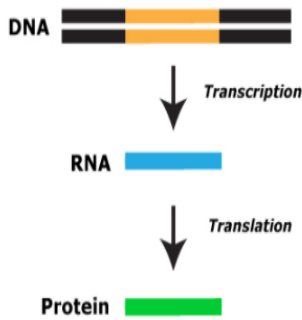


Şekil 5: ≥35 hafta bebeklerde postnatal yaşa göre fototerapi sınırları: İzomün hemolitik hastalık, G6PD eksikliği, asfiksi, belirgin letarji, ısının korunamaması, asidoz, sepsis, albümin <3 gr/dl gibi risk faktörlerinin birinin varlığında bir alt eğri kullanılır. sTB düzeyi, bebeğin postnatal yaşı ve risk faktörlerine göre belirlenen tedavi eşliğine ulaştığında fototerapi başlanır (2)

EPİGENETİK

Epigenetik, ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından “genler ve ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen ve fenotipi meydana getiren biyoloji dalı” olarak tanımlanmış (50). Günümüzde, DNA dizisini değiştirmeden gen ifadesini değiştiren kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklikler geri döndürülebilir olmaları nedeniyle genetik değişimlerden ayrılırlar. Etki kapsamı geniş olup, normal gelişimin birçok yönünü, hastalık patofizyolojisini, kanser ve diğer klinik durumların tedavilerini de etkilemektedir (42). Başlıca epigenetik değişiklikler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, kromatin modifikasyonu ve

Central dogma of molecular biology



kodlanmayan RNA'ların etkisiyle oluşur (51).

Şekil 6: Santral dogma: Ribonükleik asit (RNA) bir DNA şablonundan kopyalanır; haberci RNA (mRNA) daha sonra ribozomda proteine çevrilir. Protein sentezi temel olarak DNA'nın replikasyonu, transkripsiyon ve translasyon aşamalarından oluşmaktadır (42). İnsan genomunda ~20.000-25.000 protein kodlayan genin transkripsiyonu yapılır ve bir hücredeki toplam RNA'nın ~%1'ini mRNA

oluşturur. DNA'dan kopyalandıktan sonra, tipik olarak mRNA'nın 5' ucuna bir metil-guanozin başlığı (5'cap), 3' ucuna bir dizi adenin (poli-A kuyruğu) ve intronlar eklenmektedir. mRNA daha sonra çekirdekten proteine çevrildiği sitoplazmaya taşınmaktadır. DNA ve protein arasında geçici bir ara ürün olan mRNA sitoplazmada dakikalar, saatler içinde bozunur. Kodlanmayan RNA'lar ise proteine çevrilmez ve hücrede başka işlevleri bulunmaktadır. Başlıca kodlanmayan RNA'lar, transfer RNA (tRNA), ribozomal RNA (rRNA), küçük nükleer RNA (snRNA), küçük nükleolar RNA, (snoRNA), *mikroRNA (miRNA)*, piwi etkileşimli RNA (piRNA), uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'lardan oluşmaktadır (52).

MikroRNA'lar

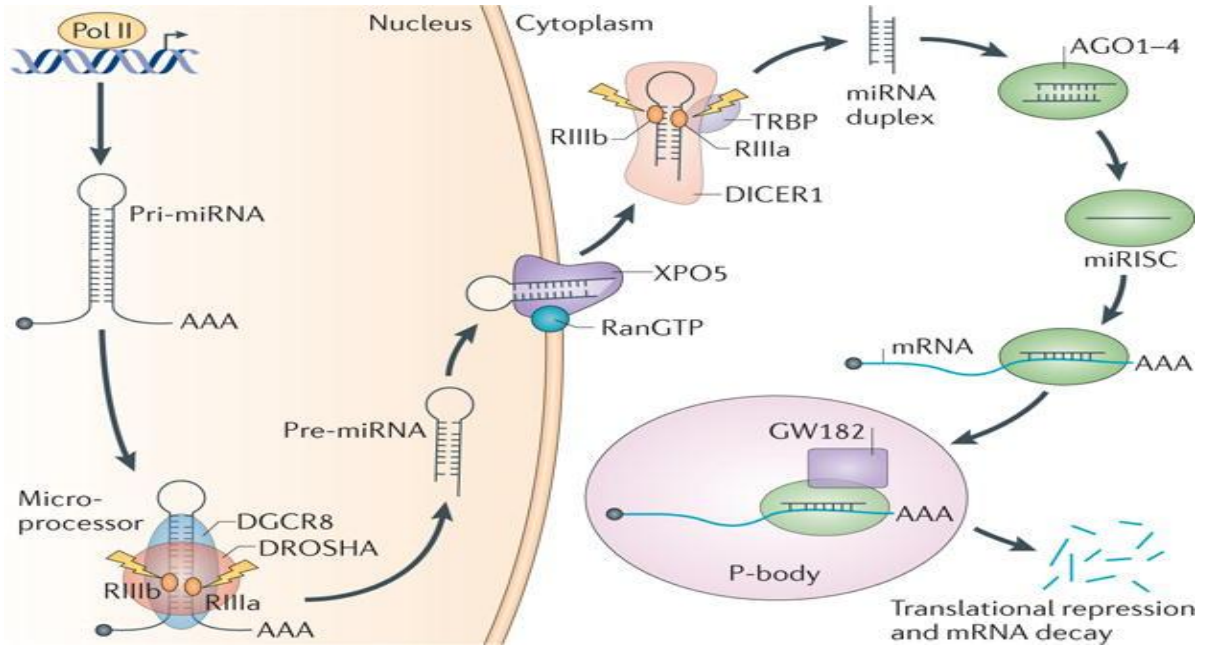
İnsan genomunda yer alan DNA'nın büyük bir bölümü RNA kodlamasına rağmen, çok küçük bir kısmı (~%1,5) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar genomun geri kalan kısmının çok az önem taşıdığı düşünülürken; küçük RNA moleküllerinin keşfi ile bu görüş değişti (53). Bu gruba giren miRNA'lar, kodlanmayan RNA'lardan olup; tek iplikçikli, 18-24 nükleotid uzunluğunda kısa RNA molekülleridir. İnsan genomunda miRNA'ların çok sayıda hedef gen bölgesi keşfedilmiştir. Güncel miRNA veritabanında Ocak 2018 tarihine kadar 38.589 mikroRNA tanımlanmıştır. (www.miRbase.org/)

İlk miRNA, Lee ve ark. tarafından 1993 yılında keşfedilmiş; mikroRNA terimi 2001 yılından itibaren literatüre girmiştir. Lee ve ark. 1993 yılında nematod "*Caenorhabditis elegans*"ın gen içeriğini taramışlar; lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkripte ettiğini göstermişler (54). Önemli bir epigenetik faktör olan miRNA'lar, etkilerini hedef genler üzerinden gösterirler ve hedef genin mRNA'sına karşılık gelen gen dizilimine sahiptirler (55). MikroRNA'lar hedef genlerin 3' translate edilmemiş bölgesine (3'-UTR) bağlanıp degradasyonu indükleyerek ve/veya hedef mRNA'nın bozunmasını indükleyerek veya protein translasyonunu inhibe ederek gen ekspresyonunu baskılayabilirler (11,52). miRNA'ların, hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre göçü, hastalıkların başlaması ve ilerlemesi gibi birçok biyolojik aktivitedeki rolleri gösterilmiştir (56).

MikroRNA Sentezi

Matür miRNA birbirini izleyen basamaklar sonucunda sentezlenmektedir: 1.Primer miRNA (pri-miRNA)'ların genomdan transkripsiyonu, 2.Çekirdekte pri-miRNA'lardan prekürsör miRNA (pre-miRNA) oluşumu, 3.Pre-miRNA'nın nükleustan sitoplazmaya transportu, 4.Sitoplazmada 18-25 nükleotit uzunluğunda matür miRNA'ların oluşumu (57).

miRNA'ların biyogenezi, çekirdekte ve sitoplazmada birbirini izleyen, iki işlem sürecini katalize eden RNAaz tip III enzimlerinden "DROSHA" ve "DICER" tarafından gerçekleştirilir (58). miRNA'lar primer transkript olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Primer miRNA "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. Nükleusta pri-miRNA, çift sarmallı RNA'ya özgü ribonükleaz "RNAaz III" enzim ailesinden bir endonükleaz olan "Drosha (double-stranded RNA-specific endoribonuclease)" ve kofakörü "Pasha" (DGCR 8/DiGeorge syndrome critical region protein 8) olarak adlandırılan mikroşlemci kompleksi tarafından ~70-100 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'ya dönüştürülür (57,58). Pre-miRNA molekülü "Exportin 5" ve "RAN-GTP"ye bağlı olarak çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA'lar sitoplazmada RNaz III enzim ailesinden "Dicer" adlı nükleaz ile kesilerek 21-23 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA-miRNA dubleksine dönüştürülür (57-60). İki zincirden yalnızca biri matür miRNA, diğeri analog miRNA olarak adlandırılır. "Dicer" ve partner proteini çift iplikli miRNA molekülünü keserek çift iplikçiği açar ve olgun miRNA sentezi gerçekleşir (59). MikroRNA'nın olgun iplik adı verilen iki zincirinden yalnızca biri, esas olarak Argonaute (AGO) proteinlerinden oluşan RISC (RNA-induced silencing complex) kompleksine dahil edilir. Tek zincirli miRNA'yı içeren aktif haldeki RISC kompleksi baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak translasyonunun inhibisyonuna veya mRNA'nın yıkımına neden olur (29,61).



Şekil 7 : miRNA biogenezi (62)

MikroRNA'ların fonksiyonu:

MikroRNA'lar hedef gene etkilerini mRNA üzerinden gösterirler ve protein sentezini inhibe ederler. MikroRNA'lar kendi nükleotid dizilerini tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliğine sahiptirler. MikroRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanma şekline göre mRNA yıkımı ya da protein translasyonunun inhibisyonu gelişir. miRNA hedef mRNA'nın 3'ucundaki translasyona uğramayan bölgeye bağlanırsa tam olmayan komplementerlik oluşur ve translasyon baskılanır. MikroRNA hedef mRNA'nın "open reading frame" bölgesine bağlanır ve tam komplementasyon varsa, mRNA yıkılır, mRNA miktarı azalır. Hedef genin mRNA düzeyi ölçülerek miRNA aktivitesi değerlendirilebilir (57). MikroRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (53).

MikroRNA'ların birçok patolojiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir:

miRNA ve Kanser: Hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili olan miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliğine göre onkogenik (onko-miR) veya tümör süpresör özellik kazanabilir. Kanserleşme sürecine miRNA'ların katkısı ilk kez Calin ve arkadaşlarının (2001) kronik lenfositik

lösemili (KLL) hastalarda yaptıkları moleküler çalışmayla ortaya konulmuştur. KLL hastalarının yaklaşık %50'sinde 13q14 bölgesinin delesyona uğradığı; delesyona uğrayan bölgede bulunan miR-15-a ve miR-16-1 genlerinin ekspresyonlarının KLL hastalarında azaldığı ya da olmadığı görülmüş. Sonraki yıllarda, normal dokular ile karşılaştırıldığında, kolon ve rektal adenokarsinomlarda, meme kanseri, Burkitt's lenfoma, malign beyin tümörleri, tiroid, akciğer, prostat kanseri ve hepatosellüler karsinomada da miRNA ekspresyon seviyelerinin değiştiği keşfedilmiştir (53).

miRNA ve Sepsis: Dolaşımdaki miRNA spektrumunun inflamasyon, enfeksiyon ve sepsis gibi patolojik durumlarda değiştiği; miR-25, miR-133a, miR-146, miR-150 ve miR-223 gibi miRNA'ların sepsis ile ilişkili olduğu gösterilmiş; sepsisin erken tanısında kan kültürü yerine miRNA'ların yeni biyobelirteçler olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (63). Çeşitli miRNA'ların TNF, toll like reseptör (TLR) / NF-κB sinyal yollarını hedefleyerek sepsisin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Deneysel çalışmalarda miR-511 enjeksiyonu ile TNF'ye bağlı endotoksik şok sendromuna karşı korunma sağlandığı; miR-15a/16 eksikliğinin, TLR4 ekspresyonu, dolayısıyla fagositoz artışına yol açtığı gösterilmiştir (64). miR-23b'nin NF-κB, TNF-α, IL-6, ICAM-1, E-selektin ve VCAM-1 ekspresyonunu inhibe ederek sepsisin ilerlemesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (65).

miRNA ve Otoimmün Hastalıklar: MikroRNA'ların osteoartrit, romatoid artrit, ankilozan spondilit, diyabet, ailesel akdeniz ateşi ve sistemik lupus eritematozis gibi otoimmün hastalıkların patogeneğinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (66). MikroRNA'lar hematopoez, immün yanıt ve enflamasyonda rol alırlar. MikroRNA disregülasyonu ile bu süreçlerin bozulduğu ve otoimmün hastalıkların geliştiği düşünülmektedir. MikroRNA-146 ve miR-155'in IL-1 ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından indüklendiği, inflamasyonda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. MikroRNA'ların T hücre farklılaşması ve aktivasyonu, dentritik hücreler, monosit, nötrofil, plazma hücresi mast hücresi oluşumuna da etkili olduğu bildirilmiştir (67).

miRNA ve Prematüre Retinopatisi: Prematüre retinopatisi (ROP), retinal iskemide ve neovaskularizasyon ile karakterize proliferatif vitreoretinopatidir. MikroRNA'ların, metabolik düzenleme, hafıza ve sinaptik gelişim, anjiyogenez, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, tümörjenez ve büyüme kontrolü gibi işlevleri olduğu; ROP'un patofizyolojisinde rol oynayabilecekleri düşünülmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, evre 3 ROP tanılı prematürelere miR-23a ve miR-200b-3p ekspresyon seviyesinin, ROP görülmeyen kontrol grubuna kıyasla belirgin arttığı; miR-27b-3p ve miR-214-3p ekspresyon seviyesinin ise önemli ölçüde azaldığı saptanmış (68).

miRNA ve Bronkopulmoner Displazi: miRNA'ların pulmoner morfogenezde ve akciğer hasarında rol oynadığı bilinmektedir. Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin hava yollarında bulunan ekzozomal miRNA'ların BPD için biyobelirteç olma potansiyelini araştıran bir çalışmada, doğumda miR876-3p ekspresyonunun azalması, şiddetli BPD gelişimini öngörmeye duyarlı bulunmuş (69). Başka bir çalışmada hiperoksiye maruz kalan neonatal farelerin akciğerlerinde miR-34a seviyelerinin önemli ölçüde arttığı, miR-34a'nın delesyonu veya inhibisyonu ile BPD ilişkili pulmoner hipertansiyonun iyileştiği; tersine miR-34a'nın aşırı ekspresyonu ile pulmoner hipertansiyonun kötüleştiği; miR34a'nın düzeyini azaltan anjiyopietin-1 uygulamasının BPD ve pulmoner hipertansiyon fenotiplerini iyileştirdiği gösterilmiş (70).

miRNA ve Nekrotizan Enterokolit: miRNA'lar, intestinal immün veya inflamatuvar yanıtı modüle ederek çeşitli intestinal fizyolojik ve patolojik süreçlerle bağlantılıdır. Yenidoğanlarda, miR-146a'nın bakteri ilişkili bağırsak epitel hasarını önlemek için interlökin-1 reseptör-ilişkili kinaz 1 (IRAK1) ekspresyonunu azalttığı; miR-23b ve miR-150'nin bağırsak inflamatuvar yanıtının düzenlenmesine katkıda bulunduğu; miR-141-3p'nin NEK'de inflamasyonu ve oksidatif hasarı iyileştirebileceği rapor edilmiş (71). Neonatal NEK modeli oluşturulan ratlarda, NEK'li dokularda aşırı eksprese edilen miR-124'ün barsak hücre apoptozu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu arttırdığı; miR-124'ün inhibisyonunun, bağırsak hücre apoptozunu baskıladığı gösterilmiş. Sistemik bir meta-analizde, miRNA-429/200a/b ve miRNA-141/200c kümelerinin yenidoğan NEK tanısında biyobelirteç olabileceği bildirilmiş (72).

miRNA ve Hipoksik İskemik Ensefalopati: Perinatal beyin hasarında ana faktör, mikroglia aktivasyonu ile karakterize nöroinflamasyondur (73). Sağlıklı beyinde istirahat fenotipinde iken, hipoksi/iskemiye takiben M1 fenotipine aktive olan mikrogliaların, proinflamatuvar sitokinler salgıladığı bilinmekte; ancak mikroglial M1 aktivasyonunun moleküler kontrolü iyi bilinmemektedir. Mikroglia aktivasyonunu düzenleyen mekanizmaları anlamının neonatal HİE'deki patojenik etkileri önlemenin anahtarı olabileceği öngörülmektedir (74). MikroRNA'nın makrofajlar üzerindeki etkisi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar olabilmektedir (75). Bir çalışmada, neonatal HİE'de ekspresyonu belirgin azalan miR-374a-5p'nin, mikroglia aracılı nöroinflamasyonu etkili bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (73). Yenidoğan sıçanlarda, HİE'de ekspresyonu artan miR-210'un mikroglia'yı indükleyerek hipoksik-iskemik doku hasarını arttırdığı; intraserebroventriküler miRNA-210 antagomiR uygulamasının, nöroinflamasyonu bastırarak, beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir (74). Sıçanlarda hipoksi-iskemi, oksijen-glukoz yoksunluğu modeli oluşturulan bir çalışmada, miR-124'ün aşırı ekspresyonunun nöron sağkalımını arttırdığı, nörolojik bozuklukları iyileştirdiği bildirilmiştir (76). HİE'nin şiddeti arttıkça NSE ve S100B seviyelerinin arttığı; miR-210 ve miR-374a seviyelerinin azaldığı; miR-210 ve miR-374a'nın HİE tanısı ve prognozunu tahmininde kullanılabileceği bildirilmiştir (77).

miRNA ve Travmatik Beyin Hasarı (TBH): Son zamanlarda artan kanıtlar, miRNA'ların TBH'da temel araçlar olduğunu göstermektedir (78). MikroRNA-144'ün TBH sonrası β -amiloid birikiminin neden olduğu bilişsel bozuklukları arttırdığı gösterilmiştir (79). MikroRNA-711'in down-regülasyonunun, nöronları TBH kaynaklı hücre ölümüne karşı koruduğu bildirilmiştir (80). TBH oluşturulan ratlarda miR-9-5p'nin miRNA agomiRi ile up-regülasyonunun, apoptozu, nöroinflamasyonu ve KBB hasarını hafiflettiği bildirilmiştir (78). Ratlarda, kortikal nöron hücrelerinde oluşturulan TBH modelinde, miR-22'nin down-regüle edildiği; miR-22 up-regülasyonunun hücre apoptozunu baskılayarak nöroprotektif etkili olabileceği gösterildi (81).

miRNA ve İskemik İnme: İskemik inmede, proinflamatuvar M1 fenotipinin beyinde ikincil hasarı ağırlaştırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, mikroglia/makrofajların polarizasyonunun anti-inflamatuvar M2 fenotipe kaydırılması nöroprotektif olarak kabul edilir (82).

Ciddi Hiperbilirubinemi ve Nörotoksisite Gelişmesinde miRNA'lar: Ciddi hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisitede iki esas patolojik sürecin rol oynadığı biliniyor: *i*-UGT1A1 enzim ekspresyonunun azalması, *ii*- Nöroinflamasyon. UGT1A1 ekspresyonunu artırarak plazmadaki bilirubin miktarını kontrol etmek, bilirubin nörotoksisitesini önlemede önemli bir strateji olarak görünmektedir.

Nöroinflamasyonda görevli mikroglia hücrelerinin BİND'deki etkileri henüz anlaşılacakla birlikte, mikroglia modülasyonunun BİND'yi önleyebileceği ileri sürülmektedir. Mikroglia hücrelerinin nörotoksik etkili M1 polarizasyonu (pro-inflamasyon) ve nöroprotektif etkili M2 polarizasyonunun (anti-inflamasyon) düzenlenmesinde miRNA'lar önemli roller üstlendiğinden; mikroglia polarizasyonunun miRNA'lar aracılığıyla manipüle edilmesinin nöroprotektif tedavi stratejilerinde umut verici olacağına inanıyoruz.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ciddi hiperbilirübinemili ve fizyolojik sarılığı olan yenidoğanlarda miRNA ekspresyon profillerinin değerlendirildiği bu prospektif çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Neonatoloji Bilim Dalı ve Tıbbi Genetik Bilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezinde yapıldı. COVID-19 pandemi koşulları nedeniyle merkezimizde yeterli hasta sayısına ulaşamayacağı öngörülerek, Türk Neonatoloji Derneği aracılığıyla, ciddi hiperbilirübinemili yenidoğan takip eden merkezlerden Ocak 2020–Ağustos 2020 tarihleri arasında hasta kabul edildi.

Gebelik yaşı ≥ 35 hafta, sTB ≥ 20 mg/dl olan ciddi hiperbilirübinemili hastalar sarılık grubunu, sTB < 13 mg/dl olan fizyolojik sarılıklı yenidoğanlar kontrol grubunu oluşturdu. Ciddi hiperbilirübinemili hasta grubu sTB düzeyi ≥ 20 - ≤ 25 mg/dl, > 25 - ≤ 30 mg/dl ve > 30 -mg/dl olmak üzere üç alt grupta incelendi.

Çalışmaya alınan yenidoğanların demografik verileri, klinik ve laboratuvar bulguları her merkezde takip formuna kaydedildi (**Ek-1**). Takip formuna hastanın takip edildiği merkez, uyruğu, protokol numarası, adı, cinsiyeti, gebelik yaşı, doğum şekli, doğum ağırlığı, başvuruadaki ağırlığı, kilo kaybı, anne yaşı, anne-baba akrabalığı, beslenme şekli, kardeşle fototerapi öyküsü, sarılığın kaçınıcı gün başladığı, eşlik eden hastalık ve semptomlar (sefal hematoma, ekimoz, respiratuar distres sendromu, yenidoğanın geçici takipnesi, HİE, intrakranial kanama, hipoglisemi, apne, sepsis, hipoalbuminemi, hipotermi, polisitemi, doğum travması) kaydedildi. Benzer şekilde tam kan sayımı [hemoglobin (Hb), hematokrit (Htk), lökosit, trombosit sayısı, ortalama korpusküler hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), retikülosit, periferik yayma bulguları], anne kan grubu, bebek kan grubu, direkt Coombs test (DC), pik sTB, DB, İB, albümin, bilirubin/albumin oranı, serbest T4, TSH, C-reaktif protein (CRP), immatür nötrofil sayısının total nötrofil sayısına oranı (İ/T oranı), tam idrar tetkiki (TİT), idrar kültürü, kan kültürü, G6PD, pirüvat kinaz eksikliği gibi laboratuvar verileri, işitme testi, BİND skoru, fototerapi, IVIG, kan değişimi, fenobarbital gibi tedaviler kaydedildi.

Gebelik yaşının belirlenmesinde annelerin son adet tarihi, son adet tarihi bilinmiyor ise obstetrik USG ölçüleri ve/veya hasta dosyasında yaşamın ilk 24 saati içinde yapılan New Ballard skoru kullanıldı. Gebelik yaşı < 37 hafta olan

yenidoğanlar geç preterm olarak kaydedildi. Hastaneye başvuru/kabul sırasında doğum ağırlığına göre % kayıp oranı APA 2004 kılavuzuna göre değerlendirildi (19). Ağırlık kaybı %10'dan fazla ise patolojik kilo kaybı olarak kabul edildi.

Anne sütüyle beslenmenin günümüzdeki kadar yaygın olmadığı, fototerapinin sık uygulanmadığı dönemde yapılan çalışmalarda yenidoğanların %95'inde sTB düzeyi 12,9 mg/dl düzeyini aşmadığı görüldüğünden; bu değer "fizyolojik sarılık" sınırı olarak kabul edildi (2). Farklı çalışmalarda sTB \geq 20 mg/dl, sTB \geq 25 mg/dl veya bilirubin nomogramında saate özgü sTB düzeyinin kan değişim sınırında olması ciddi hiperbilirubinemi olarak tanımlanmaktadır (7,29). Çalışmamızda sTB \geq 20 mg/dl olması ciddi hiperbilirubinemi olarak kabul edildi.

Anne kan grubu O, bebek kan grubu A veya B ise ABO uyumsuzluğu, anne Rh (-), bebek Rh (+) ise Rh uyumsuzluğu, ABO ya da Rh uyumsuzluğu olmadan direkt Coombs pozitifliği subgrup uyumsuzluğu olarak kabul edildi. ABO, Rh ve subgrup uyumsuzluğu olan bebeklerde ilk 24-36 saatte başlayan indirekt hiperbilirubinemi, DC pozitifliği, hafif anemi ve retikülositoz, periferik yaymada hemoliz bulguları varlığı immün hemolitik anemi olarak değerlendirildi. G6PD ve pirüvat kinaz enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü; G6PD<7,5 U/gHb, PK<111 mU/10⁹ rbc eksiklik olarak tanımlandı. Periferik venöz hematokrit>%65 olması polisitemi, MCHC \geq 36,0 g/dL olması herediter sferositoz şüphesi, klinik bulguların varlığında lökopeni, nötropeni, İ/T nötrofil>0,20, CRP>1,0 mg/dL, trombosit sayısı <100.000/mm³ ve/veya kan kültüründe etkenin gösterilmesi sepsis lehine değerlendirildi. Santrifüj edilmiş idrarda her sahada >5 lökosit veya kateterle alınmış idrar örneğinde>10.000 cfu/mL herhangi bir organizmanın üretilmesi üriner enfeksiyon lehine kabul edildi. Tek başına nitrit pozitifliği anlamlı kabul edilmedi (104). Serbest T4<0,9 ng/dL ve/veya TSH>20 mIU/mL olması ile primer konjenital hipotiroidi tanısı konuldu .

Hiperbilirubinemili bebeklerde albümin<3 g/dl olması hipoalbüminemi (2), risk kategorisine göre kan değişimi planlanması gereken sTB/Alb oranı: gebelik yaşı 35^{0/7}-36^{6/7} hafta olan riskli bebeklerde 6,8, gebelik yaşı 35^{0/7}-36^{6/7} hafta olan iyi bebeklerde ve gebelik yaşı >38 hafta olan riskli bebeklerde 7,2; gebelik yaşı >38 hafta bebeklerde 8 olarak kabul edildi (83).

Akut bilirubin ensefalopatisinin tanımlanmasında bilirubine bağlı nörolojik

disfonksiyon (BİND) skoru kullanıldı. BİND skorlama sistemine göre klinik belirtiler mental durum, kas tonusu ve ağlama paterni üzerinden değerlendirildi. BİND skoru 0 puan normal, 1-3 puan hafif etkilenme, 4-6 puan orta düzeyde etkilenme, 7-9 puan ise şiddetli etkilenme olarak kaydedildi (23).

Çalışmaya katılan yenidoğanlara işitsel beyin sapı cevabı (*Auditory Brainstem Response*–ABR) testi uygulandı. İşitme bilgileri, sarılıklı bebek takip formu, hastane bilgi yönetim sistemi ve T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal İşitme Tarama Programı (<https://isitmetarama.saglik.gov.tr/internet>)’ndan alındı. Her iki kulak işitmeden ‘geçti’ ise, işitme normal kabul edildi (84,85).

miRNA seçimi: Literatürde UGT1A1 enzim ekspresyonu ile ilişkisi gösterilen miR-21-3p, miR-491-3p, miR-141-3p, mikroglia polarizasyonu ve nöroinflamasyonla ilişkisi gösterilen miR-374a-5p, miR-93, miR-124, miR-Let7a, miR-146a, miR-155, miR-210, miR-384, miR-376c-3p, miR-181c’nin ciddi hiperbilirubinemi ile ilişkisi araştırıldı.

miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Ölçümü

miRNA izolasyonu Protokolü: Hasta ve kontrol grupları plazmasından miRNA izolasyonu Hybrid-R miRNA (GeneAll, Kore) kiti kullanılarak kit üreticisinin yönergesine uyularak yapıldı.

miRNA izolasyonunda izlenen protokol: 1) Serum örneğinden 200 µl RNase free mikrosantrifüj tüpüne alınır; üzerine 1000 µl RiboEx (GeneAll, Kore) solüsyonu eklenip 15 sn vorteks cihazı kullanılarak karıştırılır ve 5 dk oda ısısında inkübe edilir. 2) Ardından 200 µl kloroform eklenerek 15 sn karıştırılır ve 2 dk oda ısısında inkübe edilir. Örnekler 12.000 x g hızda 15 dakika +4° C’de santrifüj edilir ve oluşan şeffaf faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. 3) Örneklerin üzerine aynı hacimde %50 etanol eklenerek nazikçe karıştırılır. 4) Karışım kırmızı işaretli spin kolona aktarılır ve 10.000 x g hızda 30 saniye santrifüj edilir. 5) Toplama tüpüne süzülen karışım üzerine 700 µl %100 etanol eklenir ve pipetaj yapılarak karıştırılır. 6) Karışım mavi işaretli spin kolonlara aktarılır ve 10.000 x g hızda 30 saniye santrifüj edilir. 7) Kolonların üzerine 500 µl RBW solüsyonu eklenir ve 10.000 x g hızda 30 saniye

santrifüj edilir.8) Kolonların üzerine 500 µl RNW solüsyonu eklenir ve 10.000 x g hızda 30 saniye santrifüj edildi ve bu basamak iki kez tekrar edilir. 9) Kolonlar etanolün uzaklaştırılması için 10.000 x g hızda 1 dakika boş santrifüj edilir. 10) Kolonlar RNA elüsyonu için temiz mikrosantrifüj tüplerine alınarak üzerlerine 50 µl RNase içermeyen su eklenir ve 10.000 x g hızda 1 dakika santrifüj edilir. 11) İzole edilen miRNA örnekleri çalışma yapılana kadar -80 °C 'de muhafaza edilir.

cDNA elde edilmesi: İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'lerden cDNA sentezi her miRNA'ya özgü cDNA sentez kiti (A.B.T, Türkiye) kullanılarak üretici firmanın belirttiği şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı miR-cDNA sentez kit 2,5 µl, kalıp miRNA 2,5 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon şartları, 25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 120 dakika 85 °C'de 5 dakika olarak gerçekleştirildi. Örnekler, topluca çalışılana kadar -20 °C'de saklandı.

Real-Time PCR Reaksiyonu: Real time PCR reaksiyonu miRNA qPCR Assay kiti (A.B.T. Tm, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı miR-qPCR master mix 6 µl, cDNA 3 µl, RNase içermeyen su 1 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi bünyesinde kurulu Bio-Rad CFX96 realtime PCR cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95 °C'de 10 dakika bir basamak → - 95 °C 10 saniye → - 67 °C 30 saniye
Örnekler miR-16-5p ye karşı ifadeleri $2^{\Delta Ct}$ olacak şekilde oranlandı. Relatif kantitasyonda referans olarak miR-16-5p kullanıldı ve 2-delta CT yöntemi ile relatif kantitasyon gerçekleştirildi.

UGT1A1 promoter polimorfizmi: *DNA İzolasyonu:* EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu exgene blood sv kiti kullanılarak (genall/kore), üreticinin direktiflerine uyularak gerçekleştirildi. 1) 1,5 ml'lik epanдорf tüplere 200 µl (mikrolitre) kan örneği 25 µl proteinaz K ve 200 µl lysis buffer (B3 solüsyonu) eklenir ve 70° C'de 12 dakika inkübe edilir. 2) İnkübasyondan sonra epanдорflar üzerine 210µl etanol ilave edilerek ve vorteks cihazı kullanılarak karıştırılır. 3) Karışım spin kolonlara aktarılır ve 11000 devirde 1 dakika santrifüj edilir. 4)

Santrifüjden sonra toplama tüpleri atılarak, kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirilir ve her bir kolon üzerine 500 µl Wash Buffer (BW) ilave edilerek 11000'de santrifüj tekrarlanır. 5) Santrifüjden sonra toplama tüpleri atılarak, kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirilip; her bir kolon üzerine 600 µl Wash Buffer eklenir ve 11000'de 1 dakika santrifüj edilir. 6) Santrifüjden sonra kolonlar 1,5 µl'lik yeni ependorflara yerleştirilerek ve üzerine 70° C de ısıtılmış olan Elution Buffer (BE) 100µl ilave edilir. 11000'de 1 dakika santrifüj edilir. Ependorf tüplere toplanan DNA örnekleri çalışma yapılmıncaya kadar -20° de muhafaza edilir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

1) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile UGT1A geninin çoğaltılmasında aşağıda dizisi verilen primerler kullanılır.

UGT1A F: 5'-GAGTATGAAATTCAGCCAG-3'

UGT1A R 5'-ACTCTTTCACATCCTCCCTT-3'

2) PZR için her bir örnekte aşağıdaki reaksiyon karışımı kullanılır:

5 µl kalıp DNA (50ng/µl)

25µl PZR karışımı (Vivantis, Malezya)

3 µl Forward Primer

3 µl Reverse Primer

14 µl dH₂O

3) Polimeraz zincir reaksiyonu termal profili:

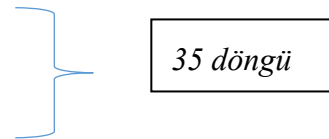
95 °C'de 10 dakika ilk denatürasyon,

95 °C'de 30 saniye denatürasyon

58 °C'de 30 saniye primer bağlanması

72 °C'de 60 saniye uzama

72 °C'de 10 dakika son uzama reaksiyonu



PZR sonrası saflaştırma işlemi: PZR sonrası saflaştırma işlemi ticari kit kullanılarak (E.Z.N.A Cyle Pure Kit (Omega, ABD) üreticinin direktiflerine uyularak gerçekleştirildi: 1) PZR ürünleri üzerine 50 µl dH₂O eklenerek 100 µl hacme tamamlanır ve üzerlerine 500 µl BİNDing Buffer eklenerek karıştırılır. 2) Karışım filtreli tüplere aktarılır ve 14.000 rpm hızda 1 dk santrifüj edilir. 3) Filtreli tüplerin üzerine 700 µl Wash Buffer eklenir ve 14.000 rpm hızda 1 dk santrifüj edilir. 4)

Filtreli tüpler temiz toplama tüplerine aktarılarak 14.000 rpm hızda 2 dk santrifüj edilir ve alkolün tamamen uzaklaşması sağlanır. 5) Filtreli tüpler temiz 1,5 ml eppendorf tüplere aktarılır ve üzerlerine 50 µl elution buffer eklenir ve 14.000 rpm hızda 1 dk santrifüj edilerek saflaştırma işlemi tamamlanır.

DNA dizileme reaksiyonu: Konvansiyonel DNA dizileme reaksiyonu ticari kit kullanılarak PZR'de kullanılan UDG1A forward primeriyle tek yönlü olarak (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) gerçekleştirildi.

Sekanslama reaksiyonu bileşenleri: 5 µl saflaştırılmış PZR ürünü, 2 µl BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, 1 µl Forward Primer, 4 µl 5X Sequencing Buffer

Sekanslama reaksiyonu termal koşulları:

96 °C'de 1 dakika ilk denatürasyon

96 °C'de 10 saniye denatürasyon

50 °C'de 5 saniye primer bağlanması,

60 °C'de 4 dakika uzama

25 döngü

Sekanslama reaksiyonu sonrası reaksiyon ürünleri mikroboncuk (sephadex[™]) içeren kolon tüpler aracılığıyla saflaştırıldı ve kapiller jel elektroforeziyle ABI 3130 genetic analyser cihazında analiz edildi. SeqScape[™] programı kullanılarak promoter bölgede bulunan TATA kutusundaki TA dizi tekrar sayısı analiz edildi (Şekil 8).

UGT1A1 genine ait promoter bölgedeki homozigot normal allel (TA6/TA6), heterozigot (TA6/TA7), anormal homozigot allellin (TA7/TA7) DNA dizi analiz sistemindeki görünümü şekilde verildi (Şekil 9).

Sekanslama Reaksiyonu Ürünleri Saflaştırılması:

Reaksiyon ürünleri Sephadex içeren filtreli tüpler kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. 750 µl Sephadex filtreli tüplere aktarıldı ve 600 g hızda 2 dk santrifüj edildi. PZR ürünleri santrifüj edilmiş Sephadex üzerine aktarıldı ve 600 g hızda 2 dk santrifüj edilerek saflaştırma işlemi tamamlandı.

Örneklerin Kapiller Jel Elektroforez Cihazında Yürütülmesi: Saflaştırılmış Sekans PZR ürünleri 96 kuyucuklu plate içine eklendi ve ABİ 3130 Genetic Analyser cihazında yürütülerek sekans işlemi tamamlandı. Örnekler SeqScape programı kullanılarak promoter bölgede bulunan TATA kutusundaki TA dizi tekrar sayısı analiz edildi (Tablo 3). UGT1A1 genine ait promoter bölgedeki homozigot normal allel (TA6/TA6), heterozigot (TA6/TA7), anormal homozigot allellin (TA7/TA7) DNA dizi analiz sistemindeki görünümü şekilde verildi (Şekil 9).

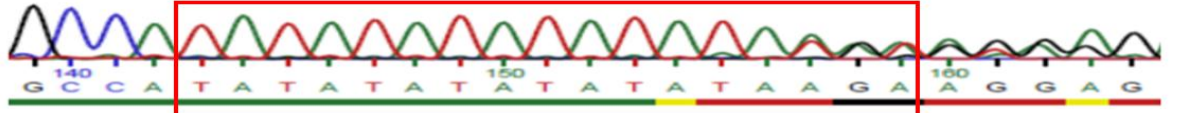
```
aacttggttcactacatagtcgctccttcttctctctggtaacacttggtggtctgtggaaataactaat
ttaatggatcctgagggttctggaagtactttgctgtggttcactcaagaatgtgatttgagtatgaaat
tccagccagttcaactggtggttgcctattaagaaacctaataaaagctccaccttctttatctctgaaa
gtgaactccctgctacctttgtggactgacagctttttatagtcacgtgacacagtcaaacattaact
tgggtgatcgtattgggtttttggcaatataatataatataatataatataatataatataatataatata
aaaggcgccATGGCTGTGGAGTCCCAGGGCGGACGCCCACTTGTCTGGGCCTGCTGCTGTGTGTGCT
GGGCCAGTGGTGTCCCAGTGGGAAGATACTGTTGATCCCAGTGGATGGCAGCCACTGGCTGAGCA
TGCTTGGGGCCATCCAGCAGCTGCAGCAGAGGGGACATGAAATAGTTGTCTAGCACCTGACGCCCTCG
TTGTACATCAGAGACGGAGCATTTTACACCTTGAAGACGTACCCTGTGCCATTCCAAAGGGAGGATGT
GAAAGAGTCTTTTGTAGTCTCGGGCATAATGTTTTTGAAGAATGATTCTTCTGCAGCGTGTGATCA
AAACATAACAAGAAAATAAAAAAGGACTCTGCTATGCTTTTGTCTGGCTGTTCCACTTACTGCACAAC
AAGGAGCTCATGGCCTCCCTGGCAGAAAGCAGCTTTGATGTCATGCTGACGGACCCTTTCCTTCCTTG
CAGCCCCATCGTGGCCCAGTACCTGTCTCTGCCCACTGTATTCTTCTTGATGCACTGCCATGCAGCC
TGGAATTTGAGGCTACCCAGTGCCCCAACCCATTCTCCTACGTGCCCAGGCCTCTCTCCTCATTCA
GATCACATGACCTTCCCTGCAGCGGGTGAAGAACATGCTCATTGCCCTTTTTCACAGAAGCTTCTGTGCGA
CGTGGTTTTATTCCCCGTATGCAACCCTTGCTCAGAAATTCCTTCAGAGAGAGGTGACTGTCCAGGACC
TATTGAGCTCTGCATCTGTCTGGCTGTTTAGAAGTGACTTTGTGAAGGATTACCCTAGGCCCATCATG
CCCAATATGGTTTTTTGTTGGTGAATCAACTGCCTTACCAAAAATCCACTATCCCAGgtgtgtattgg
agtgggacttttacatgcgtatattctttcagatgtattactttggatcgattaactagccccagata
tatgctgagcaagcattctgagataatttaa
```

Şekil 8. UGT1A1 Promoter Bölgeye Ait Gen Dizisi

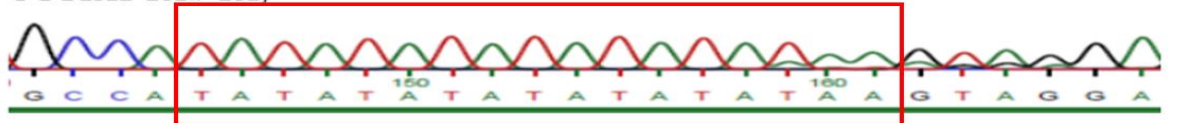
UGT1A1 TA6/ TA6



UGT1A1 TA6/ TA7



UGT1A1 TA7/ TA7



Şekil 9. UGT1A1 geni promoter bölge genotiplerinin DNA dizi analiz sistemindeki görünümü

Kan örneklerinin toplanması:

Ciddi hiperbilirübinemili bebeklerden hastaneye kabüllerinde, fizyolojik sarılıklı yenidoğanlardan 4-5. gün hipotiroidi taraması için polikliniğe geldiklerinde iki adet EDTA'lı tüpe 2 ml venöz kan örneği alındı. Her merkezde kan örneği 6000 rpm'de 10 dk santrifuj edildikten sonra ayrılan plazma örnekleri ependorf tüpüne aktarıldı ve analiz aşamasına kadar -80 derecede korundu. Kan örnekleri çalışmaya katılan merkezlerden kuru buz içinde Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi'ne ulaştırıldı.

İstatistiki Değerlendirme:

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software. Armonk, NY: IBM Corp) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma; kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Bağımsız grup incelemelerinde Mann Whitney U testi ve Kruskal Wallis Varyans Analizi (post hoc: Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıkların incelenmesinde ise Ki-kare analizi kullanıldı. Sayısal veriler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Bağımlı değişken olan ciddi hiperbilirübinemi durumu üzerinde etkili olan risk faktörlerinin belirlenmesinde Lojistik Regresyon analizi kullanıldı. MikroRNA ekspresyonlarında normalizasyon problemini ortadan kaldırmak için normalizatör olarak miR-16-5p kullanıldı. Hesaplanan relatif kantitatif değerlerin iki kat ve üstündeki değerler ekspresyon artışı, 0,5 kat ve altındaki değerler ekspresyonda azalma olarak kabul edildi. Analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Etik kurul onayı ve maddi destek: Ailelere çalışma ile ilgili yazılı ve sözlü bilgi verildikten sonra, çalışmaya katılmayı kabul eden ebeveynlerden yazılı onam, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Etik Kurulundan 25/10/2019/020/60116787 tarih ve numaralı onay, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu'ndan maddi destek alındı (24.12.2019/2019TIPF022).

BULGULAR

Demografik özellikler:

Çalışmaya, Ocak 2020-Ağustos 2020 tarihleri arasında, sTB \geq 20 mg/dl olan ciddi hiperbilirübinemili 115 bebek (Sarılık grubu) ve sTB<13 mg/dl olan 30 sağlıklı bebek (Kontrol grubu) olmak üzere 145 yenidoğan alındı. Kontrol grubundaki yenidoğanların tümü Türkiye Cumhuriyeti (TC) vatandaşı iken; sarılık grubundaki hastaların %92,1'i TC vatandaşı, %7,9'u Suriyeli idi. Kontrol ve sarılık gruplarının ortalama \pm SD olarak gebelik yaşları sırasıyla 38,1 \pm 1,1 ve 37,9 \pm 1,5 hafta, doğum ağırlıkları 3139 \pm 338 ve 3126 \pm 493 gr olup istatistiki olarak farklılık saptanmadı (p>0,05). Kontrol ve sarılık gruplarının sırasıyla %10'u ve %25,2'si geç preterm, %63,3'ü ve %44,3'ü erkek olup; prematürel ve cinsiyet oranları farksızdı (p>0,05). Sezaryen doğum oranı kontrol ve sarılık gruplarında %76,6 ve %44,3 olup; kontrol grubunda sezaryen doğum oranı istatistiksel olarak anlamlı yüksekti (p=0,002); sarılık alt grupları arasında farklılık saptanmadı (p=0,457). Kardeşinde fototerapi öyküsü bakımından gruplar arasında fark saptanmazken (p>0,05); akraba evliliği sarılık grubunda (%29,9 ve %3,3) (p¹=0,01) ve Grup3'te (Grup1/2/3'te sırasıyla %22,3, %21,9 ve %56,2) belirgin yüksekti (p=0,017) (Tablo 3).

Etyolojik değerlendirme:

Ciddi hiperbilirübinemi nedeniyle hastane yatışlarının önde gelen nedenleri ABO uyumsuzluğu (%37,4), immün hemolitik hastalık (%20,9), prematürite (%25,2), patolojik kilo kaybı (%17,3), enzim eksiklikleri (%14,7), sepsis (%10,4), kültür (+) üriner infeksiyon (%9,5), hipotiroidi (%6,1), polisitemi (%3,4), Crigler Najjar tip 2 (%0,9) olarak saptanırken; %0,9'unda neden bulunamadı. İmmün hemolitik sarılığın en sık nedeni ABO uyumsuzluğu (%10,4); kalıtsal enzim eksikliğinin en sık nedeni G6PD eksikliği (%12,7) idi. Sarılık grubunda %31,3 olguda promoter polimorfizmi (heterozigot: %23,4, homozigot: %7,4) saptandı. Grup1, 2, 3'te sırasıyla TA6/7 polimorfizmi %20,9, %25, %31,2, TA7/7 polimorfizmi %5,9, %9,5, %6,3 sıklıkta olup; gruplar arasında fark saptanmadı (p=0,931) (Tablo 4).

İkterojenik faktörlerin değerlendirmesi:

Sarılık grubunda ABO, Rh ve subgrup uyumsuzluğu sıklığı sırasıyla %37,4, %7,8 ve

%14,7, direkt Coombs (DC) pozitifliği %20 idi. ABO ve Rh uyumsuzluğu hastalarında DC pozitifliği sırasıyla %13,8 ve %4,3 idi. Sarılık grubunda %12,2 hastada G6PD eksikliği, %1,7 hastada pirüvat kinaz eksikliği, %0,9 oranında G6PD+PK eksikliği, %13 hastada MCHC yüksekliği saptandı. Sarılık alt gruplarında Rh uyumsuzluğu ve G6PD eksikliği sıklığı bakımından fark saptanmazken; ABO uyumsuzluğu (p=0.003), subgrup uyumsuzluğu (p=0.039) ve sepsis (p=0.015) sıklığı istatistiki olarak anlamlı farklı bulundu. ABO uyumsuzluğu Grup 2’de, subgrup uyumsuzluğu ve sepsis Grup 3’te belirgin yüksekti (Tablo 5).

Tablo 3. Kontrol, Sarılık ve Sarılık altgruplarının özellikleri

Özellikler	Kontrol Grubu n:30	Sarılık Grubu sTB ≥20 n:115	Grup1 20 ≤ sTB ≤25 n:67 (% 58,3)	Grup2 25 < sTB ≤30 n:32 (% 27,8)	Grup3 sTB>30 n:16 (% 13,9)	p
Uyruk, n (%) TC/Suriyeli	30/0 (100/0)	106/9 (92.1/7,9)	63/4 (94/6)	27/5 (84.4/15,6)	16/0 (100/0)	^b P ¹ : 0,204 ^b P ² : 0,112
^a Gebelik yaşı, hafta	38,1±1,16	37,9±1,55	37,9±1,58	37,7±1,67	38,01±1,18	^d P ¹ : 0,117 ^c P ² : 0,641
^a Doğum ağırlığı, gr	3139±338	3126,1±492,9	3112±469	3181±604,5	3070±334,1	^d P ¹ : 0,946 ^c P ² : 0,755
Cinsiyet, n (%) Kız/Erkek	11/19 (37/63)	64/51 (55,6/44,4)	33/34 (49,3/50,7)	22/10 (68,8/31,2)	7/9 (43,8/56,2)	^b P ¹ : 0,064 ^b P ² : 0,188
Doğum şekli (C/S), n (%)	23 (76,6)	51 (44,3)	33 (49,3)	12 (37,5)	6 (37,5)	^b P ¹ : 0,002* ^b P ² : 0,457
Term/ Preterm, n (%)	27/3 (90/10)	86/29 (74,8/25,2)	49/18 (73,1/26,9)	22/10 (68,8/31,3)	15/1 (93,4/6,6)	^b P ¹ : 0,730 ^b P ² : 0,152
Kardeşte fototerapi öyküsü, n (%)	4 (13,3)	24 (20,9)	11 (16,4)	9 (28,1)	4 (25)	^b P ¹ : 0,477 ^b P ² : 0,104
^a Hastaneye başvuru, gün, n (%)	-	4,9±3,4	5,1±3,5	5,1±3,6	4,2±2,3	^b P ¹ : - ^b P ² : 0,637
İlk 24 saatte sarılık, n (%)	0 (0)	6 (5,2)	2 (2,9)	2 (6,3)	2 (12,5)	^b P ¹ : 0,201 ^b P ² : 0,195
Kilo kaybı ≥%10, n (%)	0 (0)	20 (17,4)	12 (17,9)	6 (18,8)	2 (12,5)	^b P ¹ : 0,012 ^b P ² : 0,993
^a Anne yaşı, yıl	28,3±5,7	29,4±6,1	29,0±5,1	30,6±7,2	28,9±7,8	^d P ¹ : 0,485 ^c P ² : 0,511
Akraba evliliği, n (%)	1 (3,3)	31 (29,9)	15 (22,3)	7 (21,9)	9 (56,2)	^b P ¹ : 0,01* ^b P ² : 0,017*
Beslenme, n (%) Anne Sütü (AS) Formula (F) AS+ F	30 (100) 0 0	91 (79,1) 2 (1,8) 22 (19,1)	53 (79,1) 0 (0) 14 (20,9)	26 (81,2) 1 (3,1) 5 (15,7)	12 (75) 1 (6,3) 3 (18,7)	^b P ¹ : - ^b P ² : -

^p¹: Sarılık/kontrol grubu arası, ^p²: Sarılık alt grupları arası, *p<0,05

^a: Ortalama ± standart dağılım, ^b: Ki kare test, ^c:Kruskal-Wallis Test, ^d: Mann Whitney U Test

Tablo 4. Ciddi hiperbilirübinemili yenidoğanlarda etyoloji

Etyoloji	n (%)	Etyoloji	n (%)
Kan grubu uyumsuzlukları	56 (48,6)	Prematürite (<37 hafta)	29 (25,2)
ABO uyumsuzluğu	43 (37,4)	Başvuruda \geq%10 kilo kaybı	20 (17,3)
Rh uyumsuzluğu	17 (14,8)	Enzim eksikliği	17 (14,8)
Subgrup uyumsuzluğu	17 (14,8)	G6PD eksikliği	14/98 (12,2)
İmmün hemolitik sarılık	24 (20,9)	Pirüvat kinaz eksikliği	2/68 (1,7)
ABO uyumsuzluğu	12 (10,4)	G6PD+PK eksikliği	1/68 (0,9)
Rh uyumsuzluğu	2 (1,7)	MCHC\geq36, n (%)	15 (13)
Subgrup uyumsuzluğu	3 (2,6)	Sepsis	12 (10,4)
ABO+subgrup uyumsuz.	4 (3,5)	Üriner infeksiyon	12 (10,4)
Rh+subgrup uyumsuz.	2 (1,7)	Hipotiroidi	7 (6,1)
ABO+Rh+subgrup uyumsuz.	1 (0,9)	Polisitemi	4 (3,4)
Promoter polimorfizmi	36 (31,3)	Sefal hematom	2 (1,7)
Heterozigot (TA6/7)	27 (23,4)	Crigler Najar Tip 2	1 (0,9)
Homozigot (TA7/7)	9 (7,9)	Bilinmeyen	1 (0,9)

G6PD: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz PK: Pirüvat kinaz

Tablo 5. Ciddi hiperbilirübinemili yenidoğanlarda ikterojenik faktörlerin değerlendirilmesi

	Sarılık Grubu n:115	Grup 1 n: 67	Grup 2 n:32	Grup 3 n:16	^b p
ABO uyumsuzluğu, n (%)	43 (37,4)	20 (29,9)	17 (53,1)	6 (37,5)	0,003*
• DC (+)	16 (13,9)	7 (10,5)	8 (25)	1 (6,2)	
• DC (-)	27 (23,5)	13 (19,4)	9 (28,1)	5(31,3)	
Rh uyumsuzluğu, n (%)	9 (7,8)	2 (2,9)	5 (15,6)	2 (12,5)	0,139
• DC (+)	5 (4,3)	2 (2,9)	1 (3,1)	2 (12,5)	
• DC (-)	4 (3,5)	0	4 (12,5)	0	
Subgrup uyumsuzluğu, n (%)	17 (14,7)	7 (10,4)	6 (18,7)	4 (25)	0,039*
Promoter polimorfizmi, n (%)	36 (31,3)	18 (26,8)	12 (37,5)	6 (37,5)	0,935
• TA 6/7	27 (23,4)	14 (20,9)	8 (25)	5 (31,2)	
• TA 7/7	9 (7,9)	4 (5,9)	4 (12,5)	1 (6,3)	
G6PD eksikliği, n (%)	15 (13,0)	8 (11,9)	4 (12,5)	3 (18,8)	0,506
Pirüvat kinaz eksikliği, n (%)	3 (2,6)	2 (2,9)	0	1 (6,3)	-
Crigler Najar Tip 2, n (%)	1 (0,9)	1 (1,5)	0	0	-
MCHC\geq36, n (%)	15 (13)	8 (11,9)	5 (15,6)	2 (12,5)	0,762
Sepsis, n (%)	12 (10,4)	3 (4,4)	4 (12,5)	5 (31,3)	0,015*
Üriner infeksiyon, n (%)	12 (10,4)	7 (10,4)	4 (12,5)	1 (6,3)	0,065

G6PD: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz, PK: Pirüvat kinaz, MCHC: Ortalama Eritrosit Hemogloblin Konsantrasyonu ^b: Ki kare test , *p<0,05

Laboratuvar bulguları:

Hastaneye başvuruda sTB düzeyleri ortalama (dağılım) olarak sarılık grubunda $24,8 \pm 4,8$ (20-46) mg/dl, kontrol grubunda $8,4 \pm 3,1$ (0,9-12,7) mg/dl olup; sarılık grubunda belirgin yüksekti ($p < 0,001$). Sarılık grubunda ortalama serum albümin düzeyi $3,6 \pm 0,3$ mg/dl, sTB/Alb oranı $6,1 \pm 1,5$, sTB/Alb $> 6,8$ hastaların sıklığı %42,9, retikülosit sayısı %2,6 olup; sarılık alt gruplarında albümin düzeyleri açısından istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanmazken ($p = 0,676$); sarılık şiddeti arttıkça grup 1'den grup 3'e doğru sTB/Alb oranının $6,1 \pm 0,7$ 'den $7,5 \pm 0,9$ 'a ve $9,3 \pm 1,5$ 'e arttığı ($p < 0,001$); sTB/Alb $> 6,8$ olan hastaların sıklığının %7,8'den %20,9 ve %13,9'a arttığı ($p < 0,001$), retikülosit sayısının $2,1 \pm 2,6$ 'den $3,3 \pm 2,4$ ve $3,3 \pm 3,8$ 'e arttığı ($p < 0,001$) görüldü. Sarılık grubundaki hastalarda ortalama Hb: $16,6 \pm 3,22$ gr/dl, Htk: %50,1 \pm 9,5, lökosit: 12200 ± 4355 /mm³, MCHC: $34,15 \pm 1,45$ gr/dl, T4: $1,56 \pm 0,69$ ng/dl, TSH: $6,98 \pm 6,75$ mU/L olup; sarılık alt gruplarında istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0,05$). Sarılık grubunda CRP pozitifliği %12,1, I/T nötrofil oranı $> 0,20$ sıklığı %8,7 olup; I/T nötrofil oranı sarılık şiddeti arttıkça %2,9'dan %12,5 ve %25'e arttı ($p = 0,02$) (Tablo 6).

Tedavilerin değerlendirilmesi:

Sarılık grubundaki hastaların hepsine fototerapi, %23,4'üne IVIG ya da kan değişimi uygulandı. Hastaların %13,9'una fototerapi+IVIG, %13,9'una fototerapi+kan değişimi, %4,3'üne fototerapi+IVIG+kan değişimi, %1,7'sine fototerapi+fenobarbital uygulandı. Fototerapi+IVIG+kan değişimi uygulanan hastaların 5'inde DC(+) ABO uyuşmazlığı olup; sTB değerleri 26,1, 26,4, 29,6, 30,2 ve 41,1 mg/dL idi. Fenobarbital tedavisi uygulanan iki hastadan biri Crigler Najjar tip 2 tanısı; diğeri (sTB:46 mg/dL) konvülziyon geçirmesi nedeniyle fenobarbital aldı (Tablo 7).

Tablo 6. Ciddi hiperbilirübinemili yenidoğanlarda laboratuvar bulguları

	Sarılık Grubu (n:115)	Grup 1 (n: 67)	Grup 2 (n:32)	Grup 3 (n:16)	P
^a sTB, mg/dL	24,8 ±4,82	21,6 ±1,32	26,7 ±1,36	33,9 ±4,87	^c <0,001*
^a Albümin, g/dL	3,60 ±0,35	3,6 ±0,35	3,57 ±0,38	3,66 ±0,25	^c 0,676
^a sTB/Alb oranı, (oran)	6,09 ±1,47	6,08 ±0,69	7,5±0,94	9,31 ±1,59	^b <0,001*
sTB/Alb>6,8, n (%)	49 (42,9)	9 (7,8)	24 (20,9)	16 (13,9)	^b <0,001*
Direkt Coombs pozitifliği, n (%)	23 (20)	9 (13,4)	11 (34,3)	3 (18,8)	^b 0,73
^a Retikülosit, %	2,6±2,8	2,1 ±2,6	3,3 ±2,4	3,3 ±3,8	^c 0,001*
İ/T>0,20, n (%)	10 (8,7)	2 (2,9)	4 (12,5)	4 (25)	^b 0,02*
CRP pozitifliği, n (%)	14 (12,1)	7 (10,4)	5 (15,6)	2 (12,5)	^b 0,126
^a Hemoglobin, g/dL	16,6 ±3,22	17,1±3,02	15,8 ±3,4	16,1 ±2,9	^c 0,234
^a Hematokrit, %	50,1 ±9,5	51,6 ±8,9	47,6 ±10,5	48,8 ±9,5	^c 0,154
^a Lökosit sayısı, mm ³	12200 ±4355	11862 ±3716	11959 ±4447	14107±6162	^c 0,664
^a MCHC, g/dL	34,1 ±1,4	34,5 ±1,4	34,7 ±1,4	34,2 ±1,4	^c 0,546
^a sT4, ng/dL	1,5±0,6	1,6 ±0,8	1,5 ±0,3	1,3 ±0,38	^c 0,55
^a TSH, mU/L	6,9 ±6,7	8,1 ±7,7	6,0 ±5,2	3,9±3,0	^c 0,65

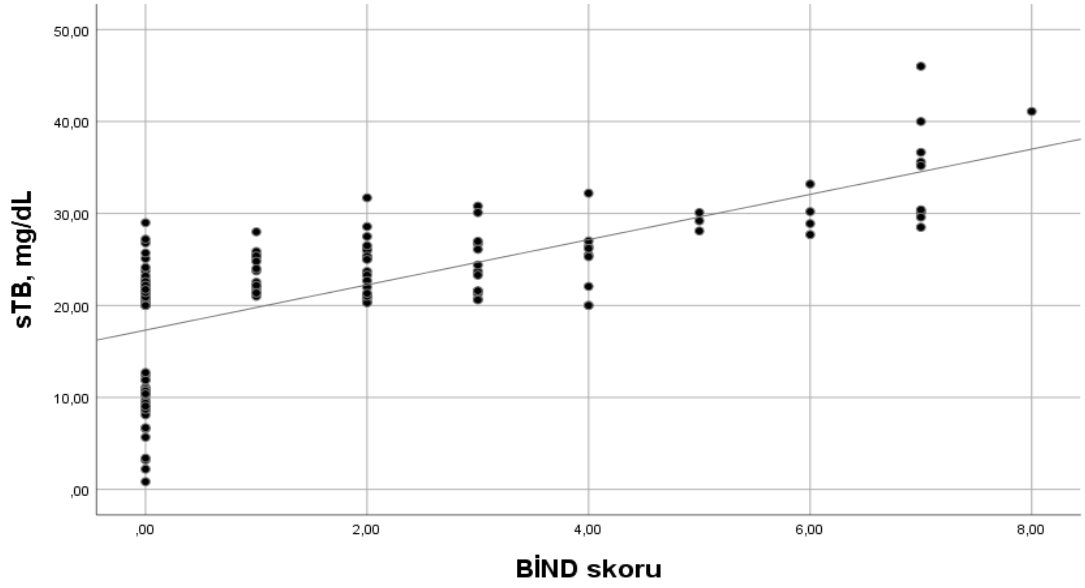
^a:Ortalama±standart dağılım, ^b: Ki kare test ^c: Kruskal-Wallis test *p<0,05

Tablo 7- Tedavi

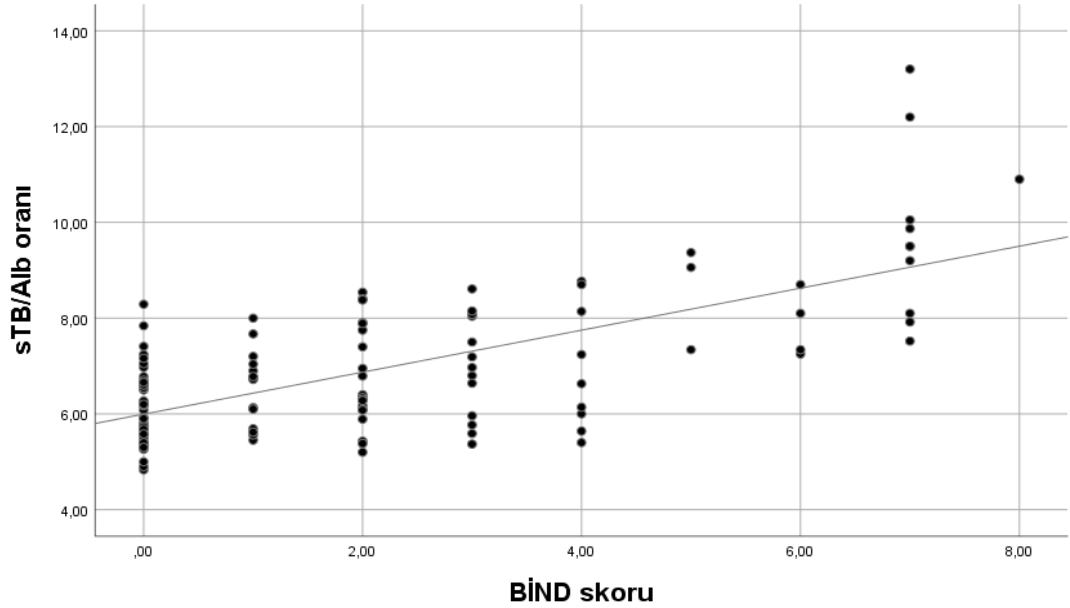
	Sarılık Grubu n:115
Fototerapi, n (%)	115 (100)
İntravenöz immünglobulin, n (%)	21 (18,3)
Kan Değişimi, n (%)	21 (18,3)
Fenobarbital, n (%)	2 (1,73)

Hastaların BİND skoru açısından değerlendirilmesi:

Sarılıklı hastalarda sTB düzeyi ile BİND skoru (r:0,712) (p<0,001) (Şekil 10), sTB/Alb oranı ile BİND skoru (r:0,564) (p<0,001) arasında istatistiki açıdan anlamlı pozitif korelasyon saptandı (Şekil 11).



Şekil 10. sTB düzeyi BİND skoru ilişkisi (Dot plot, spearman korelasyon testi)



Şekil 11. sTB/Alb oranı BİND skoru ilişkisi (Dot plot, spearman korelasyon testi)

BİND skorlamasına göre sarılık grubundaki bebeklerin %34,8'i normal, %40,9'u hafif, %14,8'i orta, %9,5'i ağır ABE olarak değerlendirildi. Grup1'deki hastaların %52,2'si normal, %43,2'si hafif, %4,6'si orta ABE olarak, Grup 3'de %12,5'i hafif, %31,3'ü orta, %56,2'si ağır ABE olarak değerlendirildi. Sarılık alt gruplarında BİND skoru açısından istatistiki olarak anlamlı farklılık saptandı

($p < 0,001$). Sarılık şiddeti arttıkça ağır ABE sıklığının, Grup 1’de %0 iken, Grup 2’de %6,3’e, Grup 3’te %56,2’ye çıktığı görüldü (Tablo 8).

Sarılık grubundaki hastaların %56’sında mental durum değişikliği, %40,9’unda kas tonusunda, %31,2’sinde ağlama paterninde etkilenme gözlemlendi. Mental durum değişikliği gelişenlerde en sık emmede azalma/uyuklama (%36,5); kas tonusunda en sık kas tonusunda hafif azalma (%25,2); ağlama paterninde en sık tiz sesli/seyrekle ağlama (%14,8) gözlemlendi (Tablo 9-1,2,3).

Tablo 8. Ciddi hiperbilirubinemi hastaların BİND skoru açısından değerlendirilmesi

BİND Skoru	Sarılık Grubu n:115	Grup1 n:67	Grup2 n:32	Grup3 n:16	P
Normal (0 puan), n (%)	40 (34,8)	35 (52,2)	5 (15,6)	0	
Hafif ABE (1-3 puan), n (%)	47 (40,9)	29 (43,2)	16 (50)	2 (12,5)	
Orta ABE (4-6 puan), n (%)	17 (14,8)	3 (4,6)	9 (28,1)	5 (31,3)	^b <0,001*
Ağır ABE (7-9 puan), n (%)	11 (9,5)	0	2 (6,3)	9 (56,2)	

^b: Ki kare test , * $p < 0,05$

Tablo 9.1 Sarılık Grubundaki hastaların klinik bulguları, mental durum

	MENTAL DURUM			
	Normal (0 puan)	Emmede azalma Uyuklama (1 puan)	Letarji İrritabilite (2 puan)	Konvülsiyon Apne (3 puan)
Grup 1 , n:67	43 (37,4)	22(19,1)	2 (1,7)	0
Grup 2 , n:32	6 (5,2)	17(14,8)	9 (7,9)	0
Grup 3 , n:16	1 (0,9)	3 (2,6)	10 (8,7)	2 (1,7)
	50 (43,5)	42 (36,5)	21(18,3)	2 (1,7)
Sarılık Grubu n:115	50 (43,5)		65 (56,5)	

Tablo 9.2. Sarılık Grubundaki hastaların klinik bulguları, kas tonusu

	KAS TONUSU			
	Normal (0 puan)	Hafif azalmış (1 puan)	Hipotoni/hipertoni (2 puan)	Retrokolis, Opustotonus Bisiklet hareketi Ağır hipotoni (3 puan)
Grup 1 , n:67	53 (46)	11 (9,6)	2 (1,7)	1 (0,9)
Grup 2 , n:32	14 (12,2)	15 (13)	2 (1,7)	1 (0,9)
Grup 3 , n:16	1 (0,9)	3 (2,6)	7 (6,2)	5 (4,3)
	68 (59,1)	29 (25,2)	11 (9,6)	7 (6,1)
Sarılık Grubu n:115	68 (59,1)		47 (40,9)	

Tablo 9.3. Sarılık Grubundaki hastaların klinik bulguları, ağlama paterni

	AĞLAMA PATERNİ			
	Normal (0 puan)	Yüksek Sesli (1 puan)	Tiz sesli Seyrek ağlama (2 puan)	Durdurulamayan Sadece uyararla (3 puan)
Grup 1 , n:67	59 (51,3)	5 (4,3)	2 (1,7)	1 (0,9)
Grup 2 , n:32	18 (15,8)	5 (4,3)	6 (5,2)	3 (2,6)
Grup 3 , n:16	2 (1,7)	2 (1,7)	9 (7,9)	3 (2,6)
	79 (68,8)	12 (10,3)	17 (14,8)	7 (6,1)
Sarılık Grubu n:115	79 (68,8)	36 olgu (31,2)		

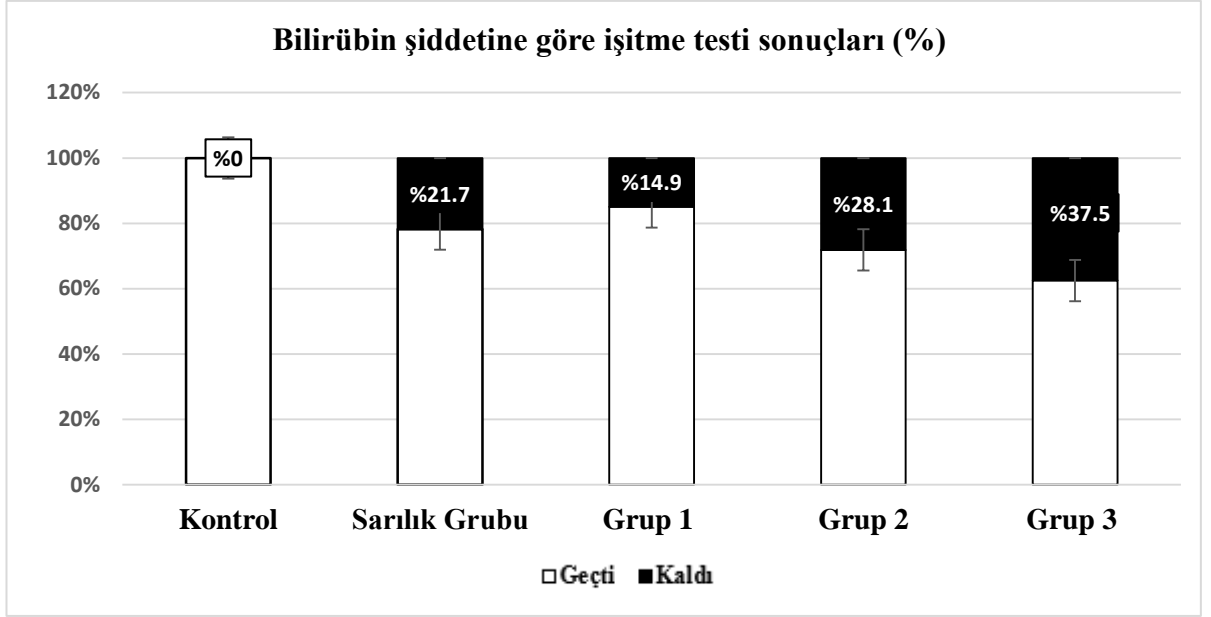
İşitme testlerinin değerlendirilmesi:

İşitme testi ortalama olarak kontrol ve sarılık gruplarında $4,2\pm 3,8$ ve $9,4\pm 4,1$ günde yapıldı ($p<0,001$). Kontrol grubundaki bebeklerin tamamı, sarılık grubundaki hastaların 78,3'ü "sağlıklı" olarak değerlendirilirken, sarılık grubundaki hastaların %21,7'si işitme testinden "kaldı". Sarılık şiddeti arttıkça işitme testinden kalanların oranı artmasına rağmen, Grup 1 (%14,9), Grup 2 (%28,1), Grup 3 (%37,5) arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p:0,092$) (Tablo10).

Tablo 10. Sarılık Grubunda işitme testi sonuçları

	Kontrol n:30	Sarılık n:115	Grup1 n:67	Grup2 n:32	Grup3 n:16	P
Geçti, n (%)	30 (100)	90 (78,3)	57 (85,1)	23 (71,9)	10 (62,5)	
Kaldı, n (%)	-	25 (21,7)	10 (14,9)	9 (28,1)	6 (37,5)	
• Sağ kulak	-	8 (6,95)	4 (5,9)	3 (9,35)	1 (6,3)	^b p (a):0,092
• Sol kulak	-	7 (6,08)	3 (4,5)	3 (9,35)	1 (6,3)	
• Sağ+Sol kulak	-	10 (8,69)	3 (4,5)	3 (9,35)	4 (24,9)	
^a İşitme testi, PN gün	$4,23\pm 1,2$	$9,42\pm 4,1$	$9,71\pm 4,8$	$9,46\pm 4,2$	$8,12\pm 3,8$	^d p (k-s):<0,001*
						^c p(a):0,543

PN: Postnatal gün, ^a: Ortalama \pm standart dağılım, ^b: Ki kare test, ^c: Kruskal-Wallis test, ^d: Mann Whitney U Test, P (k-s): kontrol-sarılık, p (a): sarılık altgrupları arası, * $p<0,05$



Şekil 12. Kontrol, Sarılık ve Sarılık alt gruplarında işitme testi sonuçları

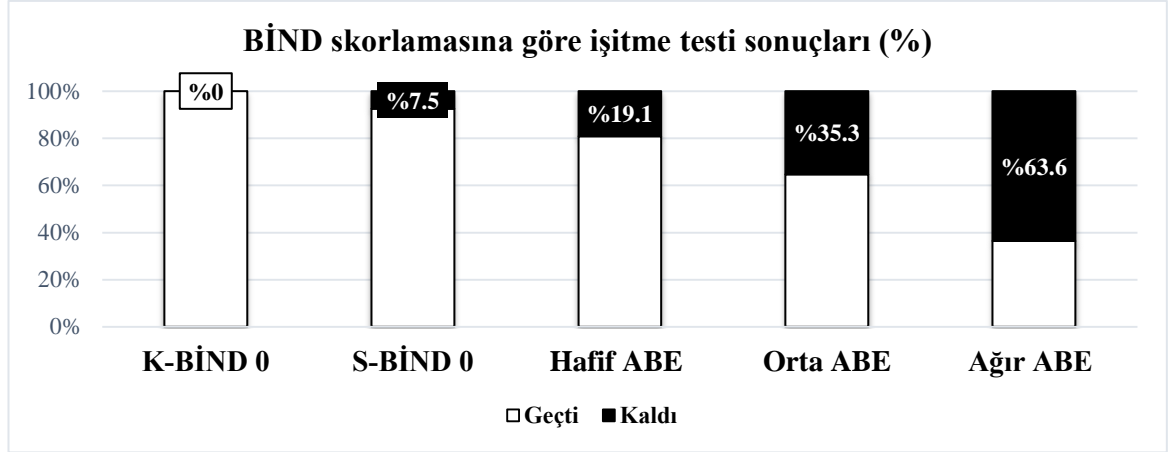
İşitme testi sonuçları BİND skoruna göre değerlendirildiğinde, sarılık grubunda BİND skoru normal, Hafif ABE, Orta ABE ve Ağır ABE olanlarda işitme testinden geçenlerin sıklığı sırasıyla %92,5, %80,9, %64,7 ve %36,7 iken; işitme testinden kalanların sıklığı %7,5, %19,1, %35,3, %63,6 idi. BİND skoruna göre ABE şiddeti arttıkça işitme testinden kalanların sıklığı belirgin arttı ($p<0.001$) (Tablo 11).

Tablo 11. Sarılık Grubunda BİND skoruna göre işitme testi sonuçları

	BİND skoru 0 puan n:40	BİND skoru 1-3 puan n:47	BİND skoru 4-6 puan n:17	BİND skoru 7-9 puan n:11	p
Geçti, n (%)	37 (92,5)	38 (80,9)	11 (64,7)	4 (36,7)	
Kaldı, n (%)	3 (7,5)	9 (19,1)	6 (35,3)	7 (63,6)	$b<0,001^*$
• Sağ kulak	1 (2,5)	4 (8,5)	2 (11,8)	1 (9,1)	
• Sol kulak	1 (2,5)	2 (4,3)	3 (17,6)	1 (9,1)	
• Sağ+Sol kulak	1 (2,5)	3 (6,3)	1 (5,9)	5 (45,4)	

^b: Ki kare test, * $p<0,05$

Sarılık grubunda kan değişimi yapılan ve yapılmayan hastalar incelendiğinde kan değişimi yapılanlarda sTB ($32,6\pm 6,0$ ve $23,5\pm 3,1$ mg/dL, $p<0,001$), sTB/Alb oranı ($9,19\pm 1,8$ ve $6,5\pm 1,03$, $p<0,001$), sTB/Alb>6,8 olması (%93,8 ve %34,3, $p<0,001$), retikülosit sayısı (%) ($4,1\pm 3,9$ ve $2,4\pm 2,5$, $p=0,023$), BİND skoru ≥ 4 olma (%81,3 ve %15,1, $p<0,001$), işitme testinden kalma (%43,7 ve %18,1, $p=0,044$) sıklığı istatistiki olarak anlamlı yüksekti (Tablo 12).



Şekil 13.BİND skoruna göre işitme testinden kalanlar. K-BİND 0; Kontrol grubunda BİND skoru 0 puan, S- BİND 0; Sarılık grubunda BİND skoru 0 puan

Tablo 12. Kan değişimi yapılan ve yapılmayan hastaların karşılaştırması

	Sarılık grubu		p
	Kan değişimi yapılmayan (n:99)	Kan değişimi yapılan (n: 16)	
^a Gebelik yaşı, hafta	37,6±1,47	38,5±1,75	^d 0,173
^a Doğum ağırlığı, gr	3100±477,1	3285±572	^d 0,383
Erkek, n (%)	43 (43,4)	8 (50)	^b 0,826
C/S, n (%)	44 (44,4)	7 (43,7)	^b 1,000
^a Anne yaşı, yıl	29,5±6,06	29,1±7,1	^d 0,997
Başvuruda ≥%10 kilo kaybı, n(%)	17 (17,2)	4 (%25)	^b 0,488
^a sTB, mg/dL	23,5±3,1	32,6±6,0	^d <0,0001*
^a Albümin, g/dL	3,06±0,34	3,5±0,4	^d 0,719
^a sTB/Alb oranı	6,5±1,03	9,19±1,8	^b <0,001*
sTB/Alb oranı>6,8, n (%)	35 (34,3)	15 (93,8)	^b <0,001*
Direkt Coombs (+), n (%)	17(17,1)	6(37,5)	^b 0,087
ABO uyumsuzluğu, n (%)	34 (34,3)	9 (56,2)	^b 0,161
ABO Coombs (+), n (%)	11 (11,1)	5(31,2)	^b 0,257
Rh uyumsuzluğu, n (%)	8 (8,1)	1 (6,25)	^b 0,636
Rh Coombs (+), n (%)	4 (4)	1 (6,3)	^b 0,556
TA _{6/7} - TA _{7/7} , n (%)	24-8 (28,6-9,5)	3-1 (18,8-6,3)	^b 0,592
^a Retikülosit %	2,4±2,51	4,1±3,9	^d 0,023*
^a Hemoglobin, g/dL	16,8±3,1	15,4±3,3	^d 0,129
Anemi, n %	9 (9,1)	2 (12,5)	^d 0,61
^a Hematokrit, %	50,4±9,4	47,9±10,3	^d 0,348
^a Lökosit sayısı, mm ³	12095±4145	12860±5596	^d 0,865
MCHC≥36 g/dL, n (%)	14 (14,1)	1 (6,3)	^b 0,690
^a TSH, mU/L	7,3±7,0	4,43±3,5	^d 0,059
G6PD eksikliği, n (%)	11 (11,1)	4 (25)	^d 0,107
Pirüvat kinaz eks. n (%)	2 (2)	1 (6,3)	^d 0,057
Sepsis, n (%)	8 (8,1)	4 (25)	^b 0,063
Üriner infeksiyon, n (%)	12 (13,4)	0 (-)	^b 0,205
BİND skoru ≥4, n (%)	15 (15,1)	13 (81,3)	^b <0,0001
İşitmeden kalma, n (%)	18 (18,1)	7 (43,7)	^b 0,044*

^a: Ortalama ± standart dağılım, ^b: Ki kare test, ^d: Mann Whitney U Test * p<0,05

Sarılık grubunda ABE gelişen (BİND skoru 1-9) ve gelişmeyen (BİND skoru 0 puan) hastalar incelendiğinde, ABE gelişenlerde sTB (26,29±5,18 ve 22,01±2,16, p<0,001), sTB/Alb (7,37±1,57 ve 6,14±0,81, p<0,001), sTB/Alb>6.8 (%57,3 ve %15, p<0,001), ABO uyuşmazlığı (%45,3 ve %22,5, p=0,027), DC pozitifliği (%25,3 ve %10, p=0,05), sepsis+üriner enfeksiyon varlığı (%25,3 ve %5, p=0,007), işitme testinden kalma (%29,3 ve %7,5, p=0,014) ve kan değişimi gereksinimi (%21,3 ve %0, p=0,002) istatistiki olarak anlamlı yüksekti (Tablo 13).

Tablo 13. Sarılık grubunda ABE gelişen ve gelişmeyen hastaların karşılaştırması

	Sarılık grubu		p
	ABE gelişmeyen (n:40)	ABE gelişen (n:75)	
^a Gebelik yaşı, hafta	38,1±1,69	37,7±1,48	^d 0,277
^a Doğum ağırlığı, gr	3078,13±497,6	3151,73±491,82	^d 0,641
Erkek, n (%)	17 (42,5)	34 (45,3)	^b 0,925
C/S, n (%)	17 (42,5)	34 (45,3)	^b 0,925
^a Anne yaşı, yıl	28,78±5,46	29,83±6,55	^d 0,391
Başvuruda ≥%10 kilo kaybı, n (%)	7 (17,5)	14 (18,7)	^b 0,877
^a sTB, mg/dL	22,01±2,16	26,29±5,18	^d <0,001*
^a Albümin, g/dL	3,62±0,35	3,6±0,35	^d 0,848
^a sTB/Alb oranı (oran)	6,14±0,81	7,37±1,57	^d <0,001*
sTB/Alb oranı>6,8, n (%)	7 (15)	43 (57,3)	^b <0,001*
Direkt Coombs pozitifliği, n (%)	4 (10)	19 (25,3)	^b 0,050*
ABO uyuşmazlığı, n (%)	9 (22,5)	34 (45,3)	^b 0,027*
ABO uyuşmazlığı Coombs (+), n (%)	2 (5)	14 (18,6)	^b 0,446
Rh uyuşmazlığı, n (%)	1 (2,5)	8 (10,7)	^b 0,159
Rh uyuşmazlığı Coombs (+), n (%)	1 (2,5)	4 (5,3)	^b 0,556
TA _{6/7} - TA _{7/7} , n (%)	7-4 (25-14,3)	20-5 (27,5-6,8)	^b 0,541
^a Retikülosit sayısı, %	2,26±2,59	2,91±2,91	^d 0,203
^a Hemoglobin, g/dL	17,09±3	16,38±3,34	^d 0,335
Anemi, n %	3 (7,5)	8 (10,7)	^d 0,12
^a Hematokrit, %	51,56±8,64	49,28±10,03	^d 0,276
^a Lökosit sayısı, mm ³	11682,25±3642,36	12628±4461,1	^d 0,301
MCHC≥36 g/dL, n(%)	6 (15)	9 (12)	^b 0,649
^a TSH, mU/L	6,66±5,97	7,16±7,17	^d 0,787
G6PD eksikliği, n (%)	3 (7,5)	12 (16)	^b 0,413
Pirüvat kinaz eksikliği, n (%)	2 (5)	1 (1,3)	^b 0,466
Sepsis, n (%)	2 (5)	10 (13,3)	^b 0,212
Üriner enfeksiyon, n (%)	1 (3,7)	11 (15,1)	^b 0,172
Sepsis +İYE, n (%)	2 (5)	19 (25,3)	^b 0,007*
İşitme testinden kalma, n (%)	3 (7,5)	22 (29,3)	^b 0,014*
Kan değişimi, n (%)	0 (-)	16 (21,3)	^b 0,002*

^a: Ortalama ± standart dağılım, ^b: Ki kare test, ^d: Mann Whitney U Test * p<0,05

Sarılık Grubu'nda işitme testinden geçen ve kalan hastalar değerlendirildiğinde; işitme testinden kalanlarda sTB (27,06±5,1 ve 24,1±4,3, p<0,001), sTB/Alb (7,69±1,88 ve 6,72±1,27, p<0,001), sTB/Alb>6,8 (%60 ve %38,9, p<0,001), ABO uyumsuzluğu (%60 ve %31,1, p=0,008), G6PD eksikliği (%20 ve %11,1, p=0,014), BİND skoru ≥4 olması (%60 ve %14,4, p<0,001) ve kan değişimi gereksinimi (%28 ve %10, p=0,04) belirgin yüksekti (Tablo 14).

Tablo14. Sarılık Grubu'nda işitme testinden geçen ve kalan hastaların karşılaştırması

	Sarılık Grubu		p
	İşitmeden geçti (n:90)	İşitmeden kaldı (n:25)	
^a Gebelik yaşı, hafta	37,96±1,62	37,42±1,21	^d 0,138
^a Doğum ağırlığı, gr	3113±507	3171±141	^d 0,606
Erkek, n (%)	42 (46,7)	9 (36)	^b 0,342
C/S, n (%)	39 (43,3)	12 (48)	^b 0,678
^a Anne yaşı, yıl	29,6±6,32	28,9±5,75	^d 0,623
Başvuruda ≥%10 kilo kaybı, n (%)	19 (21,1)	2 (8)	^b 0,157
^a sTB, mg/dL	24,1±4,3	27,06±5,1	^d 0,017
^a Albümin, g/dL	3,5±0,65	3,4±0,45	^d 0,545
^a sTB/Alb oranı (oran)	6,72±1,27	7,69±1,88	^d 0,014
sTB/Alb oranı>6,8, n (%)	35 (38,9)	15 (60)	^b 0,049
Direkt Coombs pozitifliği, n (%)	16 (17,8)	7 (28)	^b 0,258
ABO uyumsuzluğu, n (%)	28 (31,1)	15 (60)	^b 0,008
ABO uyumsuzluğu Coombs (+), n (%)	11 (12,2)	5 (20)	^b 0,066
Rh uyumsuzluğu, n (%) (6 (6,7)	3 (12)	^b 0,406
Rh uyumsuzluğu Coombs (+), n (%)	7 (7,8)	2 (8)	^b 0,532
TA ₆₇ - TA ₁₇₇ , n (%)	21-8 (28-10,7)	6-1 (24-4)	^b 0,464
^a Retikülosit, %	2,44±2,5	3,5±3,5	^d 0,068
^a Hemoglobin, g/dL	16,9±3,1	16,38±3,34	^d 0,052
Anemi, n %	8 (8,9)	3 (12)	^d 0,08
^a Hematokrit, %	51,4±9,2	49,4±9,2	^d 0,06
^a Lökosit sayısı, mm ³	12482,25±4632	11518±3455	^d 0,63
MCHC≥36, g/dL	11 (12,2)	4 (16)	^b 0,418
^a TSH, mU/L	7,5±7,2	5,0±3,8	^d 0,141
G6PD eksikliği, n(%)	10 (11,1)	5 (20)	^b 0,014*
Pirüvat kinaz eksikliği, n (%)	3 (3,3)	0	^b -
Sepsis, n (%)	8 (8,9)	4 (16)	^b 0,290
Üriner infeksiyon, n (%)	8 (8,9)	4 (16)	^b 0,488
BİND skoru 7-9, n (%)	4 (4,4)	7 (28)	^b 0,001*
BİND skoru ≥4, n (%)	13 (14,4)	15 (60)	^b <0,001*
Kan değişimi, n (%)	9 (10)	7 (28)	^b 0,04*

^a: Ortalama ± standart dağılım, ^b: Ki kare test, ^d: Mann Whitney U Test * p<0,05

Tekli lojistik regresyon analizine göre

Ciddi hiperbilirubinemi riskini vajinal doğum 4,1 kat, akraba evliliği 10,7 kat, ABO uyuşmazlığı 5,4 kat arttırdı (Tablo 15).

Kan değişimi riskini sTB/Alb oranı 4,7 kat, sTB/Alb $\geq 6,8$ olması 27,4 kat, G6PD eksikliği 1,4 kat, ABO uyuşmazlığı 2,1 kat arttırdı, işitmeden kalma 3.5 kat, BİND ≥ 4 olma 26 kat arttırdı (Tablo 16)

ABE gelişme riskini D.Coombs pozitifliği 3 kat (p:0,049), ABO uyuşmazlığı 2,8 kat (p:0,018), sTB/Alb 2,5 kat, sTB/Alb $\geq 6,8$ olması 6,3 kat (p<0,001), sepsis+üriner enfeksiyon varlığı 6.4 kat, işitmeden kalma 5.1 kat arttırdı (Tablo 17)

İşitme kaybı riskini patolojik kilo kaybı 1,8 kat (p:0,005), ABO uyuşmazlığı 3,3 kat (p:0,005 ve p:0,010), sTB/Alb oranı 1,5 kat (p:0,007), sTB/Alb $\geq 6,8$ olması 2,2 kat (p:0,043), kan değişimi 3.5 kat, BİND ≥ 4 olma 5,8 kat arttırdı (Tablo 18).

Tablo 15. Ciddi hiperbilirubinemiyle ilişkili risk faktörleri: tekli lojistik regresyon analizi

Değişken	OR	%95 CI	p
Cinsiyet (erkek)	0,461	0,2-1,05	0,067
Prematürite (<37 hafta)	0,33	33 0,9-1,2	0,085
Gebelik yaşı	0,98	0,9-1,01	0,184
Doğum şekli (NSVY)	4,1	1,63-10,9	0,003*
Doğum ağırlığı	1	0,9-1	0,891
Başvuruda % kilo kaybı	1,02	0,9-1,2	0,531
Akraba evliliği	10,7	1,4-81,9	0,022*
Anne yaşı	1,03	0,9-1,1	0,366
ABO uyuşmazlığı	5,4	1,5-18,7	0,008*
Rh uyuşmazlığı	1,3	0,3-5,1	0,701

Tablo 16. Kan değişimi ile ilişkili risk faktörleri: tekli lojistik regresyon analizi

Değişken	OR	%95 CI	p
Cinsiyet (erkek)	1,3	0,4-3,7	0,64
Prematürite (<37 hafta)	2,6	0,5-12,2	0,22
Gebelik yaşı	1,04	0,9-1,14	0,075
Doğum şekli (NSVY)	1,02	0,35-2,9	0,959
Doğum ağırlığı	1	1,01-1,03	0,168
Başvuruda \geq %10 kilo kaybı	1,6	0,4-5,6	0,455
Akraba evliliği	2,4	0,8-7,2	0,11
Anne yaşı	0,9	0,9-1,1	0,84
Beslenme şekli, anne sütü	1,14	0,2-4,5	0,80
ABO uyuşmazlığı	2,1	0,8-7,1	0,01*
Rh uyuşmazlığı	0,7	0,08-6,5	0,8
Subgrup uyuşmazlığı	0,8	1,6-3	0,79
DC pozitifliği	2,8	0,9-9	0,067
Retikülosit sayısı	1,2	1-1,3	0,034*
MCHC \geq 36 olması	1	0,2-5,1	0,96
sTB/Alb oranı	4,7	2,3-9,6	<0,001*
sTB/Alb >6,8	27,4	3,4-216	0,002*
G6PD eksikliği	1,4	0,12-1,6	0,023*
Promoter polimorfizmi TA6/7	0,5	0,14-2	0,37
Promoter polimorfizmi TA7/7	0,5	0,4-4,7	0,58
Sepsis	3,7	0,99-14,5	0,052
Sepsis+İYE	1,6	0,46-5,5	0,455
İşitmeden kalma	3,5	1,1-10,6	0,027*
BİND skoru \geq4	26	6,6-104,24	<0,001*

* p<0,05

Tablo 17. ABE gelişmesi ile ilişkili risk faktörlerinin tekli lojistik regresyon analizi

Değişken	OR	%95 CI	p
Cinsiyet (erkek)	1,12	0,5-2,4	0,771
Prematürite (<37 hafta)	1,2	0,5-2,8	0,681
Gebelik yaşı	0,9	0,9-1,01	0,34
Doğum şekli (NSVY)	0,89	0,4-1,93	0,7
Doğum ağırlığı	1	0,9-1,01	0,445
Başvuru kilo kaybı >%10	2,1	0,7-5,4	0,144
Akraba evliliği	1,16	0,4-2,8	0,73
Anne yaşı	1,01	0,9-1,09	0,384
Beslenme şekli, anne sütü	1,2	0,4-3,2	0,69
ABO uyuşmazlığı	2,8	1,1-6,8	0,018*
Rh uyuşmazlığı	4,6	0,5-38	0,154
Subgrup uyuşmazlığı	2,8	0,7-10,5	0,120
DC pozitifliği	3	0,96-9,7	0,049*
Retikülosit sayısı	1,1	0,9-1,2	0,244
MCHC \geq 36 olması	1,3	0,4-4,7	0,604
sTB/Alb oranı	2,5	1,6-4	<0,001*
sTB/Alb >6,8	6,3	2,4-16	<0,001*
G6PD eksikliği	0,4	0,1-1,5	0,197
Promoter polimorfizmi TA6/7	1,03	0,37-2,8	0,95
Promoter polimorfizmi TA7/7	0,45	0,11-1,8	0,28
Sepsis	2,9	0,6-14,1	0,181
Üriner infeksiyon	4,6	0,5-37,5	0,153
Sepsis+İYE	6,4	1,4-29,2	0,016*
İşitmeden kalma	5,1	1,4-18,3	0,012*

* p<0,05

Tablo 18. İştme kaybı ile ilişkili risk faktörlerinin tekli lojistik regresyon analizi

Değişken	OR	%95 CI	p
Cinsiyet (erkek)	0,64	0,64-0,25	0,344
Prematürite (<37 hafta)	1,09	0,3-3	0,874
Gebelik yaşı	0,97	0,93-1,05	0,920
Doğum şekli (NSVY)	0,82	0,3-2	0,678
Doğum ağırlığı	1	0,9-1	0,603
Başvuruda ≥%10 kilo kaybı	1,812	0,7-0,94	0,005*
Akraba evliliği	0,82	0,2-2,2	0,707
Anne yaşı	0,99	0,91-1,06	0,620
Beslenme şekli, anne sütü	4,3	0,25-73	0,307
ABO uyumsuzluğu	3,3	1,3-8,3	0,010*
Rh uyumsuzluğu	1,49	0,4-8,2	0,386
Subgrup uyumsuzluğu	5,7	1,9-17,1	0,002*
DC pozitifliği	1,7	0,64-5,1	0,262
Retikülosit yüzdesi	1,1	0,97-1,2	0,096
MCHC≥36 olması	2,2	0,68-7,4	0,185
sTB/Alb oranı	1,5	1,1-2,04	0,007*
sTB/Alb >6,8	2,2	0,95-5,8	0,043*
G6PD eksikliği	0,61	0,18-2	0,420
Promoter polimorfizmi TA6/7	0,73	0,25-2,1	0,560
Promoter polimorfizmi TA7/7	0,31	0,37-2,7	0,290
Sepsis	1,9	0,5-7,9	0,310
Üriner infeksiyon	1,5	0,4-5,8	0,480
Sepsis+İYE	2,1	0,7-5,9	0,160
Kan değişimi	3,5	1,1-10,6	0,027*
BİND skoru ≥4	5,8	2,2-15,5	<0,001*

* p<0,05

MikroRNA SONUÇLARI

Sarılık ve kontrol gruplarının miRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde, sarılık grubunda kontrol grubuna göre miR 21-3p (p<0,001) ve miR-93 (p<0,001), miR-491-3p (p=0,025) ve miR-210'ün (p=0,047) ekspresyonlarının upregüle, miR-124'ün (p=0,019) ekspresyonunun ise downregüle olduğu görüldü (Tablo 19).

Sarılık alt gruplarında (Grup1,2,3) miR-491-3p, miR-210, miR-93'ün upregülasyonu; miR-124, miR-21-3p, miR-141-3p, miR-Let7a, miR-146a, ve miR-181c'nin downregülasyonu ile miR-374a-5p'nin up-/down-regülasyonu anlamlı olarak farklı saptandı (p<0,05)(Tablo 19).

Sarılık ve kontrol gruplarının, miRNA ekspresyonu relatif kantitasyon değerleri karşılaştırıldığında; miR-491-3p, miR-Let7a, miR-124, miR-21-3p, miR-93'ün relatif kantitasyon değerleri arasında farklılık saptandı (p<0,05). Kontrol grubuna göre sarılık grubunda miR-491-3p (p=0,03), miR-21-3p (p<0,001), miR-

93'ün ($p<0,001$) relatif kantitasyon değerleri yüksek, miR-Let7a ($p=0,02$) ve miR-124'n ($p=0,038$) relatif kantitasyon değerleri düşük saptandı (Tablo 20).

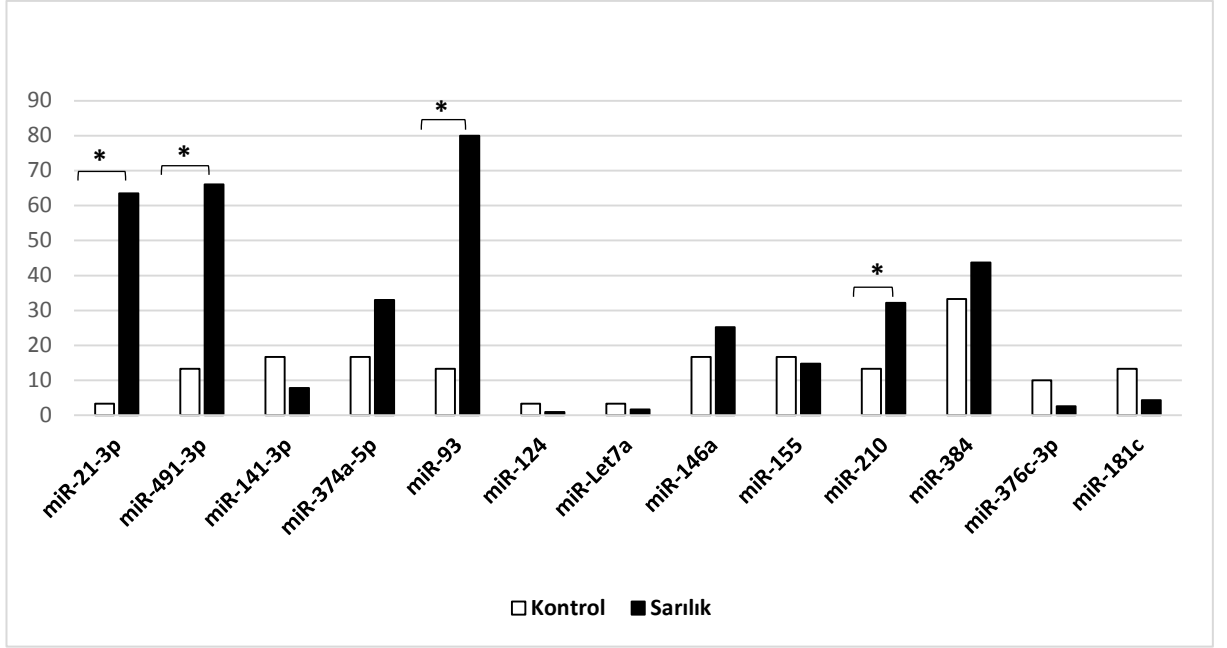
Sarılık alt gruplarında miR-155, miR-141-3p ve miR-384'n relatif kantitatif değerleri bakımından fark saptanmazken ($p>0,05$); miR-491-3p, miR-Let7a, miR-93, 'n relatif kantitatif değerlerinin Grup 1'e göre Grup 2'de arttığı; miR-124, miR-146a, miR-376c-3p, miR-181c'nin relatif kantitatif değerlerinin Grup 1'e göre Grup 2 ve Grup 3'te arttığı; miR-210, miR-374a-5p'n relatif kantitatif değerlerinin Grup 1'e göre Grup 2'de arttığı, Grup 2'ye göre Grup 3'te azaldığı görüldü (Tablo 20).

Tablo 19. Kontrol, Sarılık ve sarılık alt gruplarının miRNA ekspresyonları

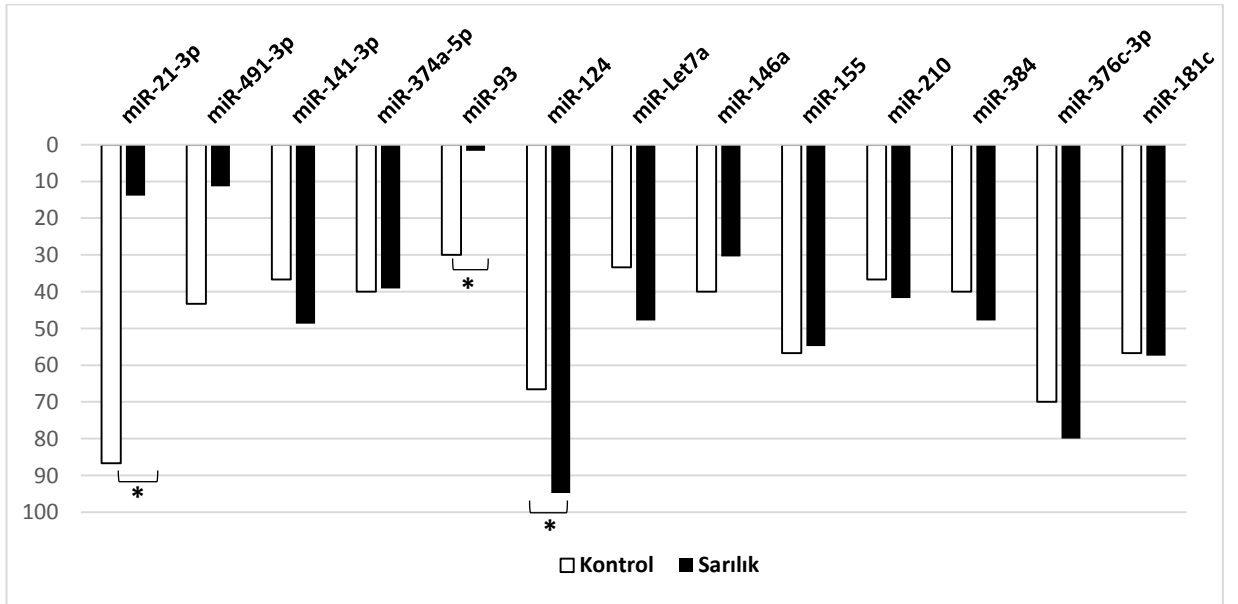
	Kontrol n:30	Sarılık n:115	Grup 1 n:67	Grup 2 n:32	Grup 3 n:16	^b p (k/s)	^b p (a)
miR-21-3p	▲ 1 (%3)	73 (%63,5)	31(%46,2)	26 (%81,3)	16 (%100)	<0,001*	<0,001*
	▼ 26 (%86,7)	16 (13,9)	15 (%22,3)	1 (%3,1)	0 (0)	<0,001*	-
miR-491-3p	▲ 4 (%13,3)	76 (%66,1)	53 (%79,1)	13 (%40,6)	10 (%62,5)	0,025*	<0,001*
	▼ 13 (%43,3)	13 (%11,3)	2 (%2,9)	11 (%34,3)	0 (%0)	0,755	0,282
miR-141-3p	▲ 5 (%16,7)	9 (%7,8)	5 (%7,4)	4 (%12,5)	0 (%0)	0,145	-
	▼ 11 (%36,7)	56 (%48,7)	33 (%49,3)	11 (%34,3)	12 (%75)	0,224	0,037*
miR-374a-5p	▲ 5 (%16,7)	38 (%33)	16 (%23,8)	19 (%59,3)	3 (%18,8)	0,80	=0,001*
	▼ 12 (%40)	45 (%39,1)	32 (%47,7)	3 (%9,3)	10 (%62,3)	0,931	<0,001*
miR-93	▲ 4 (%13,3)	92 (%80)	49 (%73,1)	30 (%93,7)	13 (%81,2)	<0,001*	0,035*
	▼ 9 (%30)	2 (%1,7)	2 (%2,9)	0	0	<0,001*	-
miR-124	▲ 1 (%3,3)	1 (%0,9)	1 (%1,5)	0 (%0)	0 (%0)	0,374	-
	▼ 20 (%66,6)	109(%94,8)	66 (%99)	30 (%93,8)	13 (%81,3)	0,019*	0,007*
miR-Let 7a	▲ 1 (%3,3)	2 (%1,7)	0 (%0)	2 (%6,3)	0 (%0)	0,507	-
	▼ 10 (%33,4)	55 (%47,8)	43 (%64,1)	7 (%21,9)	5 (%31,3)	0,144	<0,001*
miR-146a	▲ 5 (%16,7)	29 (%25,2)	5 (%7,4)	17 (%53,1)	7 (%43,8)	0,334	0,102
	▼ 12 (%40)	35 (%30,4)	31 (%46,2)	2 (%6,3)	2 (%12,5)	0,314	<0,001*
miR-155	▲ 5 (%16,7)	17 (%14,8)	9 (%13,4)	5 (%15,6)	3 (%18,8)	0,772	0,947
	▼ 17 (%56,7)	63 (%54,8)	40 (%59,7)	16 (%50)	7 (%43,8)	0,891	0,621
miR-210	▲ 4 (%13,3)	37 (%32,2)	18 (%26,9)	15 (%46,9)	4 (%25)	0,047*	0,030*
	▼ 11 (%36,7)	48 (%41,7)	33 (%49,3)	6 (%18,8)	9 (%56,3)	0,590	0,17
miR-384	▲ 10 (%33,3)	50 (%43,7)	30 (%44,8)	14 (%43,8)	6 (%37,5)	0,112	0,064
	▼ 12 (%40)	55 (%47,8)	34 (%50,7)	15 (%46,8)	6 (%37,5)	0,065	0,052
miR-376c-3p	▲ 3 (%10)	3 (%2,6)	3 (%4,5)	0	0	0,103	-
	▼ 21 (%70)	92 (%80)	59 (%88)	21 (%65,2)	12 (%75)	0,240	0,032*
miR-181c	▲ 4 (%13,3)	5 (%4,3)	2 (%2,9)	2 (%2,9)	1 (%6,3)	0,08	-
	▼ 17 (%56,7)	66 (%57,4)	49 (%73,1)	12 (%37,5)	5 (%31,2)	0,943	<0,001*

▲: up-regülasyon ▼: Down-regülasyon, ^b: Ki kare testi, * $p<0,05$

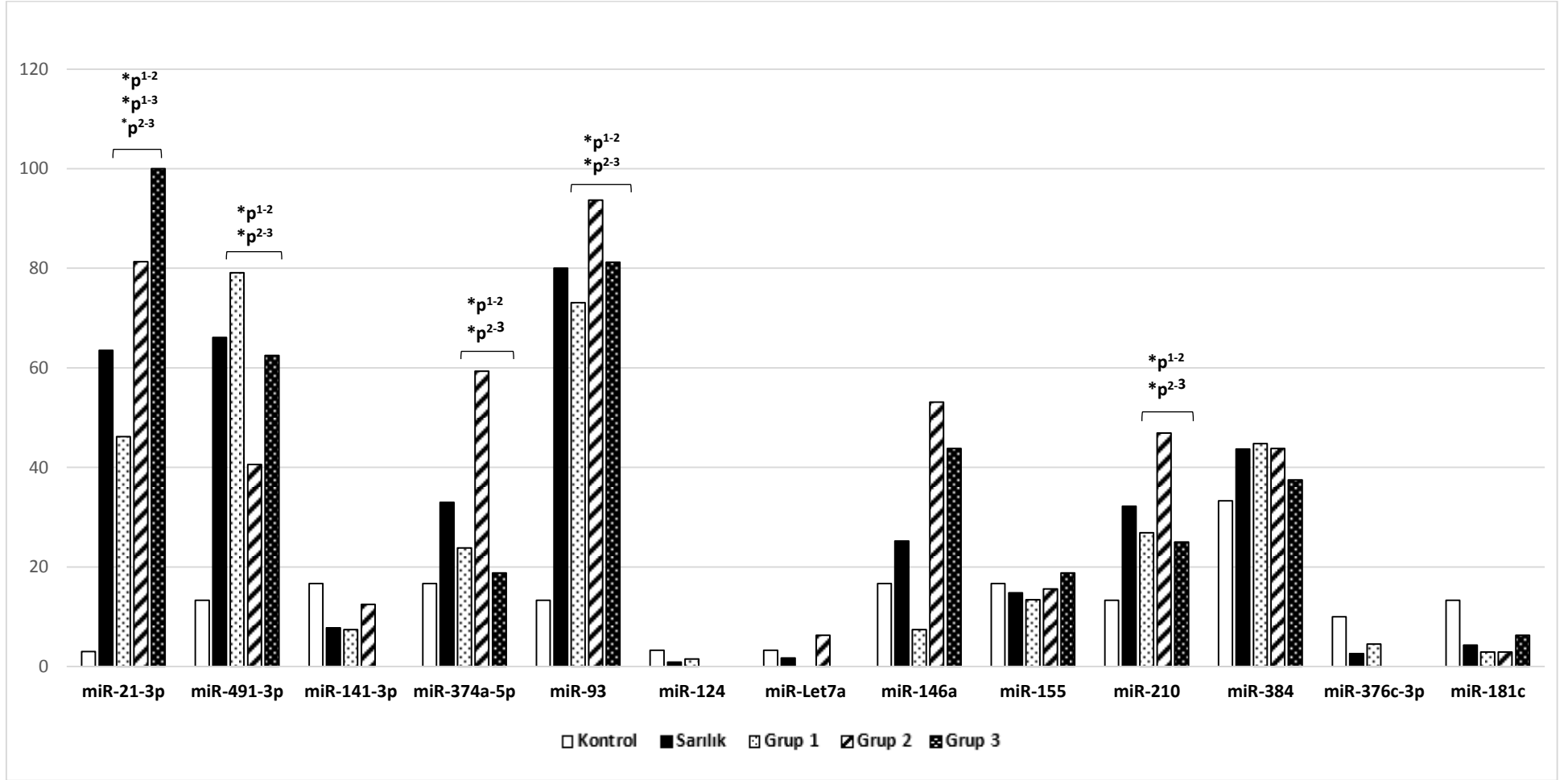
^bp (k/s): Kontrol/Sarılık grupları arası değerlendirme, ^bp (a): Sarılık alt grupları arası değerlendirme



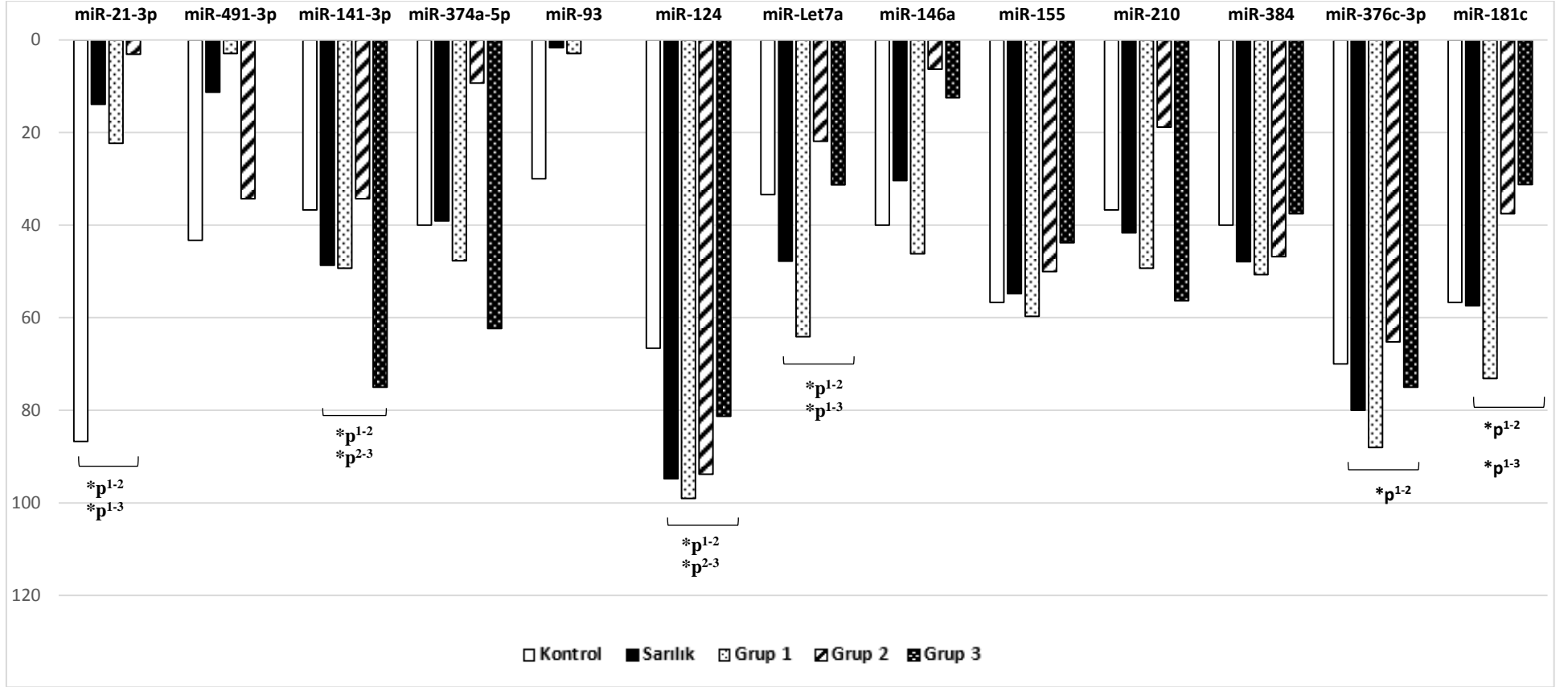
Şekil 14. Kontrol ve Sarılık gruplarının miRNA up-regülasyon değişimleri, *p<0,05



Şekil 15. Kontrol ve Sarılık gruplarının miRNA down-regülasyon değişimleri, *p<0,05



Şekil 16. Kontrol, Sarılık ve Sarılık altgrupları miRNA upregülasyon değişimleri *p<0,05



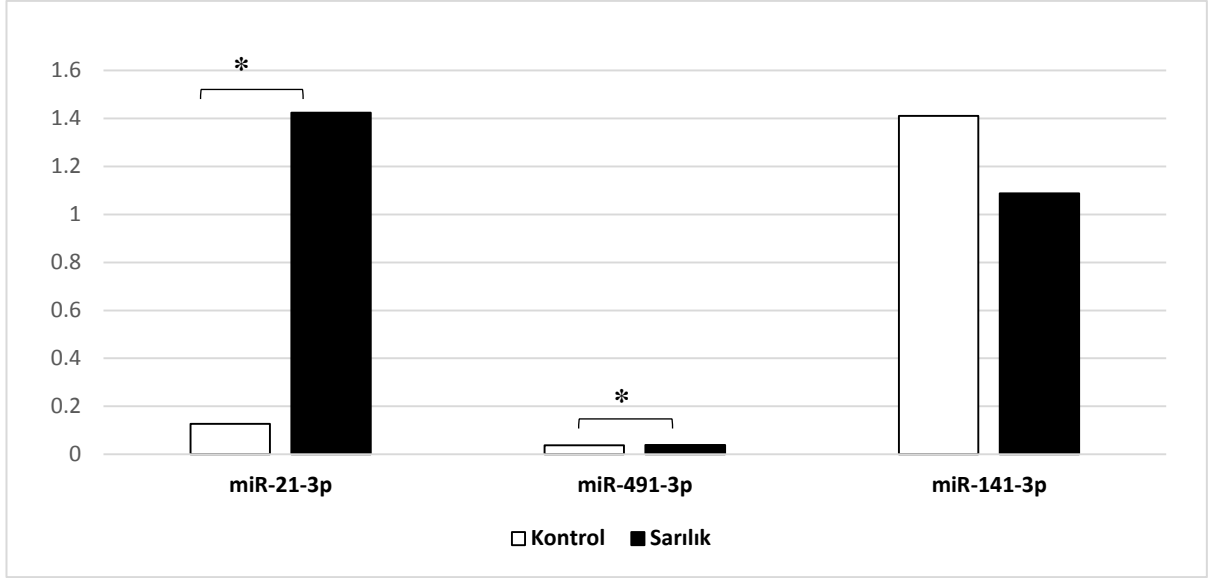
Şekil 17. Kontrol, Sarılık ve Sarılık altgrupları miRNA downregülasyon değişimleri, *p<0,05

Tablo 20. Kontrol, Sarılık ve Sarılık alt gruplarında miRNA relatif kantitatif değerleri

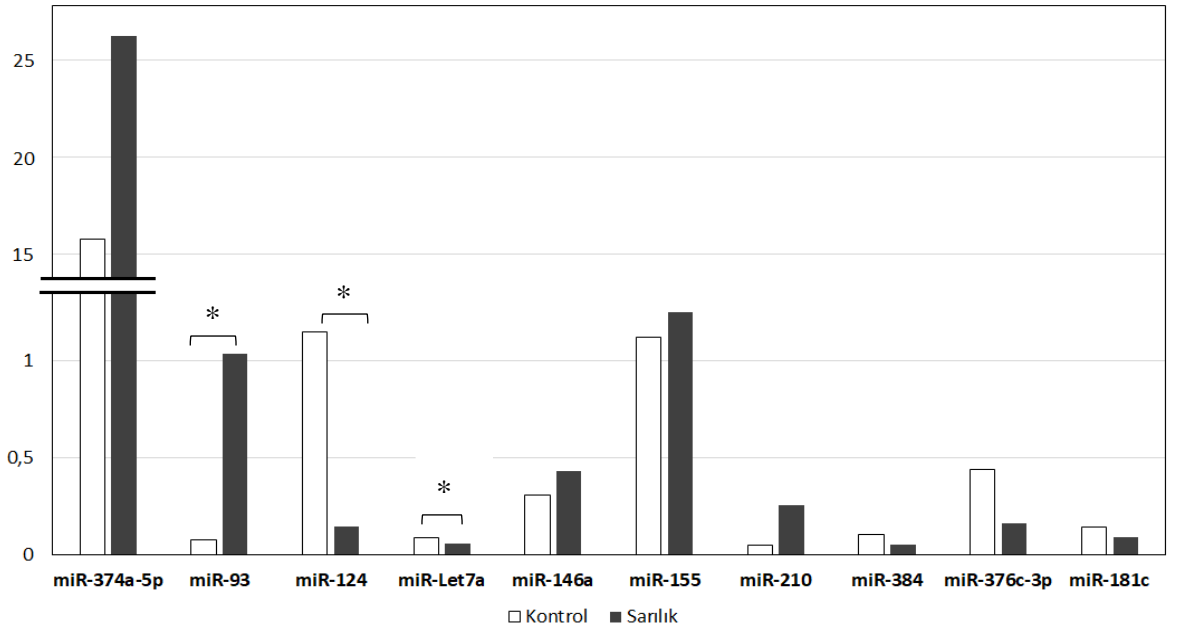
miRNA	Kontrol (n:30)	Sarılık (n:115)	^d P (k-s)	KDO	Grup 1 (n:67)	Grup 2 (n:32)	Grup 3 (n:16)	^c P (a)	^d P (k-s)
	Ort±SS	Ort±SS			Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS		
miR-21-3p	0,1272±0,6206	1,4250±4,8014	<0,001*	11,2	0,6043±0,8832	0,9043±1,2042	5,8853±11,998	p ¹⁻³ :<0,001* p ²⁻³ :<0,001*	p ^(k-1) :<0,001* p ^(k-2) :<0,001* p ^(k-3) :<0,001*
miR-491-3p	0,0371±0,0387	0,0387±0,1058	0,03*	1,02	0,0131±0,0259	0,1036±0,1833	0,0161±0,0127	p ¹⁻² :<0,001*	p ^(k-2) :<0,001*
miR-141-3p	1,4116±1,4225	1,0878±1,3524	0,102	0,77	1,0576±1,4392	1,3757±1,3671	0,6384±0,7273	0,27	p ^(k-3) : 0,019*
miR-374a-3p	16,528±17,953	27,340±30,804	0,478	1,65	19,100±23,294	52,303±34,804	11,916±20,840	p ¹⁻² :<0,001* p ²⁻³ :<0,001*	p ^(k-1) : 0,021* p ^(k-2) :<0,001*
miR-93	0,0759±0,0612	1,0382±1,1782	<0,001*	13,7	0,775±0,9551	1,4715±1,179	1,274±1,7011	p ¹⁻² : 0,005*	p ^(k-1) :<0,001* p ^(k-2) :<0,001* p ^(k-3) :<0,001*
miR-124	1,1498±5,0618	0,1467±0,3796	0,038*	0,13	0,0575±0,3454	0,2544±0,351	0,305±0,4781	p ¹⁻² :<0,001* p ¹⁻³ :<0,001*	p ^(k-2) : 0,05* p ^(k-3) :<0,001*
miR-Let7a	0,0870±0,0752	0,0568±0,0474	0,020*	0,65	0,0408±0,0379	0,0882±0,053	0,0614±0,0407	p ¹⁻² :<0,001*	p ^(k-1) :<0,001*
miR-146a	0,3063±0,2470	0,4324±0,5451	0,328	1,41	0,2592±0,2451	0,748±0,8554	0,5264±0,3543	p ¹⁻² :<0,001* p ¹⁻³ : 0,016*	p ^(k-2) :<0,001* p ^(k-3) : 0,036*
miR-155	1,1233±1,5170	1,2503±2,1715	0,634	1,11	0,9977±1,4628	1,5232±2,9209	1,762±2,8405	0,264	p>0,05
miR-210	0,0490±0,0419	0,2556±0,5666	0,548	5,22	0,2112±0,505	0,4231±0,7541	0,1062±0,2227	p ¹⁻² : 0,009* p ²⁻³ : 0,045*	p ^(k-2) : 0,004
miR-384	0,1005±0,1471	0,0527±0,0733	0,112	0,52	0,0302±0,0424	0,0856±0,1047	0,0809±0,0691	0,354	p ^(k-1) : 0,025
miR-376c-3p	0,4404±1,3315	0,1633±0,3253	0,065	0,37	0,1185±0,2899	0,2708±0,4345	0,1357±0,0986	p ¹⁻² :<0,001* p ²⁻³ : 0,013	p ^(k-1) :<0,001*
miR 181c	0,1432±0,2030	0,0864±0,1116	0,135	0,60	0,0506±0,0628	0,1413±0,1633	0,1271±0,0905	p ¹⁻² :<0,001* p ¹⁻³ :<0,001*	p ^(k-1) :<0,001*

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, ^cKruskal Wallis Testi, ^d: Mann Whitney U Testi, p (k-s): kontrol- sarılık, P (a): sarılık altgrup, p (k-a): Kontrol ve altgrup,

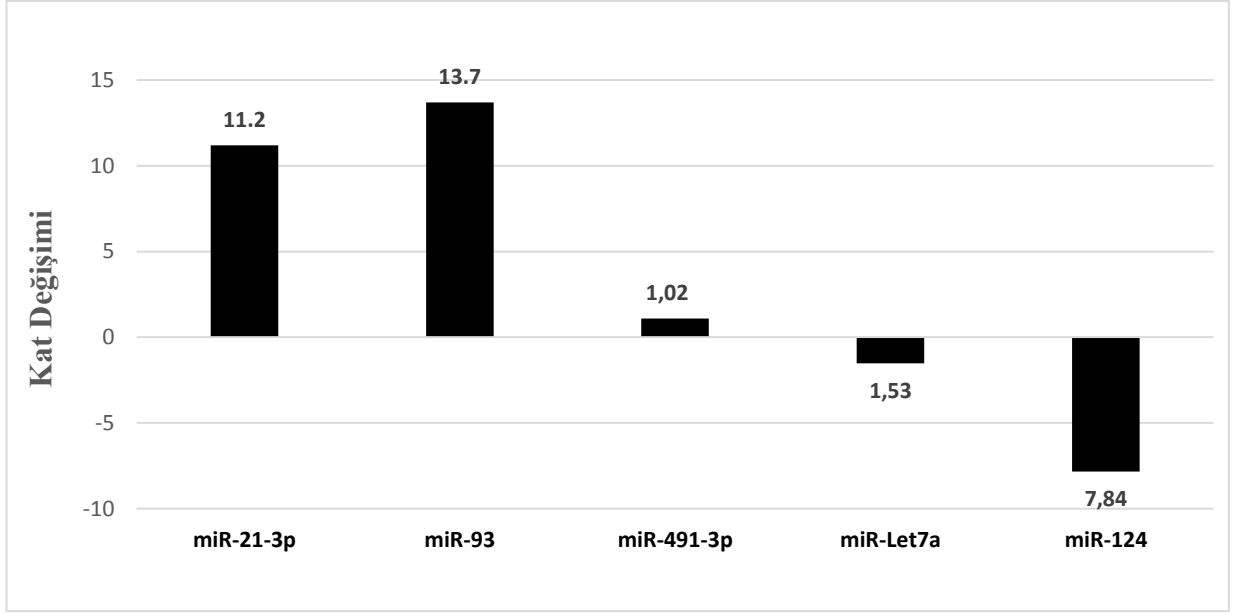
P^(k-1): Kontrol/Grup1, P^(k-2): Kontrol/Grup2, P^(k-3): Kontrol/Grup3, P¹⁻²: Grup1/Grup2, P¹⁻³: Grup1/Grup3, P²⁻³: Grup2/Grup3, KDO: Kat değişim oranı, *p<0,05



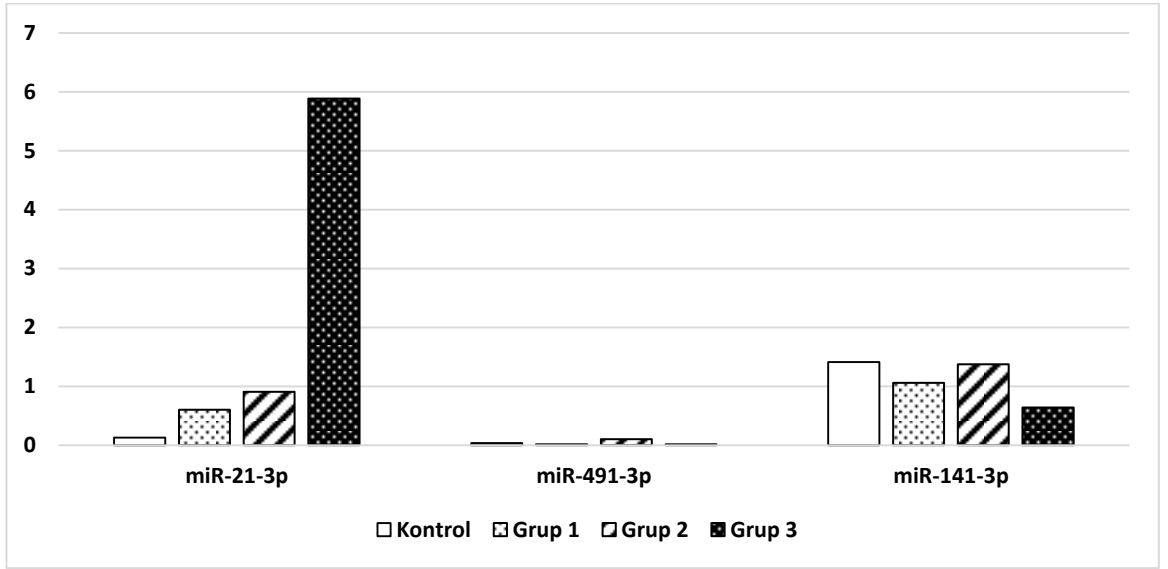
Şekil 18. Kontrol ve Sarılık gruplarında UGT1A1 ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri, *p<0,05



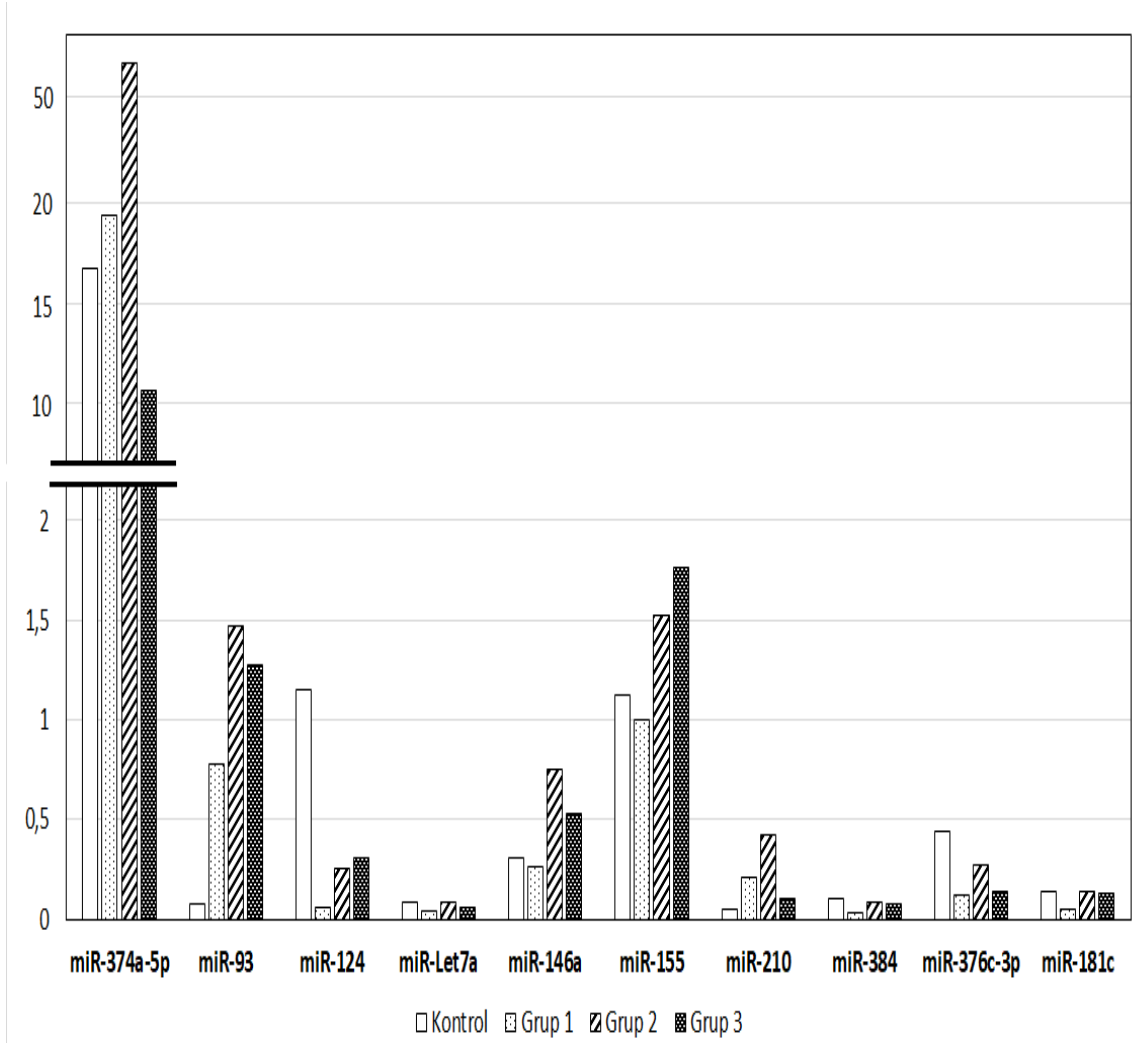
Şekil 19. Kontrol ve Sarılık gruplarında nöroinflamasyonla ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri, *p<0,05



Şekil 20. Kontrol ve Sarılık grubunda istatistiki olarak anlamlı miRNA'ların kat değişimleri



Şekil 21. Kontrol ve Sarılık alt gruplarında UGT1A1 ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri



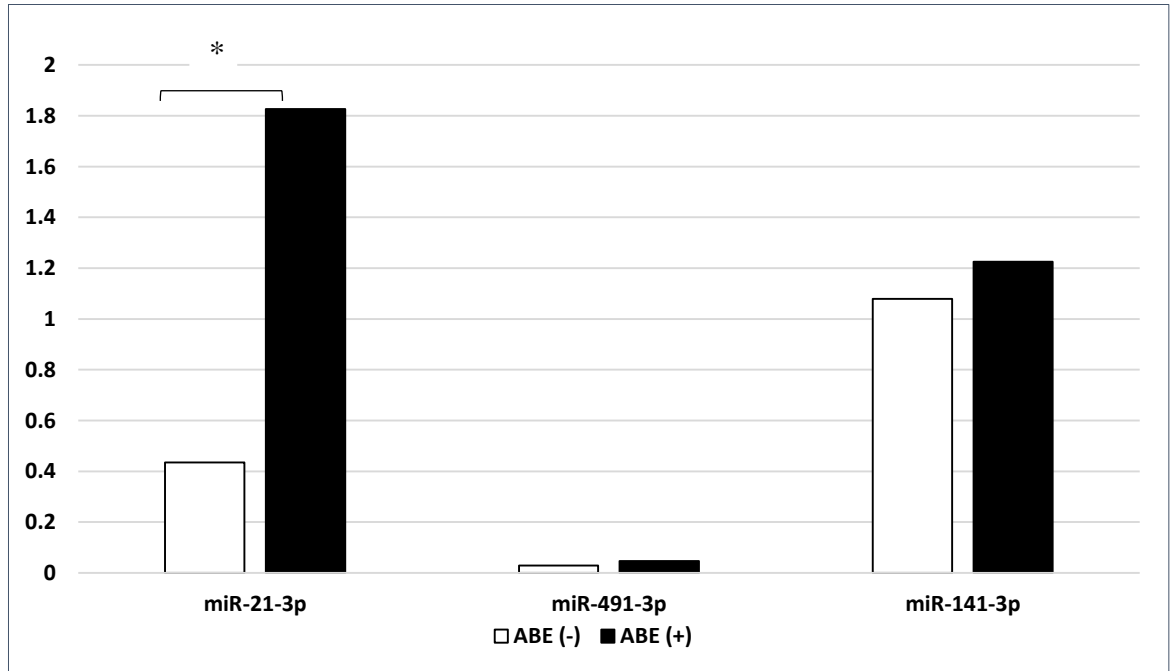
Şekil 22. Kontrol ve Sarılık alt gruplarında nöroinflamasyonla ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri

ABE gelişen/gelişmeyen olgular incelendiğinde, ABE gelişenlerde miR-21-3p ($p=0,001$), miR-146a ($p=0,002$), miR-93'ün ($p=0,001$) relatif kantitatif değerlerinde artma, miR-124'ün ($p=0,007$) relatif kantitatif değerlerinde azalma görüldü (Tablo 21).

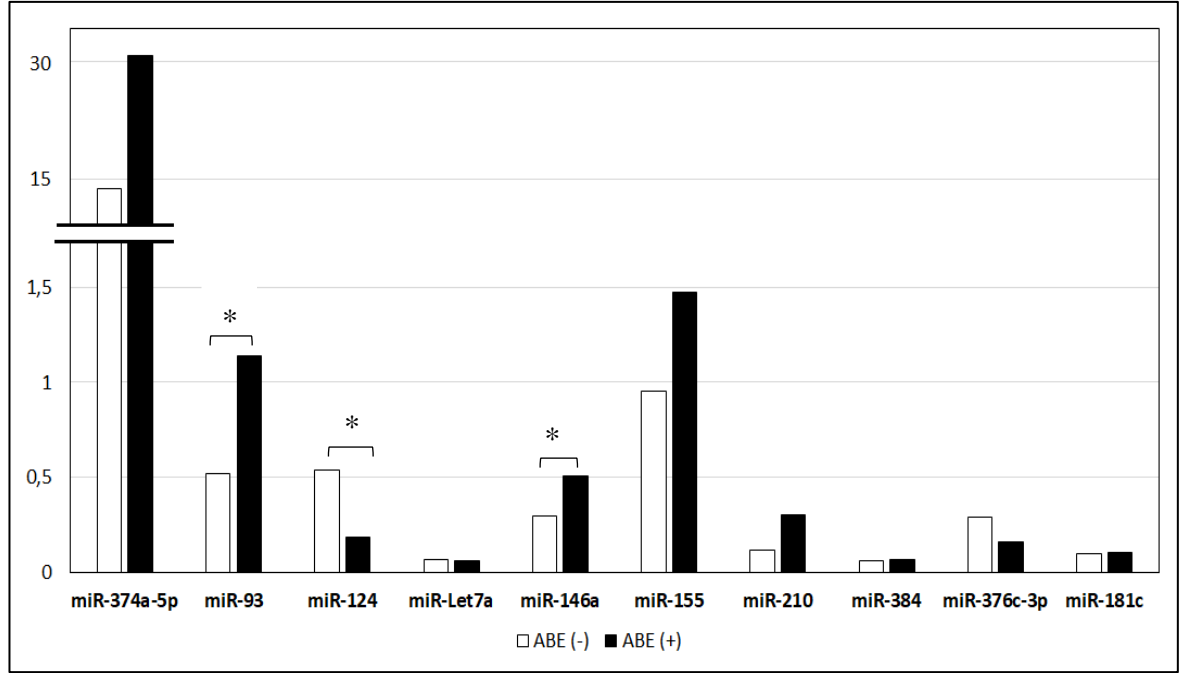
Tablo.21 ABE gelişmeyen/gelişen olguların miRNA relatif kantitatif değerleri

miRNA	Relatif kantitatif değer		^d P değeri	KDO
	ABE (-) (n:70)	ABE (+) (n:75)		
	Ort±SS	Ort±SS		
miR-21-3p	0,4349±0,8458	1,8261±5,8814	<0,001*	4,19
miR-491-3p	0,0290±0,0656	0,0471±0,1168	0,403	1,62
miR-141-3p	1,0794±1,1786	1,2251±1,5293	0,209	1,13
miR 374a-3p	19,545±26,821	30,291±29,974	0,068	1,54
miR-93	0,5184±0,9267	1,1385±1,2041	0,001*	2,19
miR-124	0,5367±3,3329	0,1844±0,4142	0,007*	0,34
miR-Let7a	0,0650±0,0649	0,0612±0,0451	0,599	0,94
miR-146a	0,2976±0,2833	0,5078±0,6247	0,002*	1,71
miR-155	0,9526±1,3918	1,4773±2,4962	0,166	1,56
miR-210	0,1167±0,2498	0,3026±0,6586	0,076	2,59
miR-384	0,0614±0,1073	0,0636±0,0821	0,134	1,04
miR-376c-3p	0,2880±0,9156	0,1577±0,3042	0,257	0,55
miR 181c	0,0948±0,1515	0,1013±0,1222	0,069	1,07

^d:Mann Whitney U Testi, *p<0,05



Şekil 23. ABE gelişmeyen ve gelişen olguların UGT1A1 ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri, *p<0,05



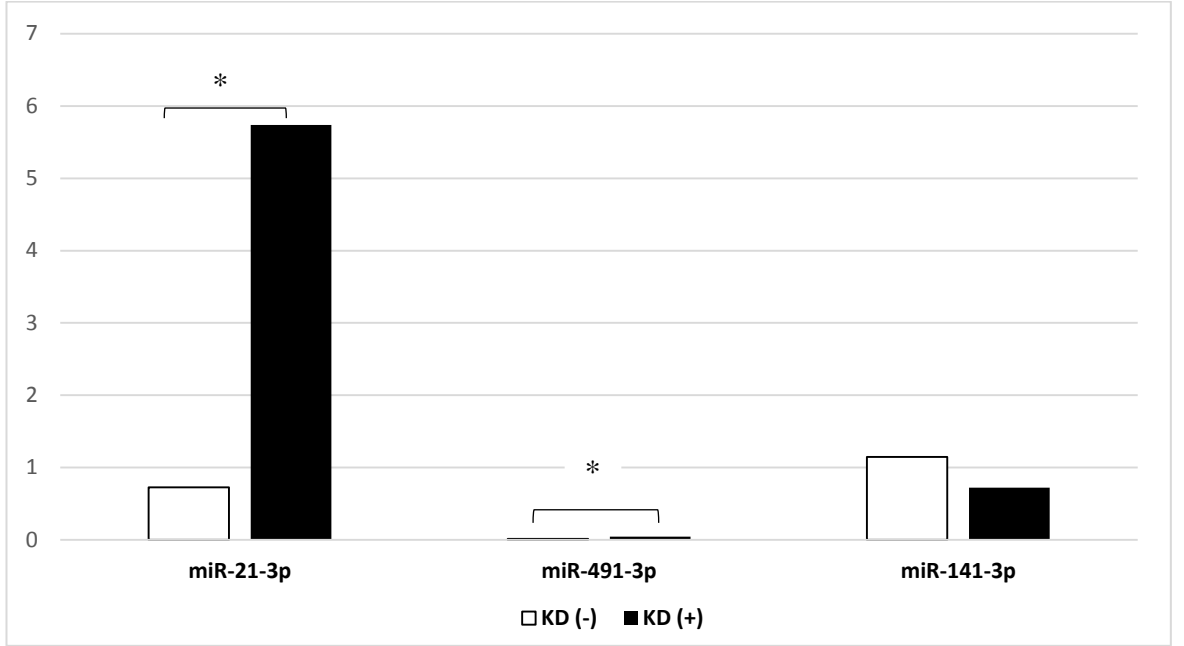
Şekil 24. ABE gelişmeyen ve gelişen olguların nöroinflamasyon ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri , *p<0,05

Kan değişimi yapılan/yapılmayan hastaların miRNA ekspresyonu relatif kantitatif değerleri incelendiğinde, kan değişimi yapılanlarda miR491-3p (p=0.036), miR-124 (p=0.007), miR-21-3p'ün (p=0.001) relatif kantitatif değerlerinin arttığı; miR 374a-3p'nin (p=0.024) relatif kantitatif değerlerinin azaldığı saptandı (Tablo 22).

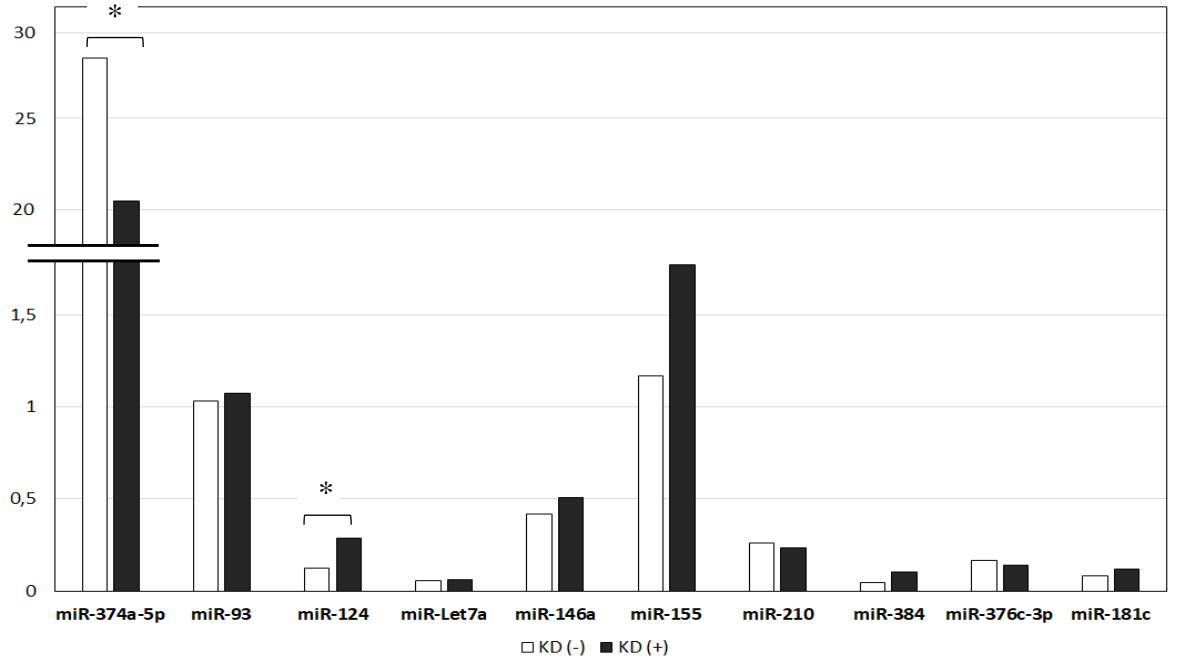
Tablo.22 Kan değişimi yapılmayan ve yapılan hastaların miRNA relatif kantitatif değerleri

miRNA	Relatif kantitatif değer		^d P değeri	KDO
	KD (-) (n:99)	KD (+) (n:116)		
	Ort±SS	Ort±SS		
miR-21-3p	0,7251±1,0750	5,7378±12,024	<0,001*	7,91
miR-491-3p	0,0149±0,1135	0,0426±0,0114	0,036*	2,85
miR-141-3p	1,1471±1,4186	0,7205±0,7656	0,355	0,62
miR 374a-3p	28,253±30,883	21,690±30,674	0,024*	0,77
miR-93	1,0325±1,1052	1,0734±1,6024	0,111	1,04
miR-124	0,1243±0,3578	0,2855±0,4846	0,007*	2,29
miR-Let7a	0,0562±0,0489	0,0607±0,0375	0,374	1,08
miR-146a	0,4201±0,5719	0,5084±0,3381	0,119	1,21
miR-155	1,1658±2,1306	1,7730±2,4173	0,246	1,52
miR-210	0,2594±0,5682	0,2319±0,5740	0,405	0,89
miR-384	0,0442±0,0549	0,1051±0,1330	0,22	2,37
miR-376c-3p	0,1669±0,3487	0,1411±0,0962	0,056	0,84
miR 181c	0,0813±0,1136	0,1181±0,0950	0,140	1,45

^d: Mann Whitney U Test, *p<0,05



Şekil 25. Kan değişimi yapılmayan ve yapılan hastaların UGT1A1 ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerlerinin karşılaştırması, *p<0,05



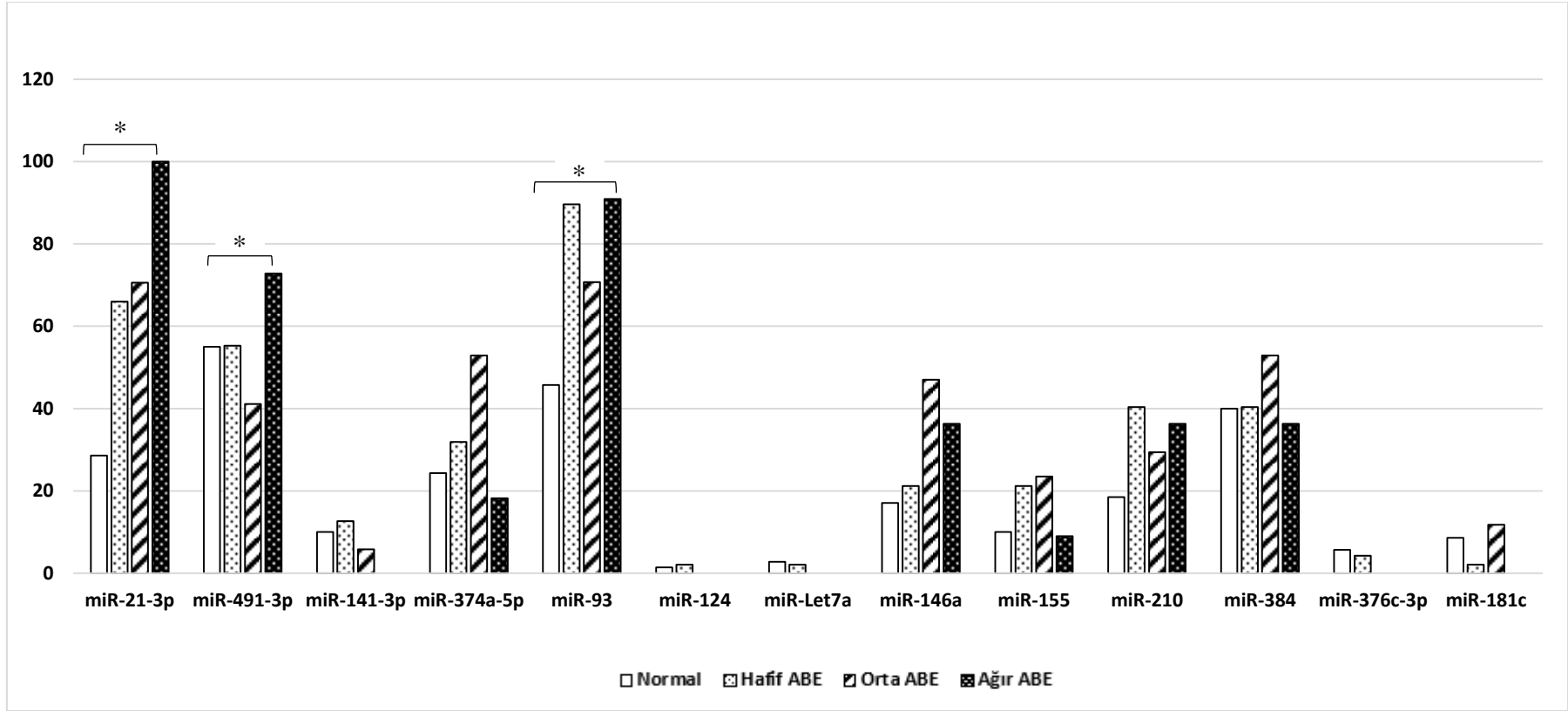
Şekil 26. Kan değişimi yapılan ve yapılmayan hastaların nöroinflamasyonla ilişkili miRNA'ların relatif kantitatif değerleri, *p<0,05

BİND skoruna göre sarılık+kontrol grubunun miRNA ekspresyon değişimleri incelendiğinde, ağır ABE gelişenlerde miR491-3p, miR-21-3p, miR-93 ekspresyon değişimlerinin anlamlı upregüle olduğu, BİND skoru normal olanlarda miR146a, miR 181c ekspresyonlarının downregüle olduğu saptandı (p<0,05) (Tablo 23)

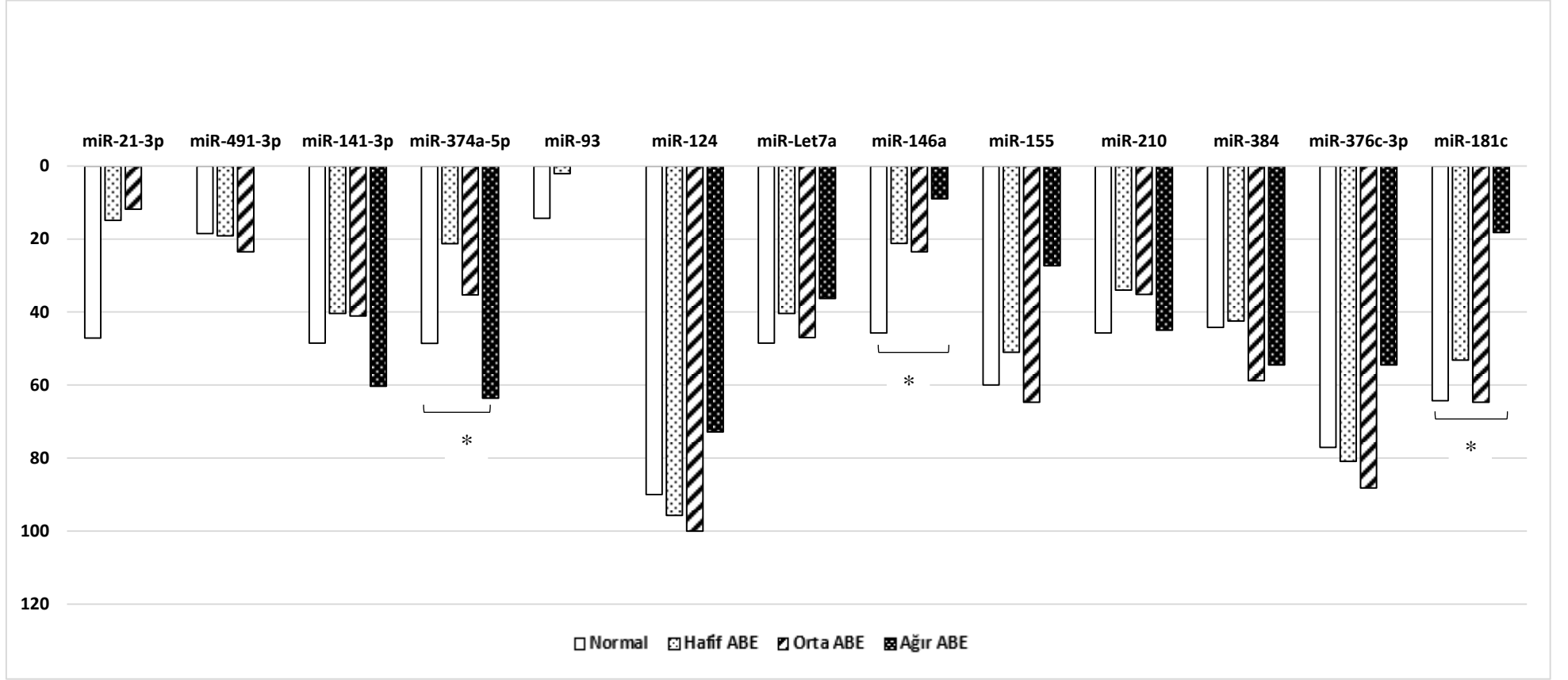
Tablo 23. BİND skorlarına göre kontrol/sarılık gruplarının miRNA ekspresyon değişimleri

miRNA'lar		Normal (n:70)	Hafif ABE (n:47)	Orta ABE (n:17)	Ağır ABE (n:11)	^b p
miR-21-3p	▲	20(%28,6)	31(%66)	12 (%70,6)	11(%100)	<0,001*
	▼	33 (%47,1)	7 (%14,9)	2 (%11,8)	0	0,25
miR-491-3p	▲	39 (%55)	26(%55,3)	7 (%41,1)	8 (%72,8)	0,03*
	▼	13 (%18,5)	9 (%19,1)	4 (%23,5)	0	0,125
miR-141-3p	▲	7 (%10)	6 (%12,7)	1 (%5,8)	0	-
	▼	34 (%48,5)	19 (%40,4)	7 (%41,1)	7 (%60,3)	0,509
miR-374a-5p	▲	17 (%24,3)	15 (%31,9)	9 (%52,9)	2 (%18,2)	0,118
	▼	31(%48,6)	10(%21,3)	6 (%35,3)	7 (%63,6)	0,015*
miR-93	▲	32(%45,7)	42(%89,6)	12 (%70,7)	10 (%90,9)	<0,001*
	▼	10 (%14,3)	1 (%2,1)	0	0	0,13
miR-124	▲	1 (%1,4)	1 (%2,1)	0	0	-
	▼	63 (%90)	45 (%95,7)	17 (%100)	8 (%72,8)	0,612
miR-Let7a	▲	2 (%2,8)	1 (%2,1)	0	0	-
	▼	34 (%48,5)	19 (%40,4)	8 (%47)	4 (%36,3)	0,164
miR-146a	▲	12 (%17,1)	10 (%21,2)	8 (%47)	4 (%36,3)	0,65
	▼	32(%45,7)	10 (%21,2)	4 (%23,5)	1 (%9)	0,007*
miR-155	▲	7 (%10)	10 (%21,2)	4 (%23,5)	1 (%9)	0,258
	▼	42 (%60)	24 (%51)	11 (%64,7)	3 (%27,3)	0,162
miR-210	▲	13(%18,5)	19 (%40,4)	5 (%29,4)	4 (%36,3)	0,70
	▼	32(%45,7)	16 (%34)	6 (%35,2)	5 (%45)	0,591
miR-384	▲	28 (%40)	19 (%40,4)	9 (%52,9)	4 (%36,3)	0,465
	▼	31 (%44,2)	20 (%42,5)	10 (%58,8)	6 (%54,5)	0,52
miR-376c-3p	▲	4 (%5,7)	2 (%4,3)	0	0	-
	▼	54 (%77,1)	38 (%80,9)	15 (%88,2)	6 (%54,5)	0,115
miR-181c	▲	6 (%8,6)	1 (%2,1)	2 (%11,8)	0	-
	▼	45(%64,3)	25(%53,2)	11 (%64,7)	2 (%18,2)	0,026*

▲ : up-regülasyon ▼ : Down-regülasyon, ^b: Ki kare testi, *p<0,05



Şekil 27. BİND skoruna göre grupların miRNA up-regülasyon değişimleri , *p<0,05



Şekil 28. BİND skoruna göre grupların miRNA down-regülasyon değişimleri

Tekli lojistik regresyon analizine göre,

Ciddi hiperbilirubinemi gelişmesinde miR-Let7a'nın riski azalttığı, miR-93 ve miR-21-3'nin riski arttırdığı (Tablo 24); ABE gelişmesinde miR-146 a ve miR-181c'nin riski arttırdığı (Tablo 25); miR-21-3p'nin kan değişimi gereksinimini artırdığı (Tablo 26) saptandı; çalışılan miRNA'ların işitme kaybıyla ilişkisi bulunmadı (Tablo 27).

Tablo 24. Ciddi hiperbilirubinemi ilişkili miRNA'ların lojistik regresyon analizi

Değişken	OR	%95 CI	p
miR-21-3p	1,4	1,1-1,9	0,004*
miR-491-3p	1	0,8-1	0,932
miR-141-3p	0,8	0,5-1,2	0,255
miR 374a-3p	1,3	0,9-1,8	0,075
miR-93	2,6	1,5-4,5	0,001*
miR-124	0,6	0,2-1,6	0,322
miR-Let7a	0,46	0,24-0,86	0,016*
miR-146a	1,3	0,8-2	0,181
miR-155	1	0,8-1,3	0,752
miR-210	1,2	0,9-1,5	0,106
miR-384	0,9	0,72-1,4	0,088
miR-376c-3p	0,8	0,56-1,1	0,165
miR 181c	0,7	0,4-1,1	0,065

*p<0,05

Tablo 25. ABE gelişiminde etkili miRNA'ların lojistik regresyon analizi

Değişken	OR	%95 CI	p
miR-21-3p	1,3	0,9-1,07	0,175
miR-491-3p	1,1	0,9-1,4	0,280
miR-141-3p	1,4	0,8-2,24	0,149
miR 374a-3p	1	0,8-1,34	0,473
miR-93	1	0,9-1,08	0,517
miR-124	4,5	0,46-45	0,194
miR-Let7a	1,6	0,79-3,6	0,176
miR-146a	1,6	1,0-2,5	0,020*
miR-155	1,2	0,9-1,7	0,144
miR-210	1,03	0,98-1,1	0,241
miR-384	1,2	0,8-2,1	0,634
miR-376c-3p	1,54	0,64-3,4	0,286
miR 181c	2,3	2,4-5,85	0,038*

*p<0,05

Tablo 26. Kan değişimi gereksinimini etkileyen miRNA'ların lojistik regresyon analizi

Değişken	OR	%95 CI	p
miR-21-3p	1,002	1-1,003	0,022*
miR-491-3p	0,7	0,38-1,4	0,350
miR-141-3p	0,5	0,2-1,4	0,247
miR 374a-3p	0,7	0,5-1,15	0,203
miR-93	0,9	0,8-1	0,086
miR-124	2,4	0,7-8	0,152
miR-Let7a	1,1	0,4-3	0,725
miR-146a	1,08	0,8-1,4	0,550
miR-155	1,12	0,8-1,33	0,315
miR-210	0,9	0,9-1,05	0,856
miR-384	0,8	0,7-1,5	0,116
miR-376c-3p	0,96	0,4-2,1	0,920
miR 181c	1,2	0,68-2,1	0,540

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı etki

Tablo 27. İşitme kaybı gelişmesinde etkili miRNA'ların lojistik regresyon analizi

Değişken	OR	%95 CI	p
miR-21-3p	1	0,95-1,1	0,223
miR-491-3p	1,12	0,97-1,3	0,118
miR-141-3p	0,98	0,61-1,5	0,961
miR 374a-3p	1,18	0,95-1,46	0,149
miR-93	1,01	0,99-1,1	0,187
miR-124	2,1	0,66-6,8	0,203
miR-Let7a	1,16	0,75-3,5	0,216
miR-146a	1,3	0,95-1,18	0,092
miR-155	1,1	0,85-1,13	0,610
miR-210	0,99	0,95-1,04	0,729
miR-384	0,95	0,8-1,2	0,727
miR-376c-3p	1,3	0,8-2,26	0,263
miR 181c	1,3	0,8-2,3	0,219

*p<0,05

TARTIŞMA

Sarılık, yenidoğanların yaklaşık %60-80'inde görülmesine rağmen; kernikterus ve nörogelişimsel sorunlara neden olabilecek ciddi hiperbilirubinemi yenidoğanların %2'sinden daha azını etkilemektedir (86). Gelişmekte olan ülkelerin bazılarında ciddi neonatal sarılık sıklığı gelişmiş ülkelerden yaklaşık 100 kat fazla olup; sarılık nedeniyle hastaneye yatan bebeklerin %3'ünde akut bilirubin ensefalopatisi saptandığı bildirilmektedir (48). Nüfus temelli çalışmalarda kernikterus insidansı Danimarka, İsveç ve Kanada'da yılda 100.000 canlı doğumda 1,2-2,3 iken, ABD'de 0,44 olarak bildirilmiştir (87). Ülkemizde sarılık nedeniyle hastaneye yatırılan 5620 yenidoğanının %6,4'ünde şiddetli hiperbilirubinemi ($sTB \geq 25 \text{mg/dl}$), %0,23'ünde ABE saptanmıştır (88).

Serum bilirubin düzeyi arttıkça nörotoksisite riski ve şiddetinin arttığı bilinmekte; ancak toksik etkilerinin hangi bilirubin düzeyinde ortaya çıktığı net olarak bilinmemektedir. Mollison ve Cutbush'un çalışmasında (1954) Rh hemolitik hastalığı olan term yenidoğanlarda sTB düzeyi ile kernikterus arasındaki ilişki araştırılmış; sTB düzeyi 10-18 mg/dl, 19-24 mg/dl, 25-29 mg/dl, 30-40 mg/dl olan hastalarda kernikterus riski sırasıyla %0, %8, %33 ve %73 olarak saptanmış (13). Kuzniewicz ve ark.larının araştırmasında (1995-2011) ≥ 35 hafta doğan 525,409 bebeğin tıbbi kayıtları retrospektif incelendiğinde, 47 bebeğin (8.6/100.000) $sTB > 30 \text{mg/dL}$ olup; ABE tanısı alan 4 bebeğin sTB düzeyleri $> 35 \text{mg/dL}$ saptanmış (86).

Kernikterus terimi, ABE'den sağ kalan, distoni, atetoid serebral palsy, yukarı bakış felci ve sensörinöral işitme kaybı gelişen bebeklerde geri dönüşü olmayan klasik sekeller için kullanılmaktadır (21). İlk yıl hastalar iyi beslenemez, tonusları hipotonik, motor gelişimleri geridir. Kronik bilirubin ensefalopatisinin tipik bulguları yıllar sonra ortaya çıkabildiğinden (2); $sTB \geq 20 \text{mg/dl}$ olan term/sınırdaki term bebeklerde kernikterusun erken tanısında nörolojik muayenede anormal kas tonusu, ABR ve MR görüntüleme kullanılmaktadır (20). Volpe ve Van Praagh tarafından tanımlanan, Johnson ve arkadaşları tarafından geliştirilen BİND skorlama sistemi ise ABE'nin şiddetini ve nörolojik disfonksiyonu, MR veya ABR testi yapılmaksızın, bilinç düzeyi, kas tonusu ve ağlama paterni gibi klinik belirtiler temelinde değerlendirmektedir. BİND skoruna göre 0 puan normal, 1-3 puan hafif etkilenme, 4-

6 puan orta etkilenme, ancak tedavi ile geri dönebilir, 7-9 puan ise şiddetli, geri dönüşümsüz etkilenme, ancak tedavi ile şiddeti azaltılabilir olarak değerlendirilmektedir (23). Gamaleldin ve ark.nın çalışmasında sTB>25 mg/dL olan 249 bebek BİND skoru ile değerlendirilmiş; %22'sinde hafif, %18'inde orta/ağır ABE saptanmış (89). ABE sıklığı, Erdev ve ark.nın çalışmasında, sarılık nedeniyle hastaneye yatan 5620 bebekte %0,23 (88), Bozkurt ve ark. nın çalışmasında ciddi hiperbilirubinemi 115 bebekte %39,1 olarak bildirilmiş (90). Çalışmamızda sTB≥20 mg/dL olan 115 bebeğin %40,9'unda hafif, %14,8'inde orta, %9,5'inde ağır olmak üzere %65,2'sinde ABE saptandı. Ülkelerin sağlık sistemlerinin, ciddi hiperbilirubinemi kriteri olarak alınan sTB düzeylerinin farklı olması, çalışmalardaki ABE sıklığındaki farklılıkları açıklayabilir.

Çalışmalarda erkek bebeklerde ciddi hiperbilirubineminin daha sık görüldüğü; erkek/kız oranının 1-1,5 olduğu bildirilmiş (88,90-93). APA (2004), erkek cinsiyeti, ciddi hiperbilirubinemi için minör risk faktörleri içinde belirtmiştir (19). Çalışmamızda sarılık ve kontrol grupları arasında istatistiki olarak fark saptanmamasına rağmen; sarılık grubunda literatür verilerinin tersine, bebeklerin %55,7'si kız olup; erkek/kız oranı 1/1,25 idi. Bu farklılık kız çocuklarının hastaneye daha geç götürüldüğü şeklinde yorumlandı.

APA (2004) bebeklerin doğumdan 72 saatten sonra taburcu edilmesini nörotoksosite riskini azaltıcı bir faktör olarak rapor etmiştir (19). C/S doğumun, annenin hastanede kalış süresini uzatarak (48-72 saat), uygun ve yeterli emzirme fırsatı sağlayarak sarılık riskini azalttığı bildirilmiş (94,95). Vajinal yolla doğumun, uzamış travay, vakum ekstraksiyonu gibi yöntemlerin uygulanması nedeniyle, bebeklerde hiperbilirubinemi riskini arttırdığı bildirilmiş (96). Çalışmamızda kontrol grubunda C/S ile doğumun sarılık grubuna göre belirgin yüksek (%76,6 ve %44,3) olduğu saptandı (p=0,002). Lojistik regresyon analizi NSVY ile doğumun ciddi hiperbilirubinemi riskini 4,1 kat arttırdığını gösterdi. Çalışmamızda anne-bebeklerin doğumdan kaç saat sonra taburcu edildikleri, taburcu edilmeden önce bilirubin nomogramına göre sarılık risk düzeylerinin belirlenip belirlenmediği, gebelikte ve doğumdan sonra emzirme eğitimi alıp almadıkları, ilk kontrol zamanları konusunda veri bulunmamakla birlikte, sarılık grubundaki bebeklerin %17,4'ünde hastaneye başvuruda ≥%10 ağırlık kaybı olması bebeklerin emzirme yerleşmeden taburcu

edildiğini desteklemektedir. Ülkemizde anne ve bebek CS doğumdan sonra 48-72 saat hastanede izlenirken; NSVY ile doğumdan sonra emzirme yerleşmeden erken (<24 saat) taburculuk yaygın uygulamadır. Sağlık sistemimizde doğumdan sonra eve gelen ebe/hemşire desteğinin olmaması, taburculuktan sonraki 48 saat içinde kontrol sisteminin uygulanmaması gerçeği (2), ailenin sarılık konusundaki bilgi yetersizliği ile birleşince, ciddi hiperbilirubinemili bebeklerin hastaneye başvurusunun geciktiği düşünüldü (4,9±3,4 gün). Ciddi hiperbilirubinemi önlenebilir bir hastalık olduğundan, anne/bebeklerin doğumdan en az 48-72 saat sonra taburcu edilmeleri, emzirme eğitiminin gebelikte başlayıp doğumdan sonra da sürdürülmesi, taburculuktan önce transkutan bilirubin ölçümü ile bebeklerin risk düzeyinin belirlenmesi ve riskli bebeklerin daha erken ve daha sık kontrole çağırılması, annelere ilk ay eve gelen ebe/hemşire desteği verilmesi ciddi hiperbilirubinemiye bağlı komplikasyonları azaltacaktır.

APA 2004 kılavuzunda, anne yaşının 25'in üzerinde olmasını minör risk faktörleri içinde belirtmiştir (19). Gale ve arkadaşlarının çalışmasında, anne yaşının 35'den büyük, 19'dan küçük olmasının hiperbilirubinemi riskini arttırdığı saptanmış (97). Çalışmamızda kontrol ve sarılık gruplarında anne yaşı sırasıyla 28,3±5,7 ve 29,4±6,1 olup; anne yaşları bakımından gruplar arasında farklılık saptanmadı.

APA 2004 kılavuzunda, doğumda gebelik yaşının 35-36 hafta olması şiddetli hiperbilirubinemi için majör risk faktörü, gebelik yaşının 37-38 hafta olması ise minör risk faktörü olarak bildirilmiştir (19). Preterm doğum fizyolojik sarılığın süresini ve şiddetini arttırabilir. Pretermelerde eritrosit kitlesinin fazla, eritrosit yaşam süresinin kısa (yenidoğanda 60-70 gün, hasta prematürede 30 gün) olması nedeniyle bilirubin yükü artmakta, karaciğerde UGT ekspresyonunun gecikmesi bilirubin klirensini azaltmaktadır (14). Preterm bebekler klasik kernikterusa ilaveten işitsel ağırlıklı düşük bilirubin kernikterusu riski altındadır (22). İnvitro çalışmalarda immatür nöron ve astrositlerin bilirubin toksisitesine daha duyarlı oldukları, mikroglia kaynaklı immün inflamasyonun bilirubin nörotoksitesinde rol oynadığı gösterilmiştir. CD1 fare beyninden izole edilen mikroglialar 2 ve 16 günlükken, orta/ağır hiperbilirubinemiye karşılık gelen 50/100 nM bilirubinle inkübe edildiğinde, 16 günlük mikroglialar etkilenmezken; 2 günlük mikrogliaların aktive oldukları, GLT-1, iNOS, inflamatuvar sitokinlerin, MHCII, arginase 1 ve miR-124

hariç tüm inflammatuar miRNA'ların eksprese olduğu ve genç mikrogliaların bilirubin toksisitesine çok daha duyarlı oldukları saptanmış (98). Kernikters nedeniyle kaybedilen 32^{5/7} haftalık bir bebeğin beyin otopsi bulguları, sarılığı olmayan, biri sepsis ve hipoksi, diğeri pnömoni ve hipoksiye bağlı kardiyorespiratuvar yetmezlik nedeniyle kaybedilen preterm ve term iki bebeğin bulgularıyla karşılaştırıldığında; kernikteruslu preterm bebekte bilirubine bağlı mikrovaskülerizasyonda, parankimal albüminde ve efflux membran proteinleri MRP1 ve Pgp'de artış saptanmış. Hipokampus, corpus striatumda perivasküler albümin artışının, mikrovasküler permeabilite artışının kanıtı olduğu; serbest bilirubin yanında albümine bağlı bilirubinin de beyin parankimine geçip birikerek kernikterus riskini arttırdığı; efflux membran proteinleri MRP1 and Pgp'nin artışına rağmen, bilirubin nörotoksitesinin önlenemediği yorumu yapılmış (99). Çalışmamızda sarılık grubunda preterm doğum sıklığı (%25,2), kontrol grubuyla (%10) istatistiki olarak farklı olmasa da, preterm doğum, kan uyuşmazlıklarından sonra ciddi hiperbilirubinemi etyolojisinde 2. sırada yer aldı. Sarılık grubundaki pretermelerin %62'inde ABE, %20,6'sında orta veya ağır ABE gelişti.

Bülbül ve ark.nın çalışmasında sarılığın fark edilme zamanı 3,5±2,1 gün, hastaneye getirilme zamanı 5,8±3,6 gün olarak bildirilmiş (92). Çakmak ve ark.nın çalışmasında, bebeklerinde sarılık farkedilen annelerin %43,8'inin hemen, %14,3'ünün bir süre gözledikten sonra sağlık kuruluşuna başvurduğu; %41,9'unun geleneksel iyileştirme yöntemlerini uyguladığı saptanmış (100). Çalışmamızda, ciddi hiperbilirubinemili hastaların literatür ile uyumlu olarak hastaneye geç (4,9±3,4 gün) başvurdukları görüldü. Hastaneye geç başvuruların, yenidoğan sarılığı konusundaki bilgilerin yetersizliğinden kaynaklandığı düşünüldü.

APA 2004 kılavuzunda, ilk 24 saat içinde sarılık görülmesi ve önceki kardeşle fototerapi öyküsü ciddi hiperbilirubinemi gelişmesi açısından majör risk faktörleri içinde bildirilmiştir (19). ABD'de 3301 bebeğin retrospektif olarak değerlendirildiği bir çalışmada, diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak, sarılıklı kardeş ve ciddi hiperbilirubinemili kardeş öyküsü varlığının, sarılık riskini 3,1 kat, ciddi hiperbilirubinemi riskini 12,5 kat arttırdığı saptanmış; hiperbilirubinemi rekürrensinde genetik faktörlerin rolü vurgulanmış (101). Çalışmamızda sarılık grubunda ilk 24 saat içinde sarılık görülme sıklığı %5,2, kardeşle fototerapi öyküsü %20,9 saptandı.

Çalışmalarda patolojik kilo kaybının yenidoğan sarılığı için risk faktörü olduğu bildirilmiştir (88,92,93,102,103). Patolojik kilo kaybı, bebeğin beslenme sorunlarını yansıtmakta; sık emzirmeyen, dolayısıyla yeterli kalori alamayan bebeklerde şiddetli hiperbilirubinemi riski artmaktadır. Salas ve ark.nın çalışmasında, anne sütüyle beslenen bebeklerde patolojik kilo kaybının non-hemolitik ciddi hiperbilirubinemi riskini yaklaşık 4 kat arttırdığı saptanmış (104). Ebbesen ve ark.nın çalışmasında, kalıtsal ve çevresel faktörleri benzer ikizlerde tartı kaybı ile hiperbilirubineminin doğru orantılı olduğu görülmüş (103). Erdev ve ark.nın çalışmasında (2018), sarılık nedeniyle hastaneye yatan bebeklerin %12,4'ünde doğum ağırlığına göre %10'dan fazla tartı kaybı saptanmış ve ciddi hiperbilirubinemi için 2. önemli risk faktörü olduğu görülmüş (88). Çalışmamızda ciddi hiperbilirubinemili bebeklerin %17,3'sinde \geq %10 kilo kaybı saptanmış olup; tartı kaybı, ABO uyumsuzluğu ve prematüre doğumdan sonra ciddi hiperbilirubinemi için 3. önemli risk faktörüydü.

APA 2004 kılavuzunda, sadece anne sütü ile beslenen bebeklerde yetersiz emzirme ve buna bağlı aşırı kilo kaybı ciddi hiperbilirubinemi için majör risk faktörü olarak bildirilirken, mamayla beslenme riski azaltan faktörlerden biri olarak bildirilmiş (19). Çalışmamızda sarılıklı bebeklerin %79,1'i sadece anne sütü ile, %19,1'i anne sütü ve formüle ile, %1,8'i ise sadece formüle ile besleniyordu. Sarılık grubundaki bebeklerin çoğunun anne sütüyle beslenmesi ve %17,3'ünde patolojik tartı kaybı saptanması; yetersiz anne sütüne bağlı kalori eksikliğinin ciddi hiperbilirubinemide rol oynadığını göstermektedir.

Türkiye'de doğan Suriyeli mülteci sayısı her yıl artmakta, mülteciler için sağlık bakımı sorun olmaya devam etmektedir. Bozkurt ve ark. nın çalışmasında (2020) mülteci olmanın ABE gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğu; ancak ciddi hiperbilirubinemi nedenleri Suriyeli mülteciler ve Türk vatandaşları arasında benzer bulunmuş (90). Çalışmamızda sarılık grubundaki bebeklerin %7,9'u Suriyeli idi.

Akraba evliliği oranının yüksek olması, hiperbilirubinemi riskini arttıran galaktozemi, G6PD eksikliği, pirüvat kinaz eksikliği, Crigler Najjar sendromu, UGT1A1 mutasyonları gibi genetik geçişli hastalıkların sıklığını arttırmaktadır (2,105-107). Çalışmamızda sarılık grubunda akraba evliliği oranı (%29,9) kontrol

grubuna (%3,3) göre 9 kat yüksek olup; ciddi hiperbilirubinemi gelişme riskini 10,7 kat arttırdığı saptandı.

Şiddetli hiperbilirubinemi etyolojisi, aynı ülkenin bölgeleri içinde bile genetik faktörlere ve coğrafi konuma bağlı olarak farklılık gösterebilir (108). Tiker ve ark.nın çalışmasında (2006) ciddi hiperbilirubinemi nedenleri, izoimmünizasyon (%20), sepsis (%7,5), G6PD eksikliği (%5), hipotiroidi (%1,4) olarak belirlenmiş; %65,6'sında neden bulunamamış (109). Katar ve ark.nın çalışmasında (2008) Diyarbakır bölgesinde ortalama sTB düzeyi 35 mg/dl olan ve %76'sında klinik ensefalopati saptanan 21 bebekte etyolojide kan grubu uyumsuzluğu %38, G6PD eksikliği %19,5 sıklıkta bulunmuş ve %47,6'sında neden bulunamamış (107). Erdev ve ark.nın çalışmasında (2018) hemolitik sarılık (%28,9) ve beslenme yetersizliğine bağlı dehidratasyon (%27,6) hiperbilirubineminin; ABO uyumsuzluğu (%21,3), Rh uyumsuzluğu (%5,3), subgrup uyumsuzluğu (%0,8) ve G6PD eksikliği (%0,5) hemolitik sarılığın en sık nedenleri olarak saptanmış. Diğer nedenler ise anne sütü sarılığı (%12,6), prematürite (%8,5), sefalhematom (%2,2), polisitemi (%1,8) olup; %18,4'ünde neden bulunamamış (88). Sgro ve ark.nın çalışmasında (2006) ABO uyumsuzluğu ve G6PD eksikliği ciddi hiperbilirubineminin en sık iki nedeni olarak bulunmuş (94). Çalışmamızda, ciddi hiperbilirubinemili bebeklerde etyolojide ilk sırada ABO uyumsuzluğu (37,4) takiben prematürite (%25,2), immün hemolitik hastalık (%20,9), \geq %10 kilo kaybı (%17,3), kalıtsal enzim eksiklikleri (%14,7), sepsis (%10,4), üriner infeksiyon (%9,5), MCHC(\geq 36) yüksekliği (%8,7), hipotiroidi (%6,1), polisitemi (%3,4), sefalhematom (%1,7), Crigler Najjar tip 2 (%0,9) saptanırken; önceki çalışmalardan farklı olarak UGT1A1 geninde promoter polimorfizminin sıklığı (%23,4'ünde heterozigot, %7,9'unda homozigot) ve nedeni bulunamayan hasta oranının düşüklüğü (%0,9) idi. İmmün hemolitik sarılığın en sık nedeni ABO uyumsuzluğu (%10,4), kalıtsal enzim eksikliğinin en sık nedeni G6PD eksikliği (%12,7) idi.

APA 2004 kılavuzunda, ciddi hiperbilirubinemi için majör risk faktörleri kan grubu uyumsuzluğu, direkt Coombs pozitifliği, diğer hemolitik hastalıklar ve G6PD eksikliği olarak bildirilmiştir (19). ABO uyumsuzluğuna bağlı hemolitik hastalık, indirekt hiperbilirubineminin en önemli nedeni olarak bildirilmektedir (88,91,95,103,109). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ABO uyumsuzluğu %21,3-34,

Rh uyumsuzluğu %5,4-21,4, subgrup uyumsuzluğu %0,8-2,6 sıklıkta, çalışmamızda ise sırasıyla %37,4, %7,4 ve %14,7 sıklıkta saptandı (88,90,93,110,111). Erdeve ve ark.nın çalışmasında (2018) sarılık nedeniyle hastaneye yatırılan bebeklerde DC pozitifliği %13,1 olarak bildirildi (88). Çalışmamızda ciddi hiperbilirübinemili hastalarda DC pozitifliği %20, ABO ve Rh uyumsuzluğu saptananlarda sırasıyla %13,8 ve %4,3 idi. Sarılık alt gruplarında Rh uyumsuzluğu sıklığı benzer iken; ABO (p=0,003) ve subgrup uyumsuzluğu (p=0,039) sıklığı farklı olup; Grup 2’de ABO, Grup 3’de subgrup uyumsuzluğu belirgin yüksekti. Ülkemizde anne/bebek kan grubu taramaları, Rh immünoprofilaksi uygulamalarının aksamasının (2), ABO/Rh hemolitik hastalık riskini arttırdığı düşünülür.

G6PD eksikliğinin sıklığı coğrafi konum ve etnik kökene göre değişmektedir (88). G6PD eksikliği kuşağında olan ülkemizde sıklık %4-9, sarılıklı ve ciddi hiperbilirübinemili bebeklerde sıklık %0,5-19,2 olarak bildirilmiş (88,90,110,111). Çalışmamıza Güneydoğu Anadolu (%29,6), Ege (%28), Marmara (%25,1), İç Anadolu (%13), Akdeniz (%2,6), Doğu Anadolu (%1,7) bölgelerinden kabul edilen 115 ciddi hiperbilirübinemili hastanın 98 (%85,2)’inde G6PD enzim düzeyi çalışıldı ve 15/98 (%15) bebekte G6PD eksikliği saptandı.

Pirüvat kinaz eksikliği, ABD’de Coombs (-), sferositik olmayan hemolitik hastalığın G6PD’den sonra en yaygın ikinci kalıtsal nedenidir ve 1/20.000 sıklıkta görülmektedir (112). Çalışmamızda ciddi hiperbilirübinemili 115 bebeğin 68’inde pirüvat kinaz enzim düzeyi çalışılmış; 3/68 (%4,4) hastada pirüvatkinaz eksikliği, 1 hastada (%0,9) G6PD ve pirüvatkinaz eksikliği birlikteliği saptandı. Sarılık alt gruplarında G6PD eksikliği istatistiki olarak farksızdı.

Gilbert ve Crigler-Najar sendromları, UDPGT enziminin promoter ve kodlayan bölgelerindeki mutasyonların enzimde yapısal ve fonksiyonel bozukluğa yol açması sonucu gelişmektedir (35). Travan ve ark.nın çalışmasında (2014), non-hemolitik sarılıkta TA7 promoter polimorfizminin, şiddetli neonatal hiperbilirübinemi için majör risk faktörü olmadığı bildirilmiş (113). Ülkemizde sTB≤16.5 mg/dl ve sTB≥17 mg/dl olan yenidoğanlarda TA6/7 sıklığı %40 ve %32.6, TA7/7 sıklığı %13 ve %8.2 olarak saptanmış ve Türk çocuklarında promoter polimorfizmi ile hiperbilirübinemi ve uzamış sarılık açısından ilişki olmadığı bildirilmiş (114,115). Halis ve ark.nın çalışmasında (2017), TA6/7 ve TA7/7 sıklığı

nedeni bilinmeyen sarılık grubunda (sTB:19,3±1,4 mg/dL) %36 ve %18, ABO(+) sarılık grubunda (sTB: 20,1±1,7 mg/dL) %32 ve %26 saptanmış; heterozigot ve homozigot promoter polimorfizminin, anne sütüyle beslenen bebeklerde ek ikterojenik faktörler olmaksızın ciddi hiperbilirübinemi için risk faktörü olduğu bildirilmiş (35). Çalışmamızda ciddi hiperbilirübinemili bebeklerde TA6/7 ve TA7/7 polimorfizmi sıklığı sırasıyla %23,4 ve %7,4 olup; sarılık alt gruplarında heterozigot ya da homozigot promoter polimorfizmi açısından istatistiki farklılık saptanmadı (p=0,931).

APA'nın 2004 kılavuzunda (19), sefal hematoma veya belirgin ekimoz varlığı ciddi hiperbilirübinemi gelişimi için majör risk faktörleri arasında bildirilmiştir. Sefal hematoma sıklığı çalışmamızda %1,7, Erdev ve ark.nın çalışmasında %2,2 olarak saptanmıştır (88).

Konjenital hipotiroidi, dünya genelinde canlı doğumlarda 1/2000-3000, iyot eksikliği bölgelerinde 1/700-800 sıklıkta görülmektedir. Ülkemizde konjenital hipotiroidi sıklığının 2012'den sonra 1/400 gibi yüksek oranlarda saptanmasının nedeni, "gecici TSH yüksekliklerinin" de hipotiroidi tanısı ile tedavi edilmesiyle açıklanmaktadır (116). Ülkemizde idrar iyot düzeyi değerlendirilerek iyot eksikliği sıklığı, 1444 gebede (<150 µg/L) %74, bebeklerinde (<100µg/L) %51 bulunmuş olup; konjenital hipotiroidi sıklığının yüksek oranlarını açıklamaya yardımcı olabilir (117). Çalışmamızda konjenital hipotiroidi sıklığı %6,1 olarak saptandı.

Polisitemi tüm canlı doğumlarda %1,5-4 sıklıkta görülmektedir (118). Polisitemi sıklığı Erdev ve ark.nın çalışmasında (2018) %1,8 (88), Günay ve ark.nın çalışmasında %5,4 (110), Katar ve ark.nın çalışmasında %5 (111) bildirirken, çalışmamızda bu oran %3,4 idi.

Yaşamın ilk üç gününde üriner enfeksiyon görülme oranı ABD'de %0-1 iken, gelişmekte olan ülkelerde %1,8'e kadar çıktığı bildirilmektedir (119). Üriner enfeksiyon erkeklerde daha sık görülmekte; en sık E. Coli, Klebsiella, Enterobakter gibi gram (-) bakteriler ve kandida türleri etken olmaktadır (119). Bilgen ve ark.nın çalışmasında nedeni bilinmeyen sarılığı olan (sTB:15-26 mg/dl), 5.7±2.5 günlük 102 yenidoğanda kültür (+) üriner enfeksiyon sıklığı %8, etkenler Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli olarak saptanmış (120). Çalışmamızda sarılığı 4,9±3,4 günlükken başlayan bebeklerde

üriner enfeksiyon sıklığı benzer (%9,5) olup, etkenler E.Coli, Klebsiella, metisilin dirençli stafılakok, metisilin duyarlı staf aureus, staf.epidermidis ve citrobacter freundi idi.

Yenidoğanlarda morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri olan sepsis, APA 2004 kılavuzunda, nörotoksisite risk faktörleri arasında bildirilmiştir (19)(121). Ciddi hiperbilirübinemili hastalarda sepsis %1-12 sıklıkta bildirilmiş (91,95,122); bir metaanalizde düşük ve orta gelirli ülkelerde ciddi hiperbilirübinemi ve bilirübine bağlı ensefalopati riskini sepsisin 9 kat arttırdığı saptanmış (123). Elhawary ve ark.nın prospektif çalışmasında fototerapi sonrası yeniden fototerapi gerektiren rebound hiperbilirübinemi riskini hemolizin 3.1 kat, sepsisin 12.6 kat arttırdığı bildirilmiş; sepsisin hem katabolizmasını ve neonatal eritrositlerin hemolizini artırarak etkili olabileceği ileri sürülmüş (124). Çalışmamızda sepsis sıklığı %10,4, Grup 1, Grup 2, Grup 3'teki sıklığı sırasıyla %25, %33,3 ve %42 olup, sarılık şiddeti arttıkça sepsis sıklığının arttığı (0,015); sepsis veya üriner enfeksiyon varlığının ABE gelişmesi riskini 6,4 kat arttırdığı (p=0,016) görüldü. En sık saptanan mikroorganizma koagülaz negatif stafılakok (%45,4) iken diğer etkenler; staf. Epidermidis (%27,2), staf. Hominis (%9,1), corynebacterium striatum (%9,1) ve corynebacterium minitissimum (%9,1) idi.

Crigler-Najjar sendromu (CNS) bir milyon canlı doğumda yaklaşık 0,6-1 sıklıkta görülmekte, fenobarbital tedavisine yanıt, klinik kriterler ve moleküler özelliklere göre alt tiplere ayrılmaktadır (125). Çalışmamızda, UGT1A1 geni ekzon 5'te, homozigot c.1384T>C mutasyonu saptanan ve fenobarbital tedavisine yanıt veren bir olguya (%0,9) Crigler Najjar Tip 2 tanısı konuldu.

Total bilirübin, yenidoğanlarda hiperbilirübinemiye saptamak, kernikterus riskini tahmin etmek için en sık kullanılan testtir; ancak pretermelerde bilirübin bağlama kapasitesinin azalması nedeniyle, serbest bilirübin konsantrasyonu gösterilemeyeceğinden; total bilirübin yerine bilirübin/albumin oranının kullanılması daha uygundur (126,127). Gamal ve ark.nın çalışmasında (2011), nörotoksisite için risk faktörleri olmayan bebeklerin 25-30 mg/dl bilirübin düzeylerini iyi tolere edebildiği; ABE için eşik sTB düzeyinin 31,5 mg/dL olduğu saptanmış (89). ABE gelişen bebeklerde ortalama sTB düzeyi, Erdev ve ark.nın çalışmasında 35,9±5,7 mg/dL (88), Bozkurt ve ark.nın çalışmasında 33,9±6,6 mg/dL saptanmış (90). Serum

TB/Alb>6,5 olanların oranı; Erdeve ve ark.nın çalışmasında %10,5, sTB/Alb oranı Bozkurt ve ark. nın çalışmasında 9,6±1,9 mg/dl saptanmış (88,90). Çalışmamızda sarılık şiddeti arttıkça Grup 1'den Grup 3'e doğru sTB düzeyinin sırasıyla 21,6±1,3'ten 26,7±1,3 ve 33,9±4,87 mg/dL'ye arttığı; sTB/Alb oranının 6,1±0,7'den 7,5±0,9'a ve 9,3±1,5'e arttığı; sTB/Alb>6,8 olan hasta sıklığının %7,8'den %20,9 ve %13,9'a arttığı saptandı (p<0,001). BİND skoruna göre hafif, orta, ağır ABE gelişenlerde sTB düzeyleri sırasıyla 23,9±2,7, 27,1±3,8, 34,8±5,7, sTB/Alb oranları 6,7±0,9, 7,5±1,5, 9,8±1,7 saptandı.

APA 2004 kılavuzunda, sarılık nedeniyle tedavi gerektiren hastalarda retikülosit sayısının bakılması önerilmiştir(2,19). Erdeve ve ark.nın çalışmasında hastaneye yatırılan sarılıklı bebeklerde retikülositozun ABE gelişimi ve kan değişimi riskini arttırdığı bildirilmiş (88). Çalışmamızda retikülosit sayısının sarılık şiddeti arttıkça (Grup1/Grup2/Grup3'te sırasıyla %2,1±2,6/ %3,3±2,4/ %3,3±3,8) arttığı (p<0.001), kan değişimi yapılan bebeklerde (2,4±2,51 ve 4,1±3,9, p=0,023) arttığı, BİND≥4 olanlarda (%2,1±2,49 ve %3,3±3,3, p=0,034) arttığı saptandı.

Neonatal mortalite ve morbidite nedeni olan ABE, zamanında ve önleyici müdahaleler ile engellenebilir. Nörolojik sonuçların sTB düzeyi ile korelasyonu değerli olsa da, bilirubin toksisitesine duyarlılığı hazırlayan risk faktörlerinin karmaşık etkileşimi nedeniyle, güvenli bir sTB düzeyi belirlemek zordur (127,128). sTB düzeyinden bağımsız olarak nörolojik sekellerin güçlü bir prediktörü olan BİND skoru, ABE'nin varlığı, şiddeti, tedavinin planlanması ve tedaviye klinik yanıtın değerlendirilmesinde hekimlere rehberlik edebilir (23). Hameed ve ark.nın çalışmasında (2021), sTB≥25mg/dL olan yenidoğanlarda sTB>30mg/dL ve BİND skorunun≥4 olması olumsuz sonuçların temel belirleyicileri olarak saptanmış (126). El Houchi ve ark.nın çalışmasında (2017), ciddi hiperbilirübinemili (sTB:29,7 mg/dL) bebeklerde BİND skorunun sTB düzeyi ile korele olduğu; BİND skoru≥4 olmasının nörolojik olumsuz sonuçları tahmin etmede sensitivite ve spesifitesinin %97,4 ve %87,3 olduğu saptanmış. Ağır ABE'li bebeklerin ya öldüğü ya da nörolojik/işitsel hasar geliştiği; orta ABE'li hastaların %62,5'nin agresif müdahaleyi takiben ve izlemde düzeldiği; hafif ABE'li ancak sTB: 33,5-38 mg/dL olan 3/73 bebekte nörolojik ve/veya işitsel bozukluk geliştiği bildirilmiş. Bu çalışmada BİND skoru≤3, ancak sTB≥36,5 mg/dL olan 5/39 hastanın sonuçlarının 3-5. ayda normal

olduğu rapor edilmiş (23). Çalışmamızda sarılık grubundaki hastaların %34,8'i normal, %40,9'u hafif ABE, %14,8'i orta ABE, %9,5'i ağır ABE olarak değerlendirildi. Sarılık şiddeti arttıkça ağır ABE oranı Grup1'de %0'dan Grup2'de %6,3'e, Grup 3'te %56,2'ye arttığı ($p<0.001$); BİND skoru ile sTB düzeyleri ve sTB/Alb oranları arasında pozitif korelasyon saptandı ($p<0,001$). Son çalışmalarda, atetoid serebral palsi, yukarı bakış paralizisi, işitme kaybı gibi kernikterusun karakteristik bulgularını göstermeyen, ancak BİND saptanan hastalarda bilişsel gecikme, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, spesifik öğrenme bozukluğu, otizm spektrumu hastalıkları ve dil gelişim bozuklukları geliştiği bildirilmektedir (129). Helsinki çalışmasında, sTB ≥ 20 mg/dL olan veya kan değişimi yapılan bebeklerin 9 yaşında IQ skoru kontrollere göre düşük bulunmuş (130). Çalışmamızda sTB ≥ 20 mg/dl olan bebeklerin %55.7'sinin BİND skoruna göre hafif veya orta ABE olduğu düşünülürse, buzdağının görünmeyen yüzünün büyüklüğü ve potansiyel tehlikesi daha iyi anlaşılacaktır.

İşitme kaybı sıklığı, sağlıklı term doğumlarda 1-3/1.000 iken, pretermelerde ve YYBÜ'de izlenen bebeklerde %1-6 olarak rapor edilmektedir. Ülkemizde işitme kaybı sıklığı sağlıklı term yenidoğanlarda 2,2/1.000, YYBÜ'de yatan bebeklerde %1,4-2,9 olup, literatürle uyumludur (85). Neonatal hiperbilirubinemi çalışmalarında sTB düzeyleri arttıkça işitme bozukluğu ve nörogelişimsel sorunların arttığı kanıtlanmıştır (127,128). El Houchi ve ark.nın çalışmasında hayatta kalan 145 hiperbilirubinemili bebekte 3-5 aylıkken, BİND skorunun, nörolojik/işitsel sorunları öngörme başarısı değerlendirilmiş; BİND skoru 0 olan bebeklerin tümünde işitme normal iken; BİND skoru 1-3 olan hafif ABE'li bebeklerin %2,7'sinde, BİND skoru 4-6 olan orta ABE'li bebeklerin %37.5'inde, BİND skoru 7-9 olup hayatta kalan ağır ABE'li bebeklerin tümünde şiddetli sensörinöral işitme kaybı saptandığı; BİND skorunun ≥ 4 olmasının, uzun vadeli işitme bozukluğunu %92,6 sensitivite ve %87,3 spesifite ile öngördüğü bildirilmiş (23). Çalışmamızda kontrol grubundaki bebeklerin tümü, ciddi hiperbilirubinemili bebeklerin 78,3'ü işitme testinden geçerken; %21,7'si işitme testinden "kaldı". Sarılık alt gruplarında sarılık şiddeti arttıkça işitme testinden kalanların oranı Grup 1,2,3'te %14,9, %28,1, %37,5 olarak arttı; ancak istatistiki farklılık saptanmadı ($p=0,092$). İşitme testi sonuçları BİND skoruna göre değerlendirildiğinde, BİND skoru arttıkça işitme testinden kalanların arttığı saptandı

($p < 0.001$). İşitme kaybının, BİND skoru “0” olan ciddi hiperbilirübinemili bebeklerde bile (%7,5), hem ülkemizdeki sağlıklı yenidoğanların (2/1000), hem de YYBÜ’de yatan bebeklerin (%1,4-2.9) sonuçlarından yüksek olduğu, hafif, orta, ağır ABE’li bebeklerde %19,1’den, %35,3 ve %63,6’ya çıktığı görüldü. Bu sonuç, bilirübin nörotoksitesinin bir bulgusu olan işitme kaybının, sTB düzeyinden ziyade nörotoksisiteyi etkileyen pek çok klinik faktörü yansıtan BİND skorlaması ile paralellik gösterdiğini, hiperbilirübinemili her hastada BIND skorlamasının yapılması gerektiğini vurgulamaktadır. Sonuç olarak BİND skorlama sistemi, yatakbaşında hızla uygulanabilen, değerlendirmesi kolay, ucuz, kısa/uzun vadede bilirübin nörotoksitesini gösteren ABR testinin sonuçları ile de uyumludur.

Kernikterus bazal ganglionları özellikle globus pallidus etkilemektedir (20). Akut bilirübin ensefalopatisinin ileri evrelerinde term yenidoğanda MR’da dentato-talamo-kortikal yolak içinde belli bölgelere lokalize belirgin, akut sınırlı difüzyon paterni gözlenmektedir. Wisnowski ve ark.nın çalışmasında (2016) BİND gelişen bebeklerde, MR bulgusu olarak dentato-talamo-kortikal yola lokalize sinyal artışı gösterilmiş (131). Kraniyal MR, kernikterus tanısında önemli bir yere sahip olmakla birlikte her zaman klinik bulgularla korele değildir (107,132); Katar ve ark.nın çalışmasında (2008) ortalama sTB düzeyi $35 \pm 10,8$ mg/dL olan 21 hastanın %76’sında nörolojik muayenede kernikterus bulguları saptanırken, %71’inde kraniyal MR’da patolojik bulgu görülmüş. Nörolojik muayenesi normal olan iki hastada kraniyal MR’da kernikterus bulguları, nörolojik muayenesi kernikterus ile uyumlu üç hastada normal MR bulguları saptanmış. Yılmaz ve arkadaşlarının çalışmasında (2001) şiddetli hiperbilirübinemi öyküsü olan 10 hastanın 8-52 aylık iken çekilen kraniyal MR’ları değerlendirilmiş; nörolojik bulgusu olmayan iki hastanın MR bulguları da normal, nörolojik bulgusu olan 8 hastanın 7’sinde globus pallidusta simetrik T2 sinyal artışı saptanmış. Çalışmamızda BİND skorları “7, 7, 7, 7, 5, 4”, sTB düzeyleri “46, 40.3, 30.2, 29.8, 29.2, 26.4 mg/dl,” işitme testi sonuçları “kaldı, kaldı, kaldı, geçti, geçti, geçti” olan 6 hastada 3., 60., 60., 30., 5. ve 30. günlerde T1,T2, Difüzyon ağırlıklı çekilen MR sonuçları, ilk hasta dışında normal olarak rapor edildi. Erken (3-60. günler) MR çekimlerinin, BİND tanısında yararlı olmadığı; kernikterusun erken tanısında yeni biyobelirteçlere ihtiyaç olduğu düşünüldü.

Toplumda hiperbilirubineminin zararlı olabileceği bilincinin yerleşmesi, RhD immünoprofilaksisi, hiperbilirubinemi izleminin geliştirilmesi gibi önlemler, fototerapi ve kan değişimi gibi tedaviler BİND ve kernikterus sıklığını önemli oranda azalacaktır (133). Erdev ve ark.nın çalışmasında (2018) sarılık nedeniyle hastaneye yatan bebeklere fototerapi yanında %2,3'üne kan değişimi (88). Katar ve ark.nın çalışmasında, 56 bebeğin %86'sına (111); Kuzniewicz ve ark.nın çalışmasında sTB \geq 30 mg/dL olan bebeklerin %36'sına (86); Gamal el Din ve ark. nın çalışmasında sTB \geq 25mg/dL olan 249 hastanın %83'üne kan değişimi uygulandığını bildirilmiş (89). Çalışmamızda sarılık grubundaki hastaların tümüne fototerapi, %13,9'una IVIG, %13,9'una kan değişimi, %4,3'üne IVIG+kan değişimi, %1,7'sine fototerapi+fenobarbital uygulandı. IVIG+kan değişimi uygulanan hastaların 5'inde DC (+) ABO uyuşmazlığı olup; sTB değerleri 26,1, 26,4, 29,6, 30,2 ve 41,1 mg/dL idi. Fototerapi+fenobarbital uygulanan iki hastadan biri Crigler-Najar tip2 tanılı iken, sTB'i 46 mg/dL olan hastaya konvülsiyon geçirmesi nedeniyle fenobarbital başlandı.

Erdev ve ark.nın çalışmasında kan değişimi riskini direkt Coombs pozitifliği 2.6 kat, retikülositoz 7.1 kat, sTB/Alb oranı \geq 6,5 19,8 kat artırdığı; ABE riskini erkek cinsiyet, hemolitik bir neden, retikülositoz ve sTB/Alb oranı yüksekliğinin artırdığı saptanmış (88). Bozkurt ve ark.nın çalışmasında ise (2020) erkek cinsiyet, Rh izoimmünizasyonu, erken taburculuk ve G6PD eksikliği ABE gelişimi ile; Rh izoimmünizasyonu, G6PD eksikliği ve mülteci olma kan değişimi riskinde artış ile ilişkili bulunmuş (90). Çalışmamızda hiperbilirubinemi riskini normal doğum 4,1 kat, akraba evliliği 10,7 kat, ABO uyuşmazlığı 5,4 kat artırdı. Kan değişimi riskini sTB/Alb oranı artışı 4,7 kat, sTB/Alb \geq 6,8 olması 27,4 kat, G6PD eksikliği 1,4 kat ve ABO uyuşmazlığı 2,1 kat artırdı. İşitme kaybı riskini, \geq %10 kilo kaybı 1,8 kat, ABO uyuşmazlığı 3,3 kat, sTB/Alb oranı 1,5 kat, sTB/Alb \geq 6,8 olması 2,2 kat artırdı. ABE riskini, D .Coombs pozitifliği 3 kat, ABO uyuşmazlığı 2,8 kat, sTB/Alb oranı 2,5 kat, sTB/Alb \geq 6,8 olması 6,3 kat artırdı.

MikroRNA'lar, hedef genlerin 3' translate edilmemiş bölgesine (3'-UTR) bağlanıp genin degradasyonunu indükleyerek ve/veya hedef mRNA'nın translasyonunu inhibe ederek gen ekspresyonunu baskılayabilmektedir. MikroRNA'lar ayrıca promoter bölgesini hedefleyerek gen transkripsiyonunu pozitif olarak düzenleyebilirler (134). Hücrel aktivitelelerin düzenlenmesi yanında,

inflamasyon, anjiyogenez, proliferasyon, apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçler ile de ilişkili bulunan (11,55,135). MikroRNA'lar hücrede kan, serum, plazma, tükürük, idrar, anne sütü, ter, safra, semen, amniotik, bronşiyal, serebrospinal, peritoneal, plevral ve seminal sıvı gibi biyolojik sıvılara da salgılanmaktadır. MikroRNA'lar hücrede HDL, Ago2 proteiniyle kompleks oluşturarak serbest formda ya da eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimler içinde kapsüle formda salınmaktadır. miRNA'lar, yetişkin ve pediyatrik popülasyonda, onkolojik (136), kardiyovasküler, nörodejenaratif hastalıklar (137-139) ve sepsis (138) gibi çeşitli hastalıklarda potansiyel biyobelirteçler olarak incelenmiş. Kan-beyin bariyerini kolayca geçerek sirkülasyona karıştıklarından; nörodejenaratif ve beyinle ilgili hastalıkların tanısında potansiyel biyomarkerler olarak eksozomların önemleri artmıştır (140). ROP (68), BPD (69), NEK (71), HİE (73,141,142), travmatik beyin hasarı (80,81), iskemik inme (82) gibi yenidoğan hastalıklarının patogeneğinde miRNA'ların inflamasyon, nöroinflamasyonla ilişkisi araştırılmış; ancak bilirubin toksisitesi aracılı nöroinflamasyonla ilişkili, UGT1A1 enzim ekspresyonu ile ilişkili miRNA'ları araştıran bir klinik çalışma bulunmamaktadır.

Ciddi hiperbilirübinemiye bağlı nörotoksisitede rol oynayan iki esas patolojik sürecin, uridin difosfoglikuronozil transferaz 1A1 (UGT1A1) enzim ekspresyonunun azalması ve nöroinflamasyon olduğu bilinmektedir. Karaciğerde IB'in UGT1A1 enzimiyle konjuge edilerek safrayla atılması, nörotoksisiteyi kontrol altında tutan hız sınırlayıcı bir metabolik bariyerdir. UGT1A1 ekspresyonunun artırılması, UGT1A1 enzim aktivitesini azaltan faktörlerin inhibisyonu nörotoksisitenin önlenmesinde önemli iki strateji gibi görünmektedir (32). UGT genlerindeki polimorfizmler ve transkripsiyonel regülasyondaki değişimler, UGT1A enzimlerinin ekspresyonu ve/veya aktivitesinde değişikliklere neden olduğundan; UGT1A1 enzim ekspresyonunun miRNA aracılı modülasyonu, ABE ve kernikterus yönetiminde etkili sonuçlar doğurabilir (143).

Yenidoğanlarda serbest bilirubin konsantrasyonlarının artışı; nöronlarda ve glial hücrelerde geçici veya kalıcı hasara neden olmaktadır. IB'in, oligodendrosit olgunlaşmasını ve miyelinizasyonu bozarak, astrosit ve mikroglia'yı aktive ederek nöronlara ve glial hücrelere zarar verdiği gösterildi (98). BİND oligodendrositler, astrositler, mikroglialar ve nöronları aktif olarak etkileyen entegre bir sinir hücresi

hastalığı olduğundan (36); mikroglia aktivasyonunun modülasyonu, gelecekte BİND'ı önlemek için umut verici bir terapötik hedef olabilir (43). Mikroglianın aktivasyonu yönlendirilebilir bir süreç olup, proinflamatuvar M1 fenotipi nörotoksik, anti-inflamatuvar/onarıcı M2 fenotipi nöroprotektif olarak kabul edilmektedir (43). Mikroglia polarizasyonu-miRNA ilişkisini araştıran çalışmalarda, miR-155, miR-146a'nın mikroglianın M1 polarizasyonu ile, miR-124, miR-21 ve miR-145'in M2 polarizasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (144-145).

İB'nin mikroglia'yı aktive ederek toksisiteye neden olduğu ilk defa 2006 yılında Gordo ve arkadaşları tarafından gösterildi (37). Vodret ve ark.nın çalışmasında (2018), ciddi hiperbilirübinemili yenidoğan fare modelinde nöroinflamasyonun, BİND ve nöro-davranışsal anormalliklerin kilit faktörü olduğu gösterilmiş (8). Vaz ve ark.nın deneysel çalışmasında (2019); iki günlük fare kortikal beyninden izole edilen mikroglia hücreleri, invitro-2 ve invitro-16 günlükken 24 saat süreyle orta/şiddetli neonatal hiperbilirübinemiye karşılık gelen 50/100 nM serbet bilirübinle inkübe edilmiş. Hem invitro-2 (genç, ameboid / reaktif) hem de invitro-16 (yaşlı, dinlenen / tepkisiz) mikroglia hücrelerinde apoptozun görüldüğü; 50/100 nM serbest bilirübin konsantrasyonu ile genç mikroglia'da TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve proinflamatuvar yanıtı gösteren miRNA'ların (miR 155 /miR 125b /miR 21 /miR 146 a) arttığı ve anti-inflamatuvar miR-124'ün azaldığı gösterildi. Yaşlı mikroglia'da ise miR 21 /miR-125b değişmeden kalırken, miR-155, miR-146a, miR-124'ün azaldığı saptandı (98). Bu çalışma, bilirübin toksisitesinin mikroglia aktivasyonu sonucu proinflamatuvar sitokin sekresyonu ve miRNA ile ilişkili olduğunu; preterm ve term yenidoğanların hayatın ilk günlerinde bilirübin toksisitesine daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Çalışmamızda proinflamatuvar sitokinler çalışılmamakla birlikte, sarılık grubunda hem prematüre bebek oranı daha yüksek (%10'a karşılık %25,2), hem de bebeklerin postnatal yaşları invitro-2 grubuyla benzer olduğundan; ciddi hiperbilirübinemili bebeklerin mikroglialarının proinflamatuvar fazda olduğu, miRNA'ların proinflamatuvar yanıtı gösterdiği kabul edilebilir.

Sepsis, üriner enfeksiyon gibi sistemik inflamasyon varlığında, IL-1 β , TNF α gibi periferik sitokinler, bozulan kan-beyin bariyerinden beyne geçerek nöroinflamasyonu arttırabilirler. İlâveten, miRNA'ların kan beyin bariyerini tek

başına geçmesi olası olmasa da miRNA'lar eksozomlar içinde özellikle hasar gördüğünde kan-beyin bariyerini geçebilir (146). Çalışmamızda üriner enfeksiyon veya sepsis varlığının ABE riskini 6,4 kat arttırdığı görüldü. Bu sonuçlar, enfeksiyonun, bilirubin toksisitesine bağlı nöroinflamasyonu şiddetlendirdiğini desteklemektedir.

Çalışmamızda miR-21-3p'ye ilaveten, miR-93, miR-491-3p ve miR-210'un up-regüle olduğu, benzer şekilde miR-124'ün down-regüle olduğu görüldü. Yine sarılık grubunda miR-21-3p, miR-93, miR-491-3p'nin relatif kantitatif değerleri yüksek; miR-Let7a ve miR-124'ün relatif kantitatif değerleri düşüktü. Ağır ABE'li grupta miR-21-3p, miR-93 ve miR-491-3p'nin ekspresyon düzeyleri en yüksekti.

UGT1A1 enzim ekspresyonu ile ilişkili miRNA'ların değerlendirilmesi:

miR-21-3p: Makrofajlarda LPS tarafından indüklenen miR-21 ve miR-146, inflamasyonun çözülmesini destekler. MiR-21, IL-10 üretiminin bir inhibitörü olan PDCD4'ü inhibe ederek makrofajlarda IL-10 ekspresyonunu artırır. Ayrıca miR-21, LPS'e maruz bırakılan miyeloid hücrelerin apoptozunu zayıflatabilen FasL ve PTEN gibi pro-apoptotik genleri hedef alır (147). Rat beyni astrosit kültürlerinde 50 µM bilirubin toksik etkisiyle TLR4'ün arttığı (26); TLR agonistleri tarafından ekspresyonu indüklenen miR-21'in, PDCD4, FasL, PTEN genlerini hedefleyerek inflamasyonun resolüsyonunda görev aldığı bildirilmektedir (147). Vaz ve ark.nın invitro çalışmasında (2019); iki günlük fare beyninden izole edilen mikroglia hücreleri, 24 saat süreyle 50/100 nM bilirubinle inkübe edildiğinde, 2 günlük mikroglia hücrelerinde proinflamatuvar yanıtı cevap olarak miR-21'in arttığı gösterilmiş (98).

UGT1A enzimlerinin 3'UTR bölgesi polimorfik olup, miRNA bağlanmasını etkileyebilecek üç bağlantı bölgesi (rs10929303, rs1042640 ve rs8330) içerir. Papageorgiou ve ark.nın çalışmasında (2017), miR-21-3p'nin variant UGT1A 3'UTR'ye bağlanarak UGT1A ekspresyonunu baskıladığı; rs10929303'un miR-21-3p'nin variant 3'-UTR'ye bağlanmasını arttırdığı gösterildi. MikroRNA-21-3p mimiklerinin LS180 insan bağırsak hücrelerine transfeksiyonu, UGT1A1 ve UGT1A6 aracılı glukuronidasyonu ve mRNA'yı baskıladığı; miR-21-3p'nin primer

insan hepatositlerine transfeksiyonunun, CYP3A aktivitesini etkilemeden, bilirübin metabolizmasında rol alan UGT1A1 aktivitesini ve mRNA'yı baskıladığı görüldü. Kontrole kıyasla her bir miRNA mimikiyle transfekte edilmiş hepatositlerde UGT1A1 aktivitesinin % 20-30 oranında azaldığı saptandı (34).

Çalışmamızda bilirübin toksisitesine cevap olarak, kontrol grubuna göre sarılık grubunda miR-21-3p ekspresyonunun belirgin arttığı (%3,3' e karşılık %63,5 up-regülasyon, %86,7'ye karşılık %13,9 down-regülasyon) saptandı ($p < 0,001$). Sarılık şiddeti arttıkça, miR-21-3p upregülasyon oranının Grup1,2,3'de sırasıyla %46,2, %82,3, %100 olarak arttığı saptandı. miR-21-3p'nin relatif kantitatif değerleri, kontrol grubuna göre sarılık grubunda, Grup1 ve 2'ye göre Grup 3'te, ABE gelişmeyenlere göre ABE gelişen bebeklerde, kan değişimi yapılmayanlara göre kan değişimi yapılan bebeklerde daha yüksekti ($p < 0,001$). Yine BİND skoru arttıkça upregülasyon oranının arttığı, ağır ABE grubundaki hastaların %100'ünde upregülasyon geliştiği saptandı ($p < 0,001$). Lojistik regresyon analizi, miR 21-3p'nin, ciddi hiperbilirübinemi gelişmesi riskini 1.4 kat (OR 1,4, %95 CI 1,1–1,9, $p = 0,004$), kan değişimi gereksinimini 1.002 kat (OR 1,002, %95 CI 1-1,003 $p = 0,022$) arttırdığını gösterdi. Bilirübin artışına bağlı nöroinflamasyonun çözülmesini destekleyen miR-21'in, aynı zamanda karaciğerde UGT1A1 enzim aktivitesini azaltması, yenidoğanlarda hayatın ilk günlerinde antioksidan özelliklerine ihtiyaç duyulan bilirübin düzeyinin arttırılmasına yönelik ontogenik bir süreç olabilir. Bu nedenle, anti-miR 21-3p mimiklerinin UGT1A1 enzimi etkinliğinin artırılması ve ABE'nin engellenmesi üzerine etkilerinin dikkatle araştırılması gerektiğini düşünüyoruz.

miR-491-3p: Dluzen ve arkadaşlarının çalışmasında (2014); miR-491-3p'nin hepatik UGT1A enzimlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir faktör olduğu gösterilmiş. MikroRNA-491-3p mimikinin HuH-7 hücrelerine transfeksiyonu ile UGT1A1, UGT1A3 ve UGT1A6 mRNA seviyelerinin önemli ölçüde baskılandığı; HuH-7 hücrelerinde miR-491-3p ekspresyonu baskılandığında, UGT1A1 mRNA'da yaklaşık %80 artış görüldüğü saptanmış. Normal insan karaciğer panelinde, miR 491-3p ekspresyon düzeyleri ile mRNA düzeyleri arasında bir korelasyon saptanamazken; miR-491-3p ekspresyonu ile hem UGT1A3 hem de UGT1A6

mRNA düzeyleri arasında ters korelasyon saptanmış. MiR-491-3p karaciğer hücrelerinde eksprese edilmediğinde, UGT1A3 ve UGT1A6 mRNA düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu göstermektedir ki, UGT1A ailesi ortak bir 3'-UTR paylaşmasına rağmen; UGT1A'nın miR-491-3p ile post-transkripsiyonal regülasyonu subtip spesifik. (143). Wang ve arkadaşlarının çalışmasında (2018), Çin Han popülasyonunda UGT1A regülasyonunda miRNA'ların rolü araştırılmış; miR-491-3p gibi miR-298'in de UGT1A enzim gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiş. MikroRNA-491-3p ile UGT1A4 arasında benzer korelasyon görülürken; miR-491-3p ile UGT1A6 arasında böyle bir ilişki bulunamamış. UGT1A ekspresyonundaki bireysel farklılıklara, miRNA aracılı regülasyona ilaveten, tek nükleotid polimorfizmi, transkripsiyon faktörleri, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu gibi diğer faktörlerin de katkıda bulunabileceği; UGT1A regülasyonunda, miR-298 ve miR-491-3p'nin asıl etken değil, yardımcı oyuncular olabileceği yorumu yapılmış (148). Çalışmamızda miR-491-3p'nin sarılık grubunda (%66,1), kontrol grubuna (%13,3) göre istatistiki olarak anlamlı upregüle olduğu ($p<0,001$); sarılık altgruplarında miR-491-3p upregülasyonunun istatistiki açıdan anlamlı farklılık gösterdiği; ancak sarılık şiddeti ile ekspresyon değişimlerinin korele olmadığı saptandı. miR-491-3p'nin relatif kantitatif değerleri, sarılık grubunda kontrol grubuna göre ($p=0,03$), sarılık altgruplarında Grup 2'de Grup 1'e göre, kan değişimi yapılan hastalarda kan değişimi yapılmayanlara göre ($p=0,036$) belirgin yüksek idi. ABE gelişen ve gelişmeyen hastalar arasında farklılık saptanmazken; ağır ABE grubunda (%72,8) ABE gelişmeyenlere göre ($p=0,03$) belirgin up-regüleydi. Lojistik regresyon analizine göre, miR-491-3p upregülasyonunun, ciddi hiperbilirubinemi gelişmesi, KD uygulanması, ABE gelişimi ve işitme kaybı için risk faktörü olmadığı saptandı. Çalışmamızda sarılık grubunda, özellikle kan değişimi yapılan ve ağır ABE gelişenlerde miR-491-3p'nin up-regülasyonu, deneysel ve popülasyon çalışmalarını desteklemekte; ciddi hiperbilirubineminin önlenmesinde anti miR-491-3p mimik çalışmalarının önemini arttırmaktadır.

miR-141-3p: Tatsumi ve arkadaşlarının çalışmasında (2018), miRNA kütüphanesi taramasında aday miRNA olarak saptanan miR 141-3p'nin, UGT1A mRNA ve protein ekspresyonuna etkisi araştırılmış. UGT1A mRNA'nın 3'UTR miRNA tanıma

bölgesinin (miRNA recognition element), miR-141-3p için fonksiyonel olduğu gösterilmiş. UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7 ve UGT1A9'u eksprese eden HEK 293 hücrelerinde miR-141-3p'nin aşırı ekspresyonu, UGT1A9 hariç hariç tüm UGT1A'larda mRNA ekspresyonunu, tüm UGT1A'larda protein ekspresyonunu baskılamış. Benzer şekilde miR-141-3p'in HuH-7 hücrelerinde ekspresyonu ile endojen UGT1A'lar baskılanmış. İnsan KC panellerinde ise miR-141-3p ve UGT1A mRNA düzeyleri arasında beklenenin tersine korelasyon saptanmamış. İnsan karaciğerinde UGT1A ekspresyonunun regülasyonunda miR-141-3p'nin etkisinin diğer faktörler tarafından gizlendiği yorumu yapılmış; insan hepatositlerinde endojen UGT1A ekspresyonuna miR-141-3p inhibitörlerinin etkisinin araştırılması gerektiği bildirilmiş (149). Papageorgiou ve arkadaşlarının çalışmasında (2017); miR-141-3p mimiklerinin LS180 insan bağırsak hücrelerine transfeksiyonunun, UGT1A1 ve UGT1A6 aracılı glukuronidasyonu ve mRNA'yı baskıladığı gösterilmiş. Benzer şekilde, miR-141-3p'nin primer insan hepatositlerine transfeksiyonunun, CYP3A aktivitesini etkilemeden, UGT1A1 aktivitesini ve mRNA'yı baskıladığı gösterilmiş (34). Çalışmamızda miR-141-3p'nin ekspresyon değişimleri ve relatif kantitatif değerleri açısından sarılık ve kontrol grupları arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Sarılık altgruplarında, miR-141-3p upregülasyonu açısından farklılık saptamazken, Grup 3'te, Grup1 ve 2'ye göre miR-141-3p'nin downregülasyonu belirgindi. Sarılık altgruplarında, ABE gelişen ve gelişmeyen, KD uygulanan ve uygulanmayan hastalarda miR141 3p'nin relatif kantitatif değerleri, BİND skorlarına göre miR-141-3p'nin ekspresyon değişimleri farksızdı. Lojistik regresyon analizi, miR-141-3p artışının, ciddi hiperbilirubinemi, ABE gelişimi, KD uygulanması ve işitme kaybı için risk faktörü olmadığını gösterdi. Sarılık şiddeti en yüksek olan Grup3'te miR-141-3p'nin down-regülasyonu; sarılık şiddetinin artmasıyla miR-141-3p inhibitörlerinin ilişkili olabileceğini düşündürdü.

Nöroinflamasyon/mikroglia polarizasyonu ile ilişkili miRNA'lar:

miR-374a-5p: Literatürde bilirubin nörotoksitesitesi ile miR-374a ilişkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Chen ve arkadaşlarının neonatal Sprague-Dawley ratlarda oluşturdukları HIE modelinde, mir-374a-5p'nin aşırı ekspresyonunun nörotoksisteyi önemli ölçüde hafiflettiği, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar

sitokinlerin salınmasını engellediği gösterilmiş. miR-374a-5p'nin, mikroglia hücrelerinde Smad6'yı hedefleyerek NLRP3 inflamatuvar sinyallerin aktivasyonunu ve proinflamatuvar faktörlerin salınmasını inhibe ettiği düşünülmektedir (73). Looney ve arkadaşlarının çalışmasında (2015), HİE'li bebeklerin kord kanında miRNA ekspresyon profilleri araştırılmış; perinatal asfiksili yenidoğanlarda sağlıklı bebeklere kıyasla miR-374a ekspresyonlarının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiş. (164). miR-374a-5p'nin, in vitro iskemi (oksijen/glikoz yoksunluğu) modelinde apoptozu inhibe ettiği gösterildi (165). Çalışmamızda miR-374a-5p'in kontrol ve sarılık gruplarında up-regülasyon (%16,7/%33) ve down-regülasyon (%40 /%39,1) yönünde ekspresyon değişimleri istatistiki açıdan farksızdı. Sarılık altgruplarında, Grup 1 ve Grup 3'de ekspresyon değişimi downregülasyon, Grup 2'de upregülasyon yönünde idi. miR-374a-5p'in relatif kantitatif değerleri sarılık ve kontrol gruplarında istatistiki olarak farklılık göstermezken; sarılık altgrup analizinde Grup 1'de Grup 2 ve 3'e göre daha düşük saptandı. MiR-374a relatif kantitatif değerleri ABE gelişen ve gelişmeyen hastalarda farklı değilken; KD uygulanan hastalarda uygulanmayanlara göre daha yüksekti. BİND skoruna göre normal ve ağır ABE'li olgularda downregülasyon, hafif ve orta ABE'li olgularda upregülasyon yönünde ekspresyon değişimi görüldü. Lojistik regresyon analizi, ciddi sarılık gelişimi, ABE gelişimi, KD gereksinimi, işitme kaybı üzerine etkili olmadığını gösterdi.

miR-93: Literatürde bilirubin nörotoksitesisi ile miR-93 ilişkisini bildiren bir çalışma bulunmamaktadır. Yang ve ark.nın çalışmasında (2016) travmatik beyin hasarlı ratlarda miR-93'ün ekspresyon artışı gösterilmiş (155). Lan ve ark.nın çalışmasında (2017), intraserebral hemorajinin akut döneminde mikroglial polarizasyonun M1, subakut ve kronik safhasında ise M2 olduğu gösterilmiş (156). Shang ve ark.nın çalışmasında (2019) intrakranial hemarajili ratlarda miR-93, TLR4 ve NFκB'nin yüksek oranda eksprese edildiği, miR-93 ekspresyonunun azalması ve TLR4/NFκB sinyal yolu inhibisyonunun, nörolojik işlevi iyileştirdiği, inflamasyonu baskıladığı, serebral ödemi hafiflettiği ve nöronal apoptozu azalttığı gösterilmiş (157). Çalışmamızda kontrol grubuna göre sarılık grubu ve sarılık alt gruplarının miR-93 ekspresyonu up-regüle (p<0,001), relatif kantitatif değerleri yüksek saptandı (p<0,001). MiR-93'ün relatif kantitatif değerleri ABE gelişenlerde gelişmeyenlere göre daha yüksek iken, KD uygulanan ve uygulanmayan hastalarda farklılık

saptanmadı. Lojistik regresyon analizi, miR-93 ekspresyon artışının ciddi hiperbilirubinemi riskini 2,3 kat (OR 2,6, % 95 CI 1,1-1,9, p=0,004) arttırdığını; ABE gelişimi, KD uygulanması, işitme kaybını etkilemediğini gösterdi. Sonuçlarımız, intrakraniyal kanama ve travmatik beyin hasarı örneklerine benzer şekilde, bilirubin toksisitesinin mikroglialın M1 polarizasyonunu, nöroinflamasyonu ve miR-93 ekspresyonunu arttırdığını düşündürmektedir.

miR-Let-7a: İlk tanımlanan miRNA olması nedeniyle, hücre döngüsü ve hücre proliferasyonu ile ilgili genlerin düzenlenmesinde, kaspaz-3, bcl-2, MAP3 kinaz yollarıyla apoptozun modülasyonu ve doğal immünitinin düzenlenmesinde, mikroglia ile ilişkili inflamasyonda önemli rol oynadığı bilinmektedir (150). Yang ve ark.nın çalışmasında (2018) fare intrakraniyal kanama modelinde, kanamadan sonra let-7a seviyelerinin azaldığı; let-7a'nın hedef geni olan “kazein kinaz etkileşen protein-1” (CKIP-1) seviyesinin arttığı; let-7a'nın proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ederek; beyin ödemi azaltarak; intraserebral kanamaya bağlı nörolojik disfonksiyonu düzelterek mikroglialda M2 polarizasyonunu düzenlediği gösterilmiş (144). Cho ve ark.nın BV2 aktive mikroglia hücre kültürü çalışmasında (2015), mir-Let-7a'nın inflamatuvar stresteki rolü incelenmiş; inflamasyon sırasında mikroglialın aşırı miR-Let-7a ifade eden M2 fenotipi gösterdiği; iNOS, NO, IL-6 ve nitrit başta olmak üzere proinflamatuvar mediatörlerin üretimini inhibe ettiği, IL-10, IL-4, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi anti-inflamatuvar sitokin salınımını kontrol eden genleri indüklediği, mikroglialı apoptotik hasardan koruduğu gösterilmiş (150). Song ve ark.nın çalışmasında, antiinflamatuvar faktör “apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1'in” (ASK1) Let-7a aktivitesini indüklediği; mikroglialda anti-inflamatuvar sitokinler IL-10 ve Mycs'i aktive ettiği; apoptoz ve nöroinflamasyonun baskılanması sonucu nöroprotektif etki sağlandığı gösterilmiş (150). Çalışmamızda sarılık ve kontrol gruplarında miR-Let-7a'nın up-regülasyon (%3,3 /%1,7) ve down-regülasyonu (%33,4/%47,8) bakımından; ABE gelişen ve gelişmeyen, kan değişimi yapılan ve yapılmayan hastalarda miR-Let7a'nın relatif kantitatif değerleri bakımından istatistiki farklılık saptanmadı. Benzer şekilde sarılık altgruplarında miR-Let-7a'nın upregülasyonu açısından farklılık saptanmazken; miR-Let-7a'nın downregülasyonu açısından istatistiki açıdan anlamlı farklılık olup (p<0.001); bu farklılığın, Grup1'de miR-Let-7a'nın relatif kantitatif değerlerinin

belirgin down-regülasyonundan kaynaklandığı görüldü ($p=0.020$). Sarılık şiddeti daha düşük olan Grup1'e göre hiperbilirubinemi şiddeti artan Grup2 ve Grup3'de kontrol grubuna benzer down-regülasyon oranları görülmesi, hiperbilirubineminin şiddetine cevap olarak açıklayamayacağımız bir mekanizma ile miR-Let7a inhibisyonunun azaldığını gösteriyor. Çalışmamızda inflamatuvar sitokinler çalışılmamakla birlikte, lojistik regresyon analizi, miR-Let-7a'nın ciddi hiperbilirubinemi riskini azalttığını gösterdi (OR 0,46, %95 CI 0,24-0,46, $p=0,016$). Daha geniş serilerde, miR-Let7a'nın ciddi hiperbilirubinemide koruyucu etkisini gösteren kanıtlar arttıkça, miRLet7a mimiklerinin ABE/kernikterus tedavisinde potansiyel terapötik ajan olabileceğini düşünüyoruz.

miR-124: Santral sinir sisteminde en bol bulunan miRNA olup; yalnız nöronların farklılaşması ve mikroglialının gelişmesi için değil, aynı zamanda mikroglia ve makrofajların anti-inflamatuvar M2 polarizasyonu için de çok önemlidir. MiRNA-124'ün, iNOS, TNF- α , IL-6, MHC sınıf II, CD86, CD11b, and M-CSFR gibi M1 markırlarının ekspresyonunu azalttığı; Arg-1, TGF-b ve FIZZ1 gibi M2 markırlarının ekspresyonunu artırdığı saptanmış. İskemik strok fare modelinde, erken miR-124 enjeksiyonunun, nöron canlılığını ve M2 polarize mikroglia/makrofaj sayısını artırarak nöron koruyucu ve anti-inflamatuvar etkili olduğu gösterilmiş (82). Huang ve ark.nın çalışmasında (2018), yetişkin farelerde travmatik beyin hasarını takiben mikroglial eksozomlarda miR-124-3p'nin arttığı ve nöronal inflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiş. (151). İskemik strok yetişkin sıçan modelinde, akut dönemde beyne spesifik miR-124'ün plazma düzeyinde belirgin artış görülürken (152); akut iskemik stroklu yetişkin insanlarda, beklenenin tersine ilk 24 saat içinde serum miR-124 ve miR-9 düzeylerinin azaldığı; proinflamatuvar marker metalloproteinaz-9 (MMP-9)'un arttığı gösterilmiş. Akut iskemik strokta miR-124 ve miR-9 inhibisyonunun nöroinflamatuvar cevabı ve beyin hasarını arttırdığı; akut strok tedavisinde miR-124 ve miR-9 kullanılmasının nöroinflamasyonu ve beyin hasarını azaltabileceği yorumu yapılmış (153).

Cunha ve ark.nın çalışmasında (2016), lipopolisakkarit (LPS) ile inkübe edilen N9 mikroglia hücrelerinin M1 polarizasyon gösterdikleri, M1 markerları NOS2 ve MHC-II'nin up-regüle, M2-markerleri arginaz1 ve Fizz1'in down-regüle olduğu; inflamatuvar etkili miR-155 ve miR-146'nın ekspresyonu artarken; anti-inflamatuvar etkili miR-124'ün ekspresyonunun azaldığı; bu durumun M1 polarizasyonunun baskın olması şeklinde yorumlanabileceği belirtilmiş (154). Santral sinir sisteminin akut inflamasyonu sırasında hem mikroglialının hem de

makrofajların M1 markırlarını eksprese ettikleri, miR-124 ekspresyonunun down-regüle olduğu; aksine SSS normal veya hastalıkların iyileşme döneminde M1 markırlarının down-regüle, miR-124'ün up-regüle olduğu bildirilmiş (147). Çalışmamızda kontrol grubuna göre sarılık grubunda miR-124 ekspresyonunun belirgin down-regüle (%80'e karşılık %94,8) (p=0,019); sarılık alt gruplarından Grup 1'de downregülasyon oranının daha yüksek olduğu görüldü. miR124'ün relatif kantitatif değerlerinin kontrol grubuna göre sarılık grubunda (p=0,038), ABE gelişmeyenlere göre ABE gelişenlerde daha düşük olduğu saptandı (p=0,007). Sonuçlarımız, ciddi hiperbilirubinemiye bağlı nöroinflamasyonun, M2 polarizasyonunu gösteren miR-124 ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir. Kan değişimi yapılan ve yapılmayan hastalar karşılaştırıldığında; miR-124'ün relatif kantitatif değerleri KD uygulanan hastalarda beklenenin tersi şekilde yüksek saptandı (p=0,007). Lojistik regresyon analizi, miR-124'ün ciddi sarılık gelişimi, ABE gelişimi, kan değişimi gereksinimi, işitme kaybına etkili olmadığını gösterdi. Bilirubin toksisitesi nedeniyle baskılanan miR-124'ün antiinflamatuvar etkisini ortaya koyan kanıtlar arttıkça, miR-124 mimiklerinin ABE/kernikterus tedavisinde potansiyel terapötik ajan olabileceği düşünüldü.

miR-146a: Doğuştan inflamatuvar cevabın düzenleyicilerinden olan miR-146'nın asıl kaynağı mikroglialardır. Cunha ve ark.nın çalışmasında, lipopolisakkarit ile indüklenen N9 mikroglia hücrelerinin, iNOS, MHC-II gibi M1-markırlarının up-regülasyonu, arginase 1, FIZZ1 gibi M2-markırlarının down-regülasyonu ile M1 polarizasyonu gösterdiği; inflamatuvar miRNA'lar miR-155 and miR-146a'nın up-regüle, miR-124'ün down-regüle olduğu saptanmış (154). Martin ve ark.nın çalışmasında, LPS, peptidoglikan ve flagellin uyarılarının TLR4, TLR2 ve TLR5 gibi M1 uyarıları tarafından tanınarak mikroglialının indüklendiği; miR-146a'nın IL-1R reseptörü ile ilişkili kinaz 1 (IRAK-1) ve TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF-6) genlerini hedefleyerek, NF-kB aktivasyonunu baskıladı; sonuç olarak M1 pro-inflamatuvar sitokinler IL-1, IL-6 ile CCL5 ve CXCL8 dahil çeşitli kemokinlerin üretimini azalttığı ve inflamasyonu baskıladı bildirilmiş. Doğal özelliklerini koruyan farelere göre, miR-146 gen ifadesi durdurulmuş (*knockout*) farelerde, invitro LPS ve miyelin maruziyetinin, miR-146 yokluğunda mikroglia/makrofajlarda sitokin ve kemokin yapımını arttırdığı, migrasyon ve fagositoz yeteneğini azalttığı gösterilmiş. Bu çalışmada miR-146a'nın asıl rolünün, aktive mikroglia'da sitokin ve kemokin üretimini azaltıp, migrasyon ve fagositoz yeteneğini artırarak inflamasyonu

baskılamak olduğu vurgulanmış (134). Chen ve arkadaşlarının çalışmasında (2019) deneysel postoperatif bilişsel disfonksiyon (POCD) fare modelinde, hipokampal dokularda miR-146a ekspresyon artışı saptanmış. miR-146a'nın IL-1 reseptör-ilişkili kinaz 1 (IRAK1), TNF-reseptör ile ilişkili faktör 6'yı (TRAF6) hedefleyerek, NFκB yolağını baskılayarak, hipokampusta mikrogliya'nın anormal aktivasyonunu azalttığı; postoperatif bilişsel disfonksiyonda öğrenme ve hafıza işlevlerinin geri kazanılmasında önemli rolü olduğu gösterilmiş (146). Wang ve arkadaşlarının çalışmasında (2018), İKK'lı ratlara miR-21 ve miR-146a enjekte edilip inflamasyon, beyin ödemi, nörolojik skorlar değerlendirildiğinde; miR-21/miR-146a'nın aşırı ekspresyonu IL-1β, IL-6, IL-8, IRAK1, MMP-9 ve TNF-α ekspresyonunu ve beyin ödemi azaltarak İKK'lı ratlarda nörolojik işlevleri iyileştirmiş. Sonuç olarak miR-21 ve miR-146a'nın insanlarda İKK sonrası sekonder inflamatuvar hasarın tedavisinde yeni bir temel sağladığı gösterilmiş (160). Çalışmamızda miR-146a'nın kontrol ve sarılık gruplarında sırasıyla up-regülasyon (%16,7/%25,2,) ve down-regülasyon (%40/%30,4) yönünde ekspresyon değişimleri ve relatif kantitatif değerleri istatistiki olarak farksızdı. Sarılık altgrupları incelendiğinde, Grup 1'e göre Grup 2 ve 3'de miR-146a ekspresyonu anlamlı up-regüle ($p < 0,001$); relatif kantitatif değerleri, Grup 1' göre Grup 2 ve Grup 3'te ve ABE gelişmeyenlere göre ABE gelişen grupta yüksek saptandı ($p = 0,002$), KD uygulanan ve uygulanmayan hastalar arasında farklılık saptanmazken; miR-146a'nın orta-ağır ABE'li hastalarda upregüle, normal yenidoğanlarda downregüle olduğu görüldü. Lojistik regresyon analizi, ciddi sarılık gelişimi, KD gereksinimi, işitme kaybını etkilemediğini; ABE gelişimini 1.6 kat (OR: 1,6, % 95 CI 1,0-2,5, $p = 0,020$) arttırdığını gösterdi. Sonuç olarak doğal immünitinin negatif modülatörü olduğu düşünülen miR-146a'nın özellikle ABE gelişen, BİND skoru orta-ağır olanlarda ve sarılık altgruplarında sarılık şiddeti arttıkça (Grup 2 ve 3) ekspresyonunun up-regüle olması, bilirübin toksisitesine karşı SSS'de gelişen negatif düzenleyici yanıt mekanizmalarından birisi olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda olduğu gibi, pro-/anti-inflamatuvar miRNA'ların sıklıkla aynı zamanda aktive edildiği; bu nedenle ekspresyonlarının birlikte değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir. MikroRNA-146a'nın diğer pro-inflamatuvar miRNA'lar ile arasındaki oranın değişmesinin, miR-146a düzeyinin belli bir eşik değeri aşmasının, inflamatuvar sitokinleri baskılayıcı, tedavi edici etkisini

başlatabileceği ileri sürülmektedir (118).

miR-155: Deneysel çalışmalarda, miR-155'in mikroglia'yı etkileyerek, santral sinir sistemi ile ilişkili inflamasyonda düzenleyici olduğu (aktivasyon, proliferasyon, inflamasyon, astrosit, endotel hücreleri ile etkileşim) belirtilmektedir (44). MiR-155 ekspresyon artışının mikroglial hücrede proinflamatuvar etkili olduğu; M1 polarizasyonunu arttırdığı, miR-155 blokajının potansiyel olarak nöroprotektif hedef olduğu öne sürülmektedir. Cunha ve ark.nın çalışmasında (2016), LPS ile inkübe edilen N9 mikroglia hücrelerinde M1 polarizasyonu saptandığı; inflamatuvar etkili miR-155 ekspresyonunun indüklendiği; miR-155'in mikroglia'da anti-inflamatuvar etkili mediatör sitokin sinyal supresör SOCS-1'i inhibe ettiği gösterilmiş. MiR-155 ekspresyonunun azalması ile SOCS-1 ekspresyonu indüklenerek iNOS-nitrik oksit üretimi azalmakta ve antiinflamatuvar etki oluşmaktadır (154). O'Connell ve ark.nın çalışmasında (2006), makrofajların TLR2, TLR3, TLR4 ve TLR9 ligandları ile uyarılması miR-155 ekspresyonunu önemli ölçüde artırırken; NF- κ B sinyal sistemini etkinleştiren MyD88 ve TRIF'in inhibisyonu miR-155 artışını engellemiş. Benzer şekilde, bir JNK inhibitörünün kullanılması, miR-155'in up-regülasyonunu ve TNF- α üretimini azaltmış. miR-155 aracılı M1 polarizasyonu aktivasyonunun JNK yolağının indüksiyonundan kaynaklandığı sonucuna varılmış (145,158). Nunez ve ark.nın çalışmasında (2010); miR-155'in, IL-13 reseptör α 1'i (IL13R α 1) hedefleyerek, STAT6 aktivasyonunu inhibe ettiği ve M1 polarizasyonunu indüklediği belirtilmiştir (159). Vaz ve ark.nın deneysel çalışmasında (2019); iki günlük fare mikroglia hücrelerinin 24 saat süreyle orta/şiddetli neonatal hiperbilirubinemiye karşılık gelen 50/100 nM serbet bilirubinle inkübasyonu, genç mikroglia'da TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve miR 125b /miR-21 /miR-146a yanında miR-155 gibi proinflamatuvar yanıtı gösteren miRNA'ların artmasına yol açmış (98). Çalışmamızda kontrol ve sarılık grupları arasında miR-155'in up-regülasyon (%16,7/%14,8), down-regülasyon (%56,7/%54,8) ve relatif kantitatif değerleri bakımından fark saptanmadı. Sarılık alt gruplarında, ABE gelişen ve gelişmeyen, KD uygulanan ve uygulanmayan hastalar arasında miR-155 ekspresyonu bakımından farklılık saptanmadı. Lojistik regresyon analizi de ciddi hiperbilirubinemi, ABE gelişimi, KD gereksinimi, işitme kaybı üzerine etkili olmadığını gösterdi. Çalışmamızın sonuçları, invitro hiperbilirubinemi modelinde nöroinflamatuvar etkisi gösterilen miR155'in,

hiperbilirubinemi klinik çalışmasında bilirubin toksisitesi ve BİND gelişimi etiyopatogenezinde rolü olmadığını gösterdi.

miR-210: “Master hypoxamir” olarak bilinen ve hipoksi sırasında nöral progenitör hücreler tarafından yapımı artan miR-210, anjiogenezis, mitokondrial metabolizma, apoptotik hücre ölümü gibi sellüler işlemlerde de rol almakta, ancak, bilirubin nörotoksitesisi ile ilişkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Li ve ark.nın çalışmasında (2020), neonatal HİE’de miR-210 ekspresyonunun up-regüle olduğu, mikroglia’yı güçlü bir şekilde indükleyen miR-210’un NFκB sinyal yolunu aktive ederek ve sirtuin 1 (SIRT1)’i hedefleyerek, p65 deasetilasyonunun blokajı yoluyla nöroinflamasyonu arttırdığı; miR-210 inhibitörlerinin nöroinflamasyonu kontrol altına alarak HİE’yi süprese ettiği gösterilmiştir (74). Ma ve ark.nın çalışmasında (2016), miR-210’un glukokortikoid reseptör mRNA 3’UTR’yi hedefleyip inhibe ederek, beynin hipoksik iskemik hasara duyarlılığını arttırdığı; intraserebroventriküler veya intranasal miRNA 210 antagomir (kilit nükleik asit) uygulamasının, mikroglia aracılı nöroinflamasyonu etkili bir şekilde bastırarak, HİE’nin neden olduğu beyin hasarını önemli ölçüde azalttığı, geç nörolojik disfonksiyonları düzelttiği gösterilmiş (142). Jie Qui ve arkadaşlarının deneysel rat çalışmasında (2013), HI hasardan 72 saat sonra miR210 ekspresyonunun azaldığı; düzeyi azalan miR-210’un kaspaz aktivitesini inhibe ederek nöronal apoptozu baskıladığı ve HİE’de nöroprotektif olduğu saptanmış (161). Çalışmamızda miR-210’un sarılık grubunda %32,2, kontrol grubunda %13,3 olguda upregüle iken iki grup arasında up-regülasyon açısından anlamlı farklılık saptandı (p=0,030). Sarılık grubunda %41,7, kontrol grubunda %36,7 olguda downregüle olduğu görülürken downregülasyon açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Sarılık altgruplarından Grup 2’de upregülasyon, Grup 1 ve 3’te downregülasyon oranının daha yüksek olduğu görüldü. miR-210’un relatif kantitatif değerleri, sarılık ve kontrol grupları arasında istatistiki açıdan farklı değilken; sarılık altgruplarından Grup 2’de Grup 1 ve 3’e göre daha yüksekti. ABE gelişen ve gelişmeyen, KD uygulanan ve uygulanmayan, BİND skoru normal ve patolojik olan gruplar arasında farklılık saptanmadı. Lojistik regresyon analizi, miR-210’un, ciddi sarılık gelişimi, ABE gelişimi, KD gereksinimi, işitme kaybı üzerine etkisiz olduğunu gösterdi. Daha geniş serilerde, miR-210’un bilirubin toksisitesi ile BİND etiyopatogenezi ve nöroprotektivitedeki mekanizmaları

açıklayan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

miR-384: Literatürde bilirubin nörotoksitesi ile miR-384 ilişkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında (2020), sağlıklı bebeklere göre HİE'li yenidoğanlarda serum miR-384'ün anlamlı düzeyde azaldığı, serum miR-384'ün HİE'nin tanısı ve şiddetinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiş. Aynı çalışmada, hipoksi-iskemi ile indüklenen aktive mikroglialın miR 384 ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiş (11). Cui ve arkadaşlarının çalışmasında, hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda, serebral kortekste miR-384'ün down-regüle edildiği gösterildi (162). Çalışmamızda miR-384'ün ekspresyon değişimleri kontrol ve sarılık gruplarında (up-regülasyon: %13,3/%43,7 ve down-regülasyon: %53,3/%47,8) ve sarılık alt gruplarında istatistiki olarak farksızdı. miR-384'in relatif kantitatif değerleri bakımından, sarılık ve kontrol grupları, sarılık alt grupları, ABE gelişen ve gelişmeyen, KD uygulanan ve uygulanmayan hastalar arasında farklılık saptanmadı. Lojistik regresyon analizi, miR-384'ün ciddi sarılık gelişimi, ABE gelişimi, KD gereksinimi, işitme kaybı üzerine etkisiz olduğunu gösterdi.

miR-376c-3p: Literatürde bilirubin nörotoksitesi ile miR-376c ilişkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Paul O'Sullivan ve arkadaşlarının çalışmasında (2019), sağlıklı ve HİE'li yenidoğanların kord kanı miRNA profilleri karşılaştırılmış; sağlıklı kontrollere göre HİE'li bebeklerde miR 376c-3p seviyelerinin belirgin düşük olduğu gösterilmiş (163). MiR-376c-3p'nin farklı kanser tiplerinde hücre büyümesi, proliferasyonu ve göçünü düzenlediği gösterilmiş; miR-376c-3p'nin iskemik koşullar altında nöronal hücrelerin hayatta kalmasında önemli rol oynayabileceği düşünülmüş. Çalışmamızda miR-376c-3p'in, kontrol ve sarılık gruplarında up-regülasyon (%10/%2,6) ve down-regülasyon (%70/%80) yönde değişimleri istatistiki olarak farksızdı. Sarılık alt grupları Grup1/2/3'de miR-376c-3p'nin downregülasyon oranı sırasıyla %88/%65,2/%75 olup; istatistiki olarak farklılık saptandı. miR-376c-3p'in relatif kantitatif değerleri, sarılık ve kontrol grupları arasında istatistiki farklılık göstermezken; sarılık alt grup analizinde Grup 2'de Grup1 ve 3'e göre daha yüksek bulundu. ABE gelişen ve gelişmeyen, KD uygulanan ve uygulanmayan hastalar arasında farklılık saptanmadı. Lojistik regresyon analizi, ciddi sarılık gelişimi, ABE

gelişimi, KD gereksinimi, işitme kaybı üzerine etkili olmadığını gösterdi.

miR-181c: Literatürde bilirubin nörotoksitesisi ile miR-181c ilişkisini araştıran çalışma bulunmamaktadır. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında (2012), hipoksi / iskemi ve mikroglia ilişkili nöronal hasarda miR-181c'nin TNF- α ekspresyonunu baskılayarak nöronal apoptozu kontrol ettiği saptanmış; miR-181c'nin 3'UTR bölgesine bağlanarak TNF- α 'nın mRNA ve protein ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı, sonuç olarak TNF α 'nın miR-181c'nin doğrudan hedefi olduğu gösterilmiş (166). Çalışmamızda, kontrol ve sarılık gruplarında miR-181c'ün up-regülasyon (%13,3/%4,3) ve down-regülasyon (%56,7/%57,4) değişimi ve relatif kantitatif değerleri istatistiki olarak farksızdı. Sarılık alt gruplarından Grup 1'de (%73,1), Grup 2 (%37,5) ve Grup 3'e (%31,2) göre downregülasyon oranı istatistiki olarak anlamlı yüksek; relatif kantitatif değerleri düşüktü. MiR-181c'nin kantitatif değerleri ABE gelişen ve gelişmeyen, KD uygulanan ve uygulanmayan hastalarda farksızdı. BİND skoruna göre normal/hafif/orta/ağır ABE gruplarında downregülasyon oranları sırasıyla %64,3/%53,2/%64,7/%18,2 idi. Tekli lojistik regresyon analizi, miR-181c ekspresyon artışının, ciddi sarılık gelişimi, KD uygulanması, işitme kaybını etkilemezken; miR-181c downregülasyonunun ABE gelişmesini 2,3 kat etkilediği (OR 2,34, %95 CI 2,4-5,85, p=0,038) saptandı.

SONUÇLAR

Çalışmaya sTB \geq 20 mg/dl olan ciddi hiperbilirübinemili 115 bebek (Sarılık grubu) ve sTB<13 mg/dl olan 30 sağlıklı bebek (Kontrol grubu) alındı.

Sarılık grubu sTB düzeyine göre \geq 20- \leq 25 mg/dl (Grup 1: %58,3), >25- \leq 30 mg/dl (Grup 2: %27,8), >30-mg/dl (Grup 3: %13,9) olmak üzere üç alt grupta incelendi.

Kontrol grubundaki bebeklerin tümü TC vatandaşı, sarılık grubundaki hastaların 106 (%92,1)'sı T.C. vatandaşı, 9 (%7,9)'u Suriye'li idi.

Kontrol grubunun 19 (%63,3)'u, sarılık grubunun 51 (%44,3)'i erkekti.

Kontrol grubunun %10'u, sarılık grubunun %25,2'si geç pretermdi.

Kontrol ve sarılık gruplarının gebelik yaşları sırasıyla 38,1 \pm 1,1 ve 37,9 \pm 1,5 hafta, doğum ağırlıkları 3139 \pm 338 ve 3126 \pm 493 gr olarak saptandı.

Sezaryen doğum oranı sarılık grubuna göre kontrol grubunda belirgin yüksek iken (p¹=0,002), sarılık alt grupları arasında istatistiki farklılık saptanmadı (p²=0,457).

Akraba evliliği sarılık grubunda (%29,9 x %3,3, p¹=0,01) ve Grup 3'te (%56,2 x %22,3, %21,9, p²: 0,017) belirgin yüksek bulundu.

Ciddi hiperbilirübinemi etyolojisinde, ABO uyuşmazlığı (%37,4), prematürite (%25,2), immün hemolitik hastalık (%20,9), patolojik kilo kaybı (%17,3), enzim eksiklikleri (%14,7), sepsis (%10,4), kültür (+) üriner infeksiyon (%10,4), hipotiroidi (%6,1), polisitemi (%3,4), Crigler Najar tip 2 (%0,9) ve idyopatik (%0,9) nedenler bulundu.

İmmün hemolitik sarılığın en sık nedeni ABO uyuşmazlığı (%10,4); kalıtsal enzim eksikliğinin en sık nedeni G6PD eksikliği (%12,7) idi.

Sarılık grubunda ABO, Rh, subgrup uyuşmazlığı sıklığı sırasıyla %37,4, %7,8 ve %14,7 ve direkt Coombs pozitifliği %20 idi.

Sarılık grubunda G6PD eksikliği %12,2, pirüvat kinaz eksikliği %1,7, G6PD+PK eksikliği %0,9 sıklıkta saptandı.

Sarılık alt gruplarında Rh uyuşmazlığı (p=0.155), G6PD eksikliği (p=0,506), MCHC yüksekliği (p=0,762) sıklığı farksız iken, ABO uyuşmazlığı (p=0.003) ve subgrup uyuşmazlığı (p=0.039) sıklığı yüksek bulundu. ABO uyuşmazlığı Grup 2'de, subgrup uyuşmazlığı Grup 3'de yüksek saptandı.

Sarılık grubunda promoter polimorfizmi %31,3, heterozigot TA6/7 %23,4,

homozigot TA7/7 %7,4 sıklıkta saptandı. Sarılık alt gruplarında heterozigot /homozigot promoter polimorfizmi açısından farklılık saptanmadı ($p=0,931$).

Hastaneye başvuruda sTB düzeyleri sarılık grubunda ($24,8\pm 4,8$ (20-46) mg/dl) kontrol grubuna ($8,4\pm 3,1$ (0,9-12,7) mg/dl) göre belirgin yüksekti ($p<0,001$).

Sarılık grubunda ortalama sAlb düzeyi $3,6\pm 0,3$ mg/dl, sTB/Alb oranı $6,1\pm 1,5$, sTB/Alb>6,8 hastaların sıklığı %42,9, retikülosit oranı %2,68 saptandı.

Sarılık alt gruplarında sAlb düzeyleri istatistiki olarak farksız iken ($p=0,676$); sTB/Alb oranının, sarılık şiddeti arttıkça grup 1'den grup 3'e doğru $6,1\pm 0,7$ 'den $7,5\pm 0,9$ 'a ve $9,3\pm 1,5$ 'e arttığı ($p<0,001$); sTB/Alb>6.8 olan hastaların sıklığının %7,8'den %20,9 ve %13,9'a arttığı ($p<0,001$), retikülositin %2,1±2,6'den %3,3±2,4 ve %3,3±3,8'e arttığı ($p<0,001$) saptandı.

Sarılık alt gruplarında CRP pozitifliği, immatür/total nötrofil oranı>0.20 sıklığı, Hb, Htk, lökosit sayısı, MCHC, sT4, TSH düzeyleri istatistiki olarak farksızdı ($p>0,05$).

Sarılık grubundaki hastaların hepsine fototerapi, %13,9'una fototerapi ve IVIG, %13,9'una fototerapi ve kan değişimi, %4,3'üne fototerapi+IVIG+kan değişimi, %1,7'sine fototerapi ve fenobarbital tedavileri uygulandı.

sTB düzeyi ile BİND skoru ($p<0,001$), sTB/Alb oranı artışı ile BİND skoru (ABE şiddeti) arasında anlamlı pozitif korelasyonu saptandı ($p<0,001$).

BİND skorlamasına göre sarılık grubundaki bebeklerin; %34,8'i normal, %40,9'u hafif ABE, %14,8'i orta ABE, %9,5'i ağır ABE olarak değerlendirildi.

Sarılık alt gruplarında, sarılık şiddeti arttıkça ağır ABE sıklığının Grup 1,2,3'te sırasıyla %0'dan %6,3'e, %56,2'ye arttığı görüldü ($p<0,001$).

İşitme testi (ABR), kontrol grubunda $4,2\pm 3,85$ günde, sarılık grubunda $9,42\pm 4,1$ günde uygulandı. Kontrol grubundaki yenidoğanların tümü, sarılık grubundaki hastaların 78,3'ü işitme testinden geçerken; sarılık grubundaki hastaların %21,7'si kaldı.

Sarılık şiddeti arttıkça işitme testinden kalanların oranı artmasına rağmen Grup 1,2,3 (%14,9, %28,1, %37,5) arasında istatistiki farklılık saptanmadı ($p=0,092$).

İşitme testi sonuçları BİND skoruna göre değerlendirildiğinde, ABE bulgularının şiddeti arttıkça işitme testinden kalanların sıklığı arttı ($p<0,001$).

Kan değişimi yapılan hastalarda yapılmayanlara göre sTB ($32,6\pm 6,0$ ve $23,5\pm 3,1$ mg/dL, $p<0,001$), sTB/Alb oranı ($9,19\pm 1,8$ ve $6,5\pm 1,03$, $p<0,001$), sTB/Alb>6.8 olması (%93,8 ve %34,3, $p<0,001$), ortalama retikülosit yüzdesi ($4,1\pm 3,9$ ve $2,4\pm 2,5$,

p=0,023), BİND skoruna göre ağır ABE gelişmesi (%68,7 ve %0, p<0,001), işitme testinden kalma oranı (%43,7 ve %18,1, p=0,044) belirgin yüksek saptandı.

Sarılık grubu ABE gelişen (BİND skoru 1-9) ve gelişmeyen (BİND skoru 0 puan) olarak değerlendirildiğinde; ABE gelişenlerde sTB (26,29±5,18 ve 22,01±2,16, p<0,001), sTB/Alb (7,37±1,57 ve 6,14±0,81, p<0,001), sTB/Alb>6.8 (%57,3 ve %15, p<0,001), ABO uyuşmazlığı (%45,3 ve %22,5, p=0,027), DC pozitifliği (%25,3 ve %10, p=0,05), işitme testinden kalma oranı (%29,3 ve %7,5, p=0,014) istatistiki olarak anlamlı yüksek saptandı.

Hastalar işitme testine göre sağlıklı ve kalan olarak değerlendirildiğinde; işitme testinden kalanlarda sTB (27,06±5,1 ve 24,1±4,3, p<0,001), sTB/Alb (7,69±1,88 ve 6,72±1,27, p<0,001), sTB/Alb>6,8 (%60 ve %38,9, p<0,001), ABO uyuşmazlığı (%60 ve %31,1, p=0,008), G6PD eksikliği (%20 ve %11,1, p=0,014), BİND skoruna göre ağır ABE görülme sıklığı (%28 ve %4,4, p<0,001) belirgin yüksek saptandı.

MikroRNA sonuçları:

Çalışmamızda miRNA relatif kantitatif değerleri açısından T.C. vatandaşları (n:106) ve Suriyeli (n:9) hastalar arasında farklılık görülmedi.

Sarılık ve kontrol gruplarının miRNA ekspresyon değişimleri; sarılık grubundaki hastaların kontrol grubuna göre miR-491-3p ve miR-210'nun istatistiki olarak anlamlı upregüle olduğu (p<0,05); miR-124'ün ise downregüle olduğu görülürken, miR-21-3p ve miR-93'ün sarılık grubunda kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı upregüle olduğu, kontrol grubunda ise sarılık grubuna göre anlamlı downregüle olduğu görüldü (p<0,05).

Sarılık alt gruplarında, miR-491-3p, miR-210, miR-93'ün upregülasyonu; miR124, miR21-3p, miR-141-3p, miRLet7a, miR146a ve miR-181c'nin downregülasyonu ve miR374a-5p'nin up/downregülasyonu istatistiki olarak farklı saptandı (p<0,05).

miRNA miR-21 3p, miR-491-3p, miR-93, miR-Let7a, miR-124 ekspresyonu relatif kantitatif değerleri sarılık ve kontrol gruplarında istatistiki olarak anlamlı farklı saptandı (p<0,05).

Sarılık grubunda, kontrol grubuna göre miR-21-3p (p<0,001), miR-491-3p (p=0,03), miR-93'ün (p<0,001) relatif kantitatif değerleri yüksek, miR-Let7a (p=0,02) ve miR-124'ün (p=0,038) relatif kantitatif değerleri düşük saptandı.

Sarılık alt gruplarında miR-155, miR-141-3p, miR-384'ün relatif kantitatif değerleri istatistiki olarak farklı saptanmazken ($p>0,05$); miR-491-3p, miR-Let7a, miR-93'ün relatif kantitatif değerleri Grup 1'e göre Grup 2'de yükseldiği; miR-124, miR-146a, miR-376c-3p, miR-181c'nin relatif kantitatif değerlerinin Grup 1'e göre hem Grup 2, hem Grup 3'te yükseldiği; miR-210, miR-374a-5p'ün relatif kantitatif değerlerinin Grup 1'e göre Grup 2'de arttığı, Grup 2'ye göre Grup 3'te azaldığı görüldü.

ABE gelişenlerde, ABE gelişmeyenlere göre miR-21-3p ($p=0,001$), miR-93'ün ($p=0,001$), miR-146a ($p=0,002$), relatif kantitatif değerlerinin yüksek; miR-124 ($p=0,007$) relatif kantitatif değerinin düşük olduğu saptandı.

Kan değişimi yapılan hastalarda miR-21-3p'ün ($p=0,001$), miR491-3p ($p=0,036$), miR-124 ($p=0,007$) relatif kantitatif değerlerinin yüksek; miR 374a-3p'nin ($p=0,024$) relatif kantitatif değerinin düşük olduğu saptandı.

BİND skoru normal hastalarda miR-146a ve miR-181c ekspresyonlarının downregüle ($p<0,05$), BİND skoruna göre ağır ABE gelişen hastalarda miR-21-3p, miR491-3p, miR-93 ekspresyon değişiminin upregüle ($p<0,05$) olduğu saptandı.

Ciddi hiperbilirübinemiyle ilişkili risk faktörlerinin lojistik regresyon analizinde, vajinal doğum (OR 4,1, %95 CI 1,63-10,9, $p=0,003$), akraba evliliği (OR 10,7, % 95 CI 1,4-81,9, $p=0,022$), ABO uyumsuzluğu (OR 5,4, %95 CI 1,5-18,7, $p=0,008$), miR-93 (OR 2,6, %95 CI 2,5-4,5, $p=0,001$) ile miR-21-3p (OR 1,4, %95 CI 1,1-1,9, $p=0,004$) ekspresyon artışının ciddi hiperbilirübinemi riskini arttırdığı; miR-Let7a artışının (OR 0,46, %95 CI 0,24-0,86, $p=0,016$) ciddi hiperbilirübinemi riskini azalttığı saptandı.

Ciddi hiperbilirübinemili bebeklerde ABE gelişimiyle ilişkili risk faktörlerinin lojistik regresyon analizinde, sTB/Alb $\geq 6,8$ olması (OR 6,3 %95 CI 2,4-16 $p<0,001$), direkt Coombs pozitifliği (OR 3, %95 CI 0,96-97, $p=0,049$), ABO uyumsuzluğu (OR 2,8, %95 CI 1,1-6,8, $p=0,018$), sTB/Alb oranı (OR 2,5, %95 CI 1,6-4, $p<0,001$) ile miR-181c artışı (OR 2,34 %95 CI 2,4-5,85, $p=0,038$) ve miR-146a (OR 1,6 %95 CI 1-2,5, $p=0,020$) ABE gelişmesinde etkili bulundu.

Ciddi hiperbilirübinemili hastalarda kan değişimi yapılmasında etkili risk faktörlerinin lojistik regresyon analizinde, sTB/Alb $\geq 6,8$ olması (OR 27,4, %95 CI 3,4-216, $p=0,002$), sTB/Alb yüksekliği (OR 4,7, %95 CI 2,3-9,6, $p<0,001$), ABO uyumsuzluğu olması (OR 2,1, %95 CI 0,8-7,1, $p=0,01$), G6PD eksikliği (OR 1,4, %95 CI 0,12-1,6,

p=0,023) ve miR-21-3p artışı (OR 1,002, %95 CI 1-1,003, p=0,022) kan değişimi gereksinimini arttırdığı bulundu.

Ciddi hiperbilirübinemili bebeklerde, işitme kaybı için risk faktörlerinin lojistik regresyon analizinde, ABO uyumsuzluğu (OR 3,3, %95 CI 1,3-8,3, p=0,010), sTB/Alb>6,8 olması (OR 2,2, %95 CI 0,95-5,8, p=0,043), patolojik kilo kaybı (OR 1,81, %95 CI 0,7-0,94, p=0,005), sTB/Alb oranı (OR 1,5, %95 CI 1,1-2,1, p=0,007), işitme kaybı gelişmesinde etkili risk faktörleri olarak saptandı.

Çalışmamızın bulguları bütüncül olarak değerlendirildiğinde, miR21-3p'nin ekspresyon değişimi kontrol grubunda downregülasyon yönünde iken, ciddi hiperbilirübinemili hastalarda, BİND skoruna göre hafif, orta ve ağır ABE saptanan hastalarda upregülasyon yönünde idi. MikroRNA-21-3p'nin relatif kantitatif değerleri ABE gelişen ve kan değişimi uygulanan hastalarda daha yüksek olup; lojistik regresyon analizi ciddi hiperbilirübinemi ve kan değişimi riskini artırdığını gösterdi. Bu sonuçlar, miR-21-3p'nin ciddi hiperbilirübinemi patogenezinde ve BİND yönetiminde potansiyel terapötik hedef olabileceğini düşündürdü. Çalışmamız, miR491-3p, miR-124, miR-210, miR-93'ün de ciddi hiperbilirübinemi etiopatogenezi ve BİND yönetiminde önemli rolleri olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak çok daha geniş bir örneklem grubunda, farklı etnisiteden çok sayıda olgunun dahil edildiği, daha fazla sayıda aday miRNA'nın incelendiği genetik ve moleküler çalışmalar ile miRNA-ciddi hiperbilirübinemi ilişkisi ortaya konulabilir; bilirübin ilişkili nörolojik disfonksiyonun akut ve kronik "asla olmaması gereken durum; kernikterus" komplikasyonları daha da azaltılabilir

Çalışmanın kısıtlılıkları;

Çalışmanın sonuçları değerlendirilirken hasta sayısının kısıtlılığı akılda tutulmalıdır. Epigenetik ve genetik çalışmalarda etnisite etkili olabildiğinden; bu klinik çalışmaya çoğunluğu T.C. vatandaşı olan yenidoğanların dahil edildiği unutulmamalıdır.

Çalışmamız çok merkezli olduğundan; hastaların fizik ve nörolojik muayeneleri ve BİND skorlaması 12 farklı üçüncü basamak YYBÜ'nde çalışan pediatrik ve neonatologlar tarafından yapıldı; demografik, klinik ve laboratuvar bulguları önceden hazırlanan hasta formuna kaydedildi. Bu nedenle değerlendirme farklılıkları olabileceği unutulmamalıdır.

İşitme testleri (ABR) ilgili merkezlerde çalışan odyologlar tarafından yapıldı. İşitme testinden kalan hastalarda diğer etyolojik faktörler araştırılmadı; ancak ileri inceleme için referans merkezlere yönlendirildi.

G6PD ve pirüvat kinaz eksikliği biyokimyasal olarak saptandı.

Bazı hastalar çalışmaya katılan merkezlere fototerapi başlandıktan sonra sevk edilmiş olup; fototerapinin miRNA ekspresyonu üzerine etkisi bilinmemektedir.

Farklı etnisitelerden daha geniş örneklem gruplarında, daha fazla aday miRNA'yı, uzun vadedeki nörotoksisite bulguları ve nörogelişimsel testler ile değerlendirmek miRNA-ciddi hiperbilirubinemi ilişkisini aydınlatmada daha yararlı olacaktır.

KAYNAKÇA

1. Brites D. The Evolving Landscape of Neurotoxicity by Unconjugated Bilirubin: Role of Glial Cells and Inflammation. *Front Pharmacol.* 2012;3:1–27.
2. Türk Neonatoloji Derneği Yenidoğan Sariliklerinde Yaklaşım, İzlem ve Tedavi Rehberi 2014, Prof. Dr. Asuman ÇOBAN, Prof.Dr. Münevver TÜRKMEN, Doç. Dr. Tuğba GÜRSOY).
3. Watchko JF. Hyperbilirubinemia and Bilirubin Toxicity in the Late Preterm Infant. *Clin Perinatol.* 2006;33:839–52.
4. Fernandes A, Falcão AS, Silva RFM, Gordo AC, Gama MJ, Brito MA, et al. Inflammatory signalling pathways involved in astroglial activation by unconjugated bilirubin. *J Neurochem.* 2006;96(6):1667–79.
5. Çetinkaya M, Köksal N, Özkan H. Yenidoğan Sarılıklarında Tedavi Yaklaşımı. *Güncel Pediatr.* 2006;3:118–23.
6. Kaplan M, Wong RJ, Sibley E, Stevenson DK. (100) Neonatal Jaundice and Liver Diseases. Tenth Edit. Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine, 2-Volume Set. Elsevier Inc; 1618–1673.
7. Bhutani VK, Zipursky A, Blencowe H, Khanna R, Sgro M, Ebbesen F, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and rhesus disease of the newborn: Incidence and impairment estimates for 2010 at regional and global levels. *Pediatr Res.* 2013;74:86–100.
8. Vodret S, Bortolussi G, Iaconcig A, Martinelli E, Tiribelli C, Muro AF. Attenuation of neuro-inflammation improves survival and neurodegeneration in a mouse model of severe neonatal hyperbilirubinemia. *Brain Behav Immun.* 2018;70:166–78.
9. Tan, N., Hu S, Zhen H, Quantitative proteomic characterization of microvesicles/exosomes from the cerebrospinal fluid of patients with acute bilirubin encephalopathy. *Molecular Med. Rep.* 2020; 22: 1257-1268.
10. Silva S., Vaz A.R, Features of bilirubin-induced reactive microglia: From phagocytosis to inflammation. *Neurobiology of Disease* .2010; 40 663–675.
11. Zhang G, Ye M, Li M. Deregulated miR-384 serves as a biomarker in

- neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and alleviates microglia-mediated neuroinflammation. *Mol Biol Rep.* 2020;47:5411–20.
12. Christine A. Gleason, MD, Sherin U. Devaskar, MD. Avery's diseases of the Newborn, 2012, 9.Baskı.: 15, 79, 1125-42.
 13. Riordan SM, Shapiro SM. Review of bilirubin neurotoxicity I: molecular biology and neuropathology of disease. *Pediatr Res.* 2020;87(2):327–31.
 14. Yenidoğanda Sarılık: *Pediatrici.* Neyzi O., Ertuğrul T. 3.baskı. 2002;402-421
 15. Özdemir Ö. Yenidoğanda indirekt hiperbilirubinemi tanı ve tedavisi; derleme. *Pamukkale Med J.* 2020 May 1;13:463–75.
 16. Ananth R. Neonatal Cholestasis: A Primer of Selected Etiologies. *Pediatr Ann.* 2018 (11);47:433–9.
 17. Jon F. Watchko, Monica J. Daood, Burhan Mahmood, Kalyani Vats. Original Article P-Glycoprotein and Bilirubin Disposition. *J Perinatol.* 2001;21:43–7.
 18. Shapiro S, Le Pichon JB, Riordan SM, Watchkoe J. The Neurological Sequelae of Neonatal Hyperbilirubinemia: Definitions, Diagnosis and Treatment of the Kernicterus Spectrum Disorders (KSDs). *Curr Pediatr Rev.* 2017;13:199–209.
 19. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia, An Neonatal, evidencebased review of important issues concerning Hyperbilirubinemia. *Pediatrics.* 2004;114(1):297–316.
 20. Shapiro SM. Definition of the clinical spectrum of kernicterus and bilirubin-induced neurologic dysfunction (BIND). *J Perinatol.* 2005;25(1):54–9.
 21. Bhutani V, Wong R. Bilirubin neurotoxicity in preterm infants: Risk and prevention. *J Clin Neonatol.* 2013;2(2):61.
 22. Watchko JF. Bilirubin-Induced Neurotoxicity in the Preterm Neonate. *Clin Perinatol.* 2016;43(2):297–311.
 23. El Houchi SZ, Iskander I, Gamaleldin R, El Shenawy A, Seoud I, Abou-Youssef H, et al. Prediction of 3- to 5-Month Outcomes from Signs of Acute Bilirubin Toxicity in Newborn Infants. *J Pediatr.* 2017;183:51–5.
 24. Jon F. Watchko. Kernicterus and the Molecular Mechanisms of Bilirubin-Induced CNS Injury in Newborns. *Neuromolecular Med.* 2006;8(4):547–65.
 25. Yazarlar: Ronald J Wong, BA, Vinod K Bhutani. Unconjugated

hyperbilirubinemia in term and late preterm infants: Epidemiology and clinical manifestations. Erişim: 13.09.2020; Uptodate; <https://www.uptodate.com/content/unconjugated-hyperbilirubinemia-in-term-and-late-preterm-infants-epidemiology-and-clinical>

manifestations?search=clinical%20manifestations%20of%20unconjugated%20hyperbilir%3%BCbinemia&source=search_result&selectedTitle=1~133&usage_type=default&display_rank=1

26. Deliktaş M, Ergin H, Demiray A, Akça H, Özdemir ÖMA, Özdemir MB. Caffeine prevents bilirubin-induced cytotoxicity in cultured newborn rat astrocytes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019;32(11):1813-1819
27. Stanley Ip, MD; Mei Chung, MPH; John Kulig, MD, MPH; Rebecca O'Brien, MD; Robert Sege, MD, PhD; Stephan Glicken, MD; M. Jeffrey Maisels, MB, BCh; and Joseph Lau, MD and the S on H. An Evidence-Based Review of Important Issues Concerning Neonatal Hyperbilirubinemia. *Am Acad Pediatr.* 2004;114:130–52.
28. Stoll BJ, Kliegman RM. Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. (eds) *Nelson Textbook of Pediatrics.* Saunders Comp. (17th edition) 2003; 592-596.
29. Huang MJ, Kua KE, Teng HC, Tang KS, Weng HW, Huang CS. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatr Res.* 2004;56:682–9.
30. Maisels MJ, Bhutani VK, Bogen D, Newman TB, Stark AR, Watchko JF. Hyperbilirubinemia in the newborn infant ≥ 35 weeks' gestation: An update with clarifications. *Pediatrics.* 2009;124(4):1193–8.
31. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45:1121–32.
32. Ouzzine M, Gulberti S, Ramalanjaona N, Magdalou J, Fournel-Gigleux S. The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: Their role in drug metabolism and detoxication. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:1–12.
33. Ohta Y, Fukushima S, Yamashita N, Niimi T, Kubota T, Akizawa E, ve ark.. UDP-glucuronosyltransferase 1A1 directly binds to albumin. *Hepatol Res.* 2005;31(4):241–5.

34. Papageorgiou I, Court MH. Identification and validation of microRNAs directly regulating the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily enzymes by a functional genomics approach. *Biochem Pharmacol.*2017;137:93–106.
35. Halis H, Ergin H, Kösel A, Atalay EÖ. The role of UGT1A1 promoter polymorphism and exon-1 mutations in neonatal jaundice. *J Matern Neonatal Med.* 2017;30(22):2658–64.
36. Brites D. Bilirubin Injury to Neurons and Glial Cells: New Players, Novel Targets, and Newer Insights. *Semin Perinatol.* 2011;35(3):114–20.
37. Ana C Gordo 1, Ana S Falcão, Adelaide Fernandes, Maria A Brito, Rui F M Silva DB. Unconjugated Bilirubin Activates and Damages Microglia. *J Neurosci Res.* 2006;84(1):194–201.
38. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *1995;2236:471–4.*
39. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial Physiology: Unique Stimuli , Specialized Responses. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:119–45.
40. Béchade C, Cantaut-Belarif Y, Bessis A. Microglial control of neuronal activity. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:1–7.
41. Tüfekçi K., Genç K. Mikroglial aktivasyonda lipopolisakkarit uyarımıyla ekspresyonu değişen mikromrna'ların belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi) İzmir; Dokuz Eylül Üniversitesi; 2011.
42. Principles of epigenetics. Erişim : 15.06.2021/ up to date; [https://www.uptodate.com/contents/principles-of-epigenetics?search=\(uptodate%202020,%20Principles%20of%20epigenetics%20Author:%20Maria%20E%20Figueroa\)&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/principles-of-epigenetics?search=(uptodate%202020,%20Principles%20of%20epigenetics%20Author:%20Maria%20E%20Figueroa)&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
43. Silva SL, Vaz AR, Barateiro A, Falcão AS, Fernandes A, Brito MA, et al. Features of bilirubin-induced reactive microglia: From phagocytosis to inflammation. *Neurobiol Dis.* 2010;40(3):663–75.
44. Guo Y, Hong W, Wang X, Zhang P, Körner H. MicroRNAs in Microglia : How do MicroRNAs Affect Activation , Inflammation , Polarization of Microglia and Mediate the Interaction Between Microglia and Glioma ? *Front Mol Neurosci.* 2019;12:1–14.

45. Ponnusamy V, Yip PK. The role of microRNAs in newborn brain development and hypoxic ischaemic encephalopathy. *Neuropharmacology*. 2019;149:55–65.
46. Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, ve ark.. Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP 751SL mouse model of Alzheimer’s disease: Age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci*. 2008;28(45):11650–61.
47. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*. 2016;275:316–27.
48. Watchko JF, Tiribelli C. Bilirubin-induced neurologic damage - Mechanisms and management approaches. *N Engl J Med*. 2013;369(21):2021–30.
49. Unconjugated hyperbilirubinemia in term and late preterm infants: Management. Erişim tarihi: 09.12.2019 ; Up to Date; https://www.uptodate.com/contents/unconjugated-hyperbilirubinemia-in-term-and-late-preterm-infants-management?search=hyperbilirubinemia%20in%20term%20and%20late%20preterm%20infants:%20Management&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1
50. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*. 2007;128(4):635–8.
51. Hamilton JP. Epigenetics: Principles and practice. *Dig Dis*. 2011;29(2):130–5.
52. Katrina Steiling, Stephanie Christenson. Tools for genetics and genomics: Gene expression profiling. Erişim Tarihi: 16.03.2021/ UptoDate; [https://www.uptodate.com/contents/tools-for-genetics-and-genomics-gene-expressionprofiling?search=.%20%20%20%20\(up%20to%20date%202020,%20Tools%20for%20genetics%20and%20genomics:%20Gene%20expression%20profiling\).&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/tools-for-genetics-and-genomics-gene-expressionprofiling?search=.%20%20%20%20(up%20to%20date%202020,%20Tools%20for%20genetics%20and%20genomics:%20Gene%20expression%20profiling).&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1).
53. Saydam F. Micro RNAs and cancer. *Dicle Tıp Derg / Dicle Med J*. 2011;38(1):113–20.

54. Feinbaum R, Ambros V, Lee R. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 2004;116(116):843–54.
55. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE*. 2007;367.
56. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics Bioinforma*. 2015;13(1):17–24.
57. Krishnarao Appasani. *Micromas from basic science to disease biology* cambridge university press. Cambridge University Press. 2008; 5–58.
58. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *Rna*. 2019;25(1):1–16.
59. Rachel L. Clifforda, Cherie A. Singerb and AEJ. Epigenetics and miRNA emerge as key regulators of smooth muscle cell phenotype and function. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012;26:75–85.
60. Elodie Lages HI. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci*. 2012;17:2508–40.
61. Selvaskandan H, Pawluczyk I, Barratt J. MicroRNAs: A new avenue to understand, investigate and treat immunoglobulin a nephropathy? *Clin Kidney J*. 2018;11:29–37.
62. Lin S, Richard I. Gregory. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *HHS Public Access*. 2015;15:321–33.
63. Dumache R, Rogobete AF, Bedreag OH, Sarandan M, Cradigati AC, Papurica M, et al. Use of miRNAs as Biomarkers in Sepsis. *Anal Cell Pathol*. 2015;2015:9.
64. Moon H, Yang J, Zheng Y, Jin Y miR-15a/16 Regulates Macrophage Phagocytosis After Bacterial Infection. *Bone. J. Immunol* 2014 193(9): 4558–4567
65. Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as biomarkers for sepsis. *Int J Mol Sci*. 2016;17:9.
66. Pauley KM, Cha S, Chan EKL. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2009;32:189–94.

67. Sheedy FJ, O'Neill LAJ. Adding fuel to fire: MicroRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:50–5.
68. Metin T, Dinç E, Görür A, Erdoğan S, Ertekin S, Sarl AA, et al. Evaluation of the plasma microRNA levels in stage 3 premature retinopathy with plus disease: Preliminary study. *Eye*. 2018;32(2):415–20.
69. Lal CV, Olave N, Travers C, Rezonzew G, Dolma K, Simpson A, et al. Exosomal microRNA predicts and protects against severe bronchopulmonary dysplasia in extremely premature infants. *JCI insight*. 2018;3(5):1–17.
70. Syed M, Das P, Pawar A, Aghai ZH, Kaskinen A, Zhuang ZW, et al. Hyperoxia causes MIR-34a-mediated injury via angiopoietin-1 in neonatal lungs. *Nat Commun*. 2017;8:1–17.
71. Chen H, Zeng L, Zheng W, Li X, Lin B. Increased Expression of microRNA-141-3p Improves Necrotizing Enterocolitis of Neonates Through Targeting MNX1. *Front Pediatr*. 2020;8:1–10.
72. Liu H, Wang YB. Systematic large-scale meta-analysis identifies miRNA-429/200a/b and miRNA-141/200c clusters as biomarkers for necrotizing enterocolitis in newborn. *Biosci Rep*. 2019;39(9):1–11.
73. Chen Z, Hu Y, Lu R, Ge M, Zhang L. MicroRNA-374a-5p inhibits neuroinflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy via regulating NLRP3 inflammasome targeted Smad6. *Life Sci* . 2020;252(20):117664.
74. Li B, Dasgupta C, Huang L, Meng X, Zhang L. MiRNA-210 induces microglial activation and regulates microglia-mediated neuroinflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Cell Mol Immunol*. 2020;17:976–91.
75. Ponomarev ED. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *NIH Public Access*. 2012;23:1–7.
76. Xiong L, Zhou H, Zhao Q, Xue L, Al-Hawwas M, He J, et al. Overexpression of miR-124 Protects Against Neurological Dysfunction Induced by Neonatal Hypoxic–Ischemic Brain Injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;40:737–50.
77. Wang Z, Liu Y, Shao M, Wang D, Zhang Y. Combined prediction of miR-210

- and miR-374a for severity and prognosis of hypoxic–ischemic encephalopathy. *Brain Behav.* 2018;8(1):1–10.
78. Wu J, He J, Tian X, Luo Y, Zhong J, Zhang H, et al. microRNA-9-5p alleviates blood–brain barrier damage and neuroinflammation after traumatic brain injury. *J Neurochem.* 2020;153(6):710–26.
 79. Cheng C, Li W, Zhang Z, Yoshimura S, Hao Q, Zhang C, et al. MicroRNA-144 is regulated by activator protein-1 (AP-1) and decreases expression of alzheimer disease-related a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J Biol Chem.* 2013;288(19):13748–61.
 80. Sabirzhanov B, Stoica BA, Zhao Z, Loane DJ, Wu J, Dorsey SG, et al. MiR-711 upregulation induces neuronal cell death after traumatic brain injury. *Cell Death Differ.* 2016;23:654–68.
 81. Ma J, Shui S, Han X, Guo D, Li T, Yan L. microRNA-22 attenuates neuronal cell apoptosis in a cell model of traumatic brain injury. *Am J Transl Res.* 2016;8(4):1895–902.
 82. Hamzei Taj S, Kho W, Riou A, Wiedermann D, Hoehn M. MiRNA-124 induces neuroprotection and functional improvement after focal cerebral ischemia. *Biomaterials.* 2016;91:151–65.
 83. Çoban A, Kaynak Türkmen M, Gürsoy T. Turkish neonatal society guideline to the approach, follow-up, and treatment of neonatal jaundice. *Turk Pediatr Ars.* 2018;53:S172–9.
 84. Sininger YS, Cone-Wesson B, Folsom RC, Gorga MP, Vohr BR, Widen JE, et al. Identification of neonatal hearing impairment: Auditory brain stem responses in the perinatal period. *Ear Hear.* 2000;21(5):383–99.
 85. Özdemir ÖMA, Tümkaya F. Hearing screening program in the newborn and management: Review. *Turkiye Klin Pediatr.* 2017;26(1):13–21.
 86. Kuzniewicz MW, Wickremasinghe AC, Wu YW, McCulloch CE, Walsh EM, Wi S, et al. Incidence, etiology, and outcomes of hazardous hyperbilirubinemia in newborns. *Pediatrics.* 2014;134(3):504–9.
 87. Yazarlar: Ronald J Wong, BA, Vinod K Bhutani. Unconjugated hyperbilirubinemia in the newborn: Pathogenesis and etiology. Erişim Tarihi: 05.12.2019/<https://www.uptodate.com/contents/unconjugated->

hyperbilirubinemia-in-the- newborn-pathogenesis-and- etiology.

88. Erdeve O, Okulu E, Olukman O, Ulubas D, Buyukkale G, Narter F, et al. The Turkish neonatal jaundice online registry: A national root cause analysis. *PLoS One*. 2018;13(2):1–11.
89. Gamaleldin R, Iskander I, Seoud I, Aboraya H, Aravkin A, Sampson PD, et al. Risk factors for neurotoxicity in newborns with severe neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics*. 2011;128(4): 925-931.
90. Bozkurt Ö, Yücesoy E, Oğuz B, Akinel Ö, Palali MF, Ataş N. Severe neonatal hyperbilirubinemia in the southeast region of turkey. *Turkish J Med Sci*. 2020;50(1):103–9.
91. Campbell Wagemann S, Mena Nannig P. Severe hyperbilirubinemia in newborns, risk factors and neurological outcomes. *Rev Chil Pediatr*. 2019;90(3):267–74.
92. Bülbül A, Okan F, Uslu S, İş E, Nuho A. Term bebeklerde hiperbilirubineminin klinik özellikleri ve risk etmenlerinin araştırılması Orijinal Araştırma. *Türk Pediatr Arşivi*. 2005;40(3):204–10.
93. Saner Ö.H. Hiperbilirubinemi ile Takip Edilen Bebeklerin Değerlendirilmesi. *Online Türk Sağlık Bilim Derg*. 2019;(3):283–300.
94. Sgro M, Campbell D, Shah V. Incidence and causes of severe neonatal hyperbilirubinemia in Canada. *Cmaj*. 2006;175(6):587–90.
95. Bayoumi YA, Bassiouny YA, Hassan AA, Gouda HM, Zaki SS, Abdelrazek AA. Is there a difference in the maternal and neonatal outcomes between patients discharged after 24 h versus 72 h following cesarean section? A prospective randomized observational study on 2998 patients. *J Matern Neonatal Med*. 2016;29(8):1339–43.
96. Boskabadi H, Rakhshanzadeh F, Zakerihamidi M. Evaluation of maternal risk factors in neonatal hyperbilirubinemia. *Arch Iran Med*. 2020;23(2):128–40.
97. Gale R, Seidman DS, *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1990;10:82-6.
98. Vaz AR, Falcão AS, Scarpa E, Semproni C, Brites D. Microglia Susceptibility to Free Bilirubin Is Age-Dependent. *Front Pharmacol*. 2020;11(7):1–16.
99. Brito MA, Pereira P, Barroso C, Aronica E, Brites D. New autopsy findings in

- different brain regions of a preterm neonate with kernicterus: Neurovascular alterations and up-regulation of efflux transporters. *Pediatric Neurology* 2013; 49: 431e438
100. Çakmak A, Ertem M, Zeyrek D, Ataş AA KH. Türkiye'nin Güneydoğu bölgesinde annelerin sarılıkla ilgili inanışları ve davranışları. *Türkiye Klin J Med Sci.* 2009;29:810.
 101. Khoury MJ, Calle EE, Joesoef RM. Recurrence Risk of Neonatal Hyperbilirubinemia in Siblings. *Am J Dis Child.* 1988;142(10):1065–9.
 102. Sgro M, Kandasamy S, Shah V, Ofner M, Campbell D. Severe Neonatal Hyperbilirubinemia Decreased after the 2007 Canadian Guidelines. *J Pediatr* 2016;171:43–7
 103. Ebbesen F, Mortensen BB. Difference in plasma bilirubin concentration between monozygotic and dizygotic newborn twins. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2003;92(5):569–73.
 104. Salas AA, Salazar J, Burgoa C V., De-Villegas CA, Quevedo V, Soliz A. Significant weight loss in breastfed term infants readmitted for hyperbilirubinemia. *BMC Pediatr.* 2009;9:2–7.
 105. Aloulou H, Thabet A Ben, Khanfir S, Mansour L Ben, Chabchoub I, Labrune P, et al. La maladie de Crigler Najjar de type I en Tunisie: Etude de 30 observations. *Tunisie Medicale.* 2010;88(10):707–9.
 106. Greco C, Arnolda G, Boo NY, Iskander IF, Okolo AA, Rohsiswatmo R, et al. Neonatal Jaundice in Low- and Middle-Income Countries: Lessons and Future Directions from the 2015 Don Ostrow Trieste Yellow Retreat. *Neonatology.* 2016;110(3):172–80.
 107. Katar S, Akay HO, Taskesen M, Devecioglu C. Clinical and cranial magnetic resonance imaging (MRI) findings of 21 patients with serious hyperbilirubinemia. *J Child Neurol.* 2008;23(4):415–7.
 108. McDonnell M, Hannam S, Devane SP. Hydrops fetalis due to ABO incompatibility. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998;78(3):220–1.
 109. Tiker F, Gulcan H, Kilicdag H, Tarcan A, Gurakan B. Extreme hyperbilirubinemia in newborn infants. *Clin Pediatr (Phila).* 2006;45(3):257–61.

110. Gunay I. Effect of G6PD Deficiency on Neonatal Hyperbilirubinemia. *J Dr Behcet Uz Child Hosp.* 2011;1(3):115–20.
111. Katar S, Devecio C, Özel AK, Sucaklı İ. Kan Değişimi Yapılan Yenidoğan Bebeklerde Hiperbilirubinemi Etiyolojisinin Değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Derg / Dicle Med J.* 2006;3:174–7.
112. Christensen RD, Eggert LD, Baer VL, Smith KN. Pyruvate kinase deficiency as a cause of extreme hyperbilirubinemia in neonates from a polygamist community. *J Perinatol.* 2010;30(3):233–6.
113. Travan L, Lega S, Crovella S, Montico M, Panontin E, Demarini S. Severe neonatal hyperbilirubinemia and UGT1A1 promoter polymorphism. *J Pediatr.* 2014;165:42–5.
114. Ülgenalp A, Duman N, Schaefer F V., Whetsell L, Bora E, Gülcan H, et al. Analyses of polymorphism for UGT1*1 exon 1 promoter in neonates with pathologic and prolonged jaundice. *Biol Neonate.* 2003;83(4):258–62.
115. Babaoglu MO, Yigit S, Aynacioglu AS, Kerb R, Yurdakok M, Bozkurt A. Neonatal jaundice and bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene polymorphism in Turkish patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;98(4):377–80.
116. Kurtoğlu A, Özön N, Tekin Z, Hande G, Cengiz K, Ayhan T, Demir K, Evliyaoğlu O, Koç E, TND Yenidoğan Endokrinoloji Rehberi-2019. (<http://www.neonatology.org.tr>)
117. Vural M, Koc E, Evliyaoglu O, Acar HC, Aydın AF, Kucukgergin C, Apaydin G, Erginoz E, Babazade X, Sharifova S, Perk Y; Turkish Iodine Survey Group. Iodine status of Turkish pregnant women and their offspring: A national cross-sectional survey. *J Trace Elem Med Biol.* 2021;63: 126664.
118. Jeevasankar M, Agarwal R, Chawla D, Paul VK, Deorari AK. Polycythemia in the newborn. *Indian J Pediatr.* 2008;75(1):68–72.
119. Mehreen A, Patrick C S. Urinary tract infections in the infant. *Clin Perinatol.* 2015 Mar;42(1):17-28.
120. Bilgen H, Ozek E, Unver T, Biyikli N, Alpay H, Cebeci D. Urinary tract infection and hyperbilirubinemia. *Turk J Pediatr.* 2006 Jan-Mar;48(1):51-5

121. Olusanya BO, Osibanjo FB, Slusher TM. Risk factors for severe neonatal hyperbilirubinemia in low and middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(2):1–16.
122. Najib KS, Saki F, Hemmati F, Inaloo S. Incidence, risk factors and causes of severe neonatal hyperbilirubinemia in the south of Iran. *Iran Red Cres Med J*. 2013; 15(3): 260-3
123. Amin SB, Wang H. Bilirubin Albumin Binding and Unbound Unconjugated Hyperbilirubinemia in Premature Infants. *J Pediatr*. 2018;192:47–52.
124. Elhawary IM, Abdel Ghany EAG, Aboelhamed WA, Ibrahim SGE. Incidence and risk factors of post-phototherapy neonatal rebound hyperbilirubinemia. *World J Pediatr*. 2018 Aug;14(4):350-356
125. Maisels MJ, Watchko JF. Treatment of jaundice in low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88(6):459–63.
126. Hameed NN, Hussein MA. BIND score: A system to triage infants readmitted for extreme hyperbilirubinemia. *Semin Perinatol*. 2021;45:151354.
127. Arun Babu T, Bhat B V, Joseph NM. Association between peak serum bilirubin and neurodevelopmental outcomes in term babies with hyperbilirubinemia. *Indian J Pediatr*. 2012;79(2):202–6.
128. El Tatawy SS, Elmazzahy EA, El Shennawy AM, Madani HA, Abou Youssef H, Iskander IF. The spectrum of bilirubin neurotoxicity in term and near-term babies with hyperbilirubinemia: Does outcome improve with time? *Early Hum Dev*. 2020;140:104909.
129. Amin SB, Smith T, Timler G. Developmental influence of unconjugated hyperbilirubinemia and neurobehavioral disorders. *Pediatr Res* 2019;85(2):191-197.
130. Michelsson, K., Lindahl, E., Helenius, M. & Parre, M. Five and nine year check-up of 314 children with neonatal hyperbilirubinemia. *Early Child Dev. Care*. 1988;30:167–180.
131. Wisnowski JL, Panigrahy A, Painter MJ, Watchko JF. Magnetic Resonance Imaging Abnormalities in Advanced Acute Bilirubin Encephalopathy Highlight Dentato-Thalamo-Cortical Pathways. *J Pediatr*. 2016;174:260–3.
132. Yilmaz Y, Alper G, Kiliçoglu G, Çelik L, Karadeniz L, Yilmez-Değirmenci S.

- Magnetic resonance imaging findings in patients with severe neonatal indirect hyperbilirubinemia. *J Child Neurol*. 2001;16(6):452–5.
133. Gottstein R, Cooke RWI. Systematic review of intravenous immunoglobulin in haemolytic disease of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88(1):6–10.
 134. Martin NA, Hyrlov KH, Elkjaer ML, Thygesen EK, Wlodarczyk A, Elbaek KJ, et al. Absence of miRNA-146a Differentially Alters Microglia Function and Proteome. *Front Immunol*. 2020;11:1–21.
 135. Arora S, Rana R, Chhabra A, Jaiswal A, Rani V. MiRNA-transcription factor interactions: A combinatorial regulation of gene expression. *Mol Genet Genomics*. 2013;288(3–4):77–87.
 136. Cheng G. Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;81:75–93.
 137. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, et al. MiRNAs in cardiovascular diseases: Potential biomarkers, therapeutic targets and challenges review-article. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(7):1073–84.
 138. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009;30(10):475–87.
 139. Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, Denti MA. Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *Molecules*. 2014;19(5):6891–910.
 140. Kumar S, Reddy PH. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer’s disease? *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(9):1617–1627
 141. Murray DM. Biomarkers in neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy—Review of the literature to date and future directions for research. 1st ed. *Handbook of Clinical Neurology*. 2019; 281–293
 142. Ma Q, Dasgupta C, Li Y, Bajwa NM, Xiong F, Harding B, et al. Inhibition of microRNA-210 provides neuroprotection in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Neurobiol Dis*. 2016;89:202–12.
 143. Dluzen DF, Sun D, Salzberg AC, Jones N, Bushey RT, Robertson GP, et al. Regulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 expression and activity by MicroRNA 491-3ps. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;348(3):465–77.

144. Yang Z, Jiang X, Zhang J, Huang X, Zhang X, Wang J, et al. Let-7a promotes microglia M2 polarization by targeting CKIP-1 following ICH. *Immunol Lett.* 2018;202:1–7.
145. O’Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(5):1604–9.
146. Lei Chen RD. MicroRNA-146a protects against cognitive decline induced by surgical trauma by suppressing hippocampal neuroinflammation in mice. *Brain Behav Immun.* 2019 ;78:188-201
147. Ponomarev ED, Veremeyko T, Weiner HL. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia.* 2013; 61(1): 91–103)
148. Wang P, Nie YL, Wang SJ, Yang LL, Yang WH, Li JF, et al. Regulation of UGT1A expression by miR-298 in human livers from the Han Chinese population and in human cell lines. *Epigenomics.* 2018;10(1):43–57.
149. Tatsumi N, Tokumitsu S, Nakano M, Fukami T, Nakajima M. miR-141-3p commonly regulates human UGT1A isoforms via different mechanisms. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2018;33:203–10.
150. Cho KJ, Song J, Oh Y, Lee JE. MicroRNA-Let-7a regulates the function of microglia in inflammation. *Mol Cell Neurosci.* 2015;68:167–76.
151. Huang S, Ge X, Yu J, Han Z, Yin Z, Li Y, et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. *FASEB J.* 2018;32(1):512–28.
152. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, et al. Plasma microRNA as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem* 2009; 55:1977–83
153. Liu Y, Zhang J, Han R, Liu H, Sun D, Liu X. Downregulation of serum brain specific microRNA is associated with inflammation and infarct volume in acute ischemic stroke. *J Clin Neuroscience* 22 (2015) 291–295
154. Cunha C, Gomes C, Vaz AR, Brites D. Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization. *Mediators Inflamm.* 2016 (5);1-17

155. Yang T, Song J, Bu X, Wang C, Wu J, Cai J, et al. Elevated serum miR-93, miR-191, and miR-499 are noninvasive biomarkers for the presence and progression of traumatic brain injury. *J Neurochem*. 2016;137(1): 122–9.
156. Xi Lan, Xiaoning Han, Qian Li, Qing-Wu Yang and JW. Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nat Rev Neurol*. 2017;13: 420–433.
157. Shang Y, Dai S, Chen X, Wen W, Liu X. MicroRNA-93 regulates the neurological function , cerebral edema and neuronal apoptosis of rats with intracerebral hemorrhage through TLR4 / NF- κ B signaling pathway. *Cell Cycle*. 2019;18:3160–76.
158. Starr DA. miRNA in polarization - review. *Physiol Behav*. 2011;176(1):139–48.
159. Martinez-Nunez RT, Louafi F, Sanchez-Elsner T. The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor α 1 (IL13R α 1). *J Biol Chem*. 2011;286(3):1786–94.
160. Wang M, Mungur R, Lan P et al. MicroRNA-21 and microRNA-146a negatively regulate the secondary inflammatory response of microglia after intracerebral hemorrhage. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(7): 3348-3356
161. Qiu J, Zhou XY, Zhou XG, Cheng R, Liu HY, Li Y. Neuroprotective effects of MicroRNA-210 on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Biomed Res Int*. 2013;2013: 350419.
162. Cui H, Yang L. Analysis of microRNA expression detected by microarray of the cerebral cortex after hypoxic-ischemic brain injury. *J Craniofac Surg*. 2013;24(6):2147–52.
163. O’Sullivan MP, Looney AM, Moloney GM, Finder M, Hallberg B, Clarke G, et al. Validation of Altered Umbilical Cord Blood MicroRNA Expression in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *JAMA Neurol*. 2019;76(3):333–41.
164. Looney A, Walsh BH, Moloney G, Grenham S, Fagan A, Keefe GWO, et al. Downregulation of Umbilical Cord Blood Levels of miR-374a in Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr*. 2015;167:269–73.

165. Jiang F, Yang M, Wu C, Wang J. Potential Roles of miR-374a-5p in Mediating Neuroprotective Effects and Related Molecular Mechanism. *J Mol Neurosci.* 2019;69(1): 123–32.
166. Zhang L, Dong LY, Li YJ, Hong Z, Wei WS. The microRNA miR-181c controls microglia-mediated neuronal apoptosis by suppressing tumor necrosis factor. *J Neuroinflammation.* 2012;9:211.

Ek-1 CİDDİ HİPERBİLİRÜBİNEMİLİ YENİDOĞAN (≥35 hafta) SARILIK TAKİP FORMU

Başvuru merkezi: Protokol: Hasta adı: Cinsiyet (K/E): Doğum ağırlığı(gram): Başvuruda ağırlık(gram): Başvuruda vücut ısısı: Gebelik yaşı (hafta): Doğum şekli (CS/NSVY): Milliyeti: TC Suriyeli:	Anne kan grubu: Bebek kan grubu: Direkt Coombs : SerumTotal bilirubin mg/dl(TB)(pik): Direkt bilirubin mg/dl (DB): İndirekt bilirubin mg/dl (IB): Hb: Lökosit: MCHC: Retikülosit (%): CRP: I/T nötrofil oranı/hemoliz bulgusu:
Anne yaşı: Akraba evliliği: Beslenme şekli (Anne sütü/mama): Kardeşte fototerapi öyküsü: Sarılık kaçınıcı gün başladı: İlk 24 saatte sarılık:	Albümin: g/dl İdrar (lökosit/nitrit +): İdrar kültürü: Serbest T4: TSH: G6PD eksikliği : (bakılabiliyorsa) Pirüvat kinaz eksikliği: (bakılabiliyorsa) Kan kültürü: İşitme testi (ABR): kranial MR (yapılabiliyorsa)
Eşlik eden semptom/hastalık: Sefal hematoma, ekimoz: RDS, TTN: Hipoksik iskemik ensefalopati: İntrakranial kanama: Hipoglisemi: Apne:	Tedavi Fototerapi: IVIG: Exchange: Fenobarbital:
NÖROLOJİK MUAYENE Mental durum Uyuklama: Emmede zayıflık: Letarji: İrritabilite: Konvülsiyon: Semikoma / Koma: Kas tonusu Hafif azalmış/Hipotoni: Hipertoni / Retrokolis / Opistotonus: Bisiklet hareketi: Ağlama Yüksek sesli/Tiz sesli: Seyrek ağlama: Durdurulamayan/Sadece uyararla: Yenidoğan refleksleri Emme: Moro: Yakalama: BİND Skoru:	İstenen kan: Ciddi hiperbilirubinemili (TB ≥20 mg/dl) yenidoğanlardan EDTA'lı iki mor tüpe 2 ml venöz kan: a -EDTA'lı mor tüpe alınan venöz kanlardan biri 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra serum ependorf tüpüne ayrılarak -80 C'de saklanmalı, b -Diğer EDTA'lı mor tüpe alınan kan, santrifüj edilmeden (DNA izolasyonu amacıyla) -20 C'de saklanmalı

Çalışmaya Vaka Desteği Veren Merkezler:

1. Sabahattin ERTUĞRUL (Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi)
2. Şebnem ÇALKAVUR (Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi)
3. Özlem Şahin (Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi)
4. Merih Çetinkaya (Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi)
5. Nihal Demirel Elmacı (Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi)
6. Emel OKULU (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi)
7. Fatma Kaya Narter (Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi)
8. M. Yekta Öncel (Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi)
9. Nihal OYGÜR (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi)
10. Mustafa Aydın (Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi)
11. Mehmet SATAR (Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi)