

T.C.

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLILĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
YENİDOĞAN BİLİM DALI**

115215

**ASTROSİT HÜCRE KÜLTÜRÜNDE BİLİRUBİNİN NEDEN OLDUĞU  
APOPTOTİK VE NEKROTİK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

115215

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ  
DR. ABDULLAH KUMRAL**

7.7.2002

0212 334 11 11

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. HASAN ÖZKAN**

**İZMİR 2002**

## İÇİNDEKİLER

<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>4</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>5</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>9</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>10</b>
2.1. BİLİRUBİN TOKSİSİTESİ, ENSEFALOPATİ VE KERN İKTERUS.....	10
2.1.1. BİLİRUBİN TOKSİSİTESİNİN KLİNİK BULGULARI.....	11
2.1.2. TARİHÇE.....	13
2.1.3. BİLİRUBİN TOKSİSİTESİNİN PATOFİZYOLOJİSİ.....	16
2.1.3.1. Bilirubin Beyne Girişi.....	16
2.1.3.2. Bilirubin Hücresel Düzeydeki Toksik Etkileri.....	18
2.1.3.3. Hücre Kültüründe Bilirubin Toksikitesi .....	20
2.1.3.4. Bilirubin Toksikitesini Etkileyen Faktörler ve Tedbirler .....	22
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>25</b>
3.1. BİLİRUBİN SOLÜSYONUNUN HAZIRLANMASI.....	25
3.2. ASTROSİT KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI.....	25
3.3. İMMÜNFLORESAN BOYAMA.....	27
3.4. ANTI-ssDNA ANTİKORUYLA İMMÜNFLORESAN BOYAMA YÖNTEMİ İLE APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN SAPTANMASI.....	28
3.5. FLORESAN MİKROSKOBİ İNCELEMESİ İÇİN HÜCRE SÜSPANSİYONLARININ BOYANMASI:.....	29
3.6. HÜCRE ÖLÜMÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİNDE LDH YÖNTEMİ .....	31
3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME .....	33
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>34</b>
4.1. ASTROSİT KÜLTÜRLERİNİN SAFLIĞI.....	34
4.2. İNDİREK HİPERBİLİRUBİNEMİLİ HASTA SERUMUNUN ASTROSİT KÜLTÜRLERİNDE DOZA VE ZAMANA BAĞIMLI SİTOTOKSİK ETKİSİ .....	35
4.3. FARE ASTROSİT KÜLTÜRLERİNDE BİLİRUBİNİN DOZA VE ZAMANA BAĞIMLI SİTOTOKSİK ETKİSİ. 36	
4.4. İNDİREK HİPERBİLİRUBİNEMİLİ HASTA SERUMUNUN ASTROSİT KÜLTÜRLERİNDE DOZA BAĞIMLI APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ ETKİSİ.....	37
4.5. BİLİRUBİNİN ASTROSİT KÜLTÜRLERİNDE DOZA BAĞIMLI APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ ETKİSİ.....	39
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>49</b>

## TABLolar

Tablo 1. Kern ikterusun klinik özellikleri.....	13
Tablo 2. Bilirubin nörotoksisitesine duyarlılığı arttıran faktörler.....	24

## ŞEKİLLER

Şekil 1.....	26
Şekil 2.....	34
Şekil 3.....	35
Şekil 4.....	35
Şekil 5.....	36
Şekil 6.....	37
Şekil 7.....	37
Şekil 8.....	38
Şekil 9.....	39
Şekil 10.....	39
Şekil 11.....	40
Şekil 12.....	40

## **KISALTMALAR**

**LDH** : Lactate dehydrogenase

**DMEM** : Dulbecco's Minimal Essential Medium

**GFAP**: Glial Fibriler Asidik Protein

**TUNEL** : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling

**UCB** : Unconjugated bilirubin



## ÖZET

Yüksek serum bilirubin konsantrasyonu ile ilişkili klinik ensefalopati ve santral sinir sisteminde belirli bölgelerde sarı boyanma olarak gözlenen önemli patolojik değişiklikler arasındaki ilişki 1875 gibi çok erken dönemlerde tanımlanmıştır. Buna rağmen, günümüzde hala bilirubin nörotoksitesisi için, temel mekanizmayı neyin oluşturduğu sorusuna hala cevap aranmaktadır

Bilirubin sitotoksitesisi, astrositler ve nöronları da içeren değişik hücre tiplerinde gösterilmiştir. Beyin kapillerlerinin bariyer özellikleri astrositler tarafından oluşturulmaktadır. Bu hücreler hormonlar ve nutrientlerin beyne transportunda önemli rol oynarlar. Bu nedenle astrositler, KBB yetersizliğinde bilirubin ile ilk temas eden hücreler olabilir. Bilirubin ensefalopatisinde astrositlerin rolü büyük oranda ihmal edilmiştir. Astrositler, insanlarda beyin korteksindeki total hücresel volumün yaklaşık olarak üçte birini kapsar. Bu özellikleri nedeniyle, bilirubinin neden olacağı biyokimyasal hasarın gösterilmesinde, astrosit kültürü diğer modellere katkı sağlamaktadır.

Astrosit hücre kültüründe yaptığımız bu çalışmada, hiperbilirubinemili hasta serumu çok daha düşük bilirubin konsantrasyonlarında, kültür ortamına doğrudan eklenen bilirubinden daha fazla sitotoksitesiyeye neden olduğunu ve inaktive edilmemiş hasta serumunun inaktive edilmiş serum örneğine göre daha fazla sitotoksitesiyeye yol açtığını gördük.

Bu çalışmanın sonuçları gerek indirek hiperbilirubinemili hasta serumunun gerekse bilirubinin astrosit kültürlerinde doza ve zamana bağlı sitotoksitesiyeye yol açtığını göstermektedir. İndirek hiperbilirubinemili hasta serumunun astrosit üzerine toksik etkisi ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışma aynı zamanda bilirubinin fare astrositleri üzerine toksik etkisinin gösterildiği ilk çalışma özelliğini de taşımaktadır.

Bu çalışmada gerek indirek hiperbilirubinemili hasta serumunun ve gerekse bilirubinin astrosit kültürlerinde apoptotik hücre ölümünü indükleyip indiklemediği de araştırılmıştır. Sonuçlar hem hasta serumunun hem de bilirubinin doza ve zamana bağımlı astrosit apoptozuna yol açtığını göstermektedir. Bu tez çalışması indirek hiperbilirubinemili hasta serumunun apoptotik astrosit ölümüne yol açtığını gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca ilk kez bu çalışmada bilirubinin fare astrositlerinin apoptotik ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Apostain immünfloresan boyama sonuçları gerek hasta serumunun gerekse bilirubinin astrosit kültürlerinde doza bağımlı apoptotik hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir. LDH

sonuçlarına benzer biçimde bilirubin apoptotik hücre ölümünü indükleyici etkisi 48. saatte 72. saattekinden daha belirgin bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada indirek hiperbilirubinemi hasta serumunun ve bilirubin yenidoğan fare astrosit kültüründe doza ve zamana bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler :** indirek bilirubin, astrosit hücre kültürü, apoptozis, sitotoksikite

## SUMMARY

As early as 1875 it was established that there is an association between high serum bilirubin levels and clinical encephalopathy characterized by yellowish staining of certain central nervous system sites on pathological examination. However, even today the mechanism underlying the bilirubin neurotoxicity is not fully understood.

Bilirubin cytotoxicity has been demonstrated in different cell types, including astrocytes and neurons. Astrocytes form the barrier function of the brain capillaries. These cells comprise about one-third of the total cellular mass in the human brain cortex. astrocytes also play a vital role in the transport of hormones and micronutrients into the brain. Therefore, astrocytes may be the first line cells that come in contact with bilirubin when the blood-brain barrier fails. Their role in the development of bilirubin encephalopathy has not been fully investigated. Astrocyte cell cultures may contribute to other models in the demonstration of bilirubin neurotoxicity.

In this study performed on astrocyte cell cultures we demonstrated that serum from patients with hyperbilirubinemia caused more cytotoxicity than bilirubin added directly to the culture media, even when the level of bilirubin in the serum was much less than the directly added bilirubin. Also, inactivated serum samples caused less cytotoxicity than not inactivated samples.

Results of the current study show that both serum from patients with indirect hyperbilirubinemia and bilirubin itself causes cytotoxicity in astrocyte cell cultures. This study for the first time shows that serum from patients with indirect hyperbilirubinemia and bilirubin itself have cytotoxic effects on rat astrocytes.

The study also tried to identify whether serum from patients with indirect hyperbilirubinemia and bilirubin directly caused apoptotic cell death in astrocyte cell cultures. The results show that both serum from patients with indirect hyperbilirubinemia and bilirubin lead to dose and time dependent apoptosis in astrocytes. This thesis is the first study showing that serum from patients with indirect hyperbilirubinemia and bilirubin itself induce cell death via apoptosis. Apostain immunofluorescent staining showed that both patient serum and bilirubin lead to dose dependent cell death by apoptosis in astrocyte cell cultures. Similar to the effect of LDH, bilirubin caused most of its cytotoxic effect within 48 hours.

In conclusion, serum from patients with indirect hyperbilirubinemia and bilirubin directly induce dose and time dependent apoptotic cell death in newborn rat astrocyte cell cultures.

**Keywords:** indirect bilirubin, astrocyte cell culture, apoptosis, cytotoxicity





## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hiperbilirubinemi, yenidoğan döneminde ve özellikle premature doğan bebeklerde önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Daha da önemlisi serum bilirubin konsantrasyonlarında belirgin yükselme olmaksızın, infantların beyinlerinde bilirubin olabileceğinin rapor edilmiş olmasıdır. Hangi sarılıklı bebeğin tetkik ve tedavi edilmesi gerektiği, bilirubin toksisitesinin ne zaman başladığı, hangi aşamada geri dönüşlü olduğu ya da hangi durumlarda kalıcı bozukluğa yolaçtığı tam olarak bilinmediği için tedavi protokollerinin sağlam bilimsel verilere dayandırılması güç olmaktadır (1-3).

Neonatal sarılık tamamıyla benign fizyolojik bir süreç olabileceği gibi sinir sisteminde toksisiteye yol açarak ciddi bir hastalığın ilk bulgusu da olabilir. Hiperbilirubineminin neden olduğu ensefalopati, iyi tanımlanmış bir antite olmasına rağmen, bilirubin nörotoksitesinin altında yatan ana mekanizmasını anlamak, oldukça güç olmaktadır (4,5). Bilirubinün neden olduğu sitotoksitite astrositler (6) ve nöronlarında (7) içeren değişik hücre tiplerinde gösterilmiştir (8). Eksperimental kernikterusta, elektron mikroskopik ve otoradyografik çalışmalar, kandan nöronlara bilirubinün ana taşıyıcısının astrositler olduğunu göstermiştir (9). Astrositlerin, beyindeki en çok fonksiyon gören hücrelerden biri olduğu (10), enerji homeostazisini düzenlediği (11), kan beyin bariyerinin (KBB) bütünlüğünü sağladığı ve fagositik, immün ve detoksifikasyon fonksiyonlarına sahip olduğu yakın zamanda gösterilmiştir (12).

Astrositlerin primer kültürü ile yapılan çalışmaların değişik avantajlarının olması nedeniyle, bilirubin toksisitesini çalışmak amacıyla astrositlerin primer kültürünü seçtik. Astrositler, biyokimyasal ve morfolojik özellikleri ile *in vivo* bulunan normal diploid hücrelere benzerler. Astrositler yüksek derecede çoğaltılabilir preperasyonlardır. Diğer hücre tipleri ve sistemik faktörler ile olan etkileşimlerinin elimine edilebilir olması nedeniyle basit bir sistemdir (13). Astrositler, bu özellikleri nedeniyle bilirubinün neden olacağı primer hasarın ortaya konulmasına olanak sağlamaktadır.

Bu çalışma ile, bilirubin stok solüsyonlarının yanında, inaktive edilmiş sarılıklı yenidoğanların serumları kullanılarak, fare astrosit hücre kültüründe bilirubin toksisitesi ile indüklenen apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün Apoptein ve LDH sitotoksitesi testiyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. BİLİRUBİN TOKSİSİTESİ, ENSEFALOPATİ VE KERN İKTERUS

Ondokuzuncu yüzyılın sonları ve 20.yy başlarında bilirubinın nörotoksin olduğu ve kernikterusa neden olduğu tanımlandı (14), ve araştırmacılar 1950'lerin başlarında bilirubin nörotoksisitesinin temel mekanizmalarını araştırmaya başladılar. Bilirubin pekçok sayıda enzimi inhibe ettiği ve membran fonksiyonlarını bozduğu, ancak bilirubin toksisitesinin temel hücrel mekanizmasında en muhtemel olayın oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu olduğu düşünüldü (5). Bilirubin nörotoksisitesi için, temel mekanizmayı neyin oluşturduğu sorusuna hala cevap aranmakta olup, araştırmalar devam etmektedir.

Diğer taraftan, neonatal sarılık tamamiyle benign fizyolojik bir süreç olabileceği gibi sinir sisteminde toksisiteye yol açacak ciddi bir hastalığın ilk bulgusu da olabilir. Bilirubin ensefalopatisi ya da kern ikterus tanımları bilirubinın santral sinir sistemine olan toksisitesinin klinik ve patolojik görüntülerini yansıtır.

**Kern ikterus terimi;** genellikle bilirubin toksisitesine ait olduğu düşünülen klinik ve nöropatolojik bulguların geniş bir spektrumunu kapsayacak şekilde kullanılır. Ancak kern ikterus daha dar kapsamlı bir tanımdır ve yalnızca başta bazal ganglionlar, pons ve serebellum olmak üzere beynin spesifik bölgelerinde nöronal ölüm ve pigment birikimi ile karakterize olan nöropatolojik değişiklikleri içerir.

**Bilirubin ensefalopatisi terimi;** çok daha yakın bir geçmişte kullanılmaya başlanmıştır ve bilirubinın santral sinir sistemine olan etkilerinin klinik bulgularını yansıtan bir terimdir. Bunlar erken dönemde gözlenen hafif ve hatta geri dönüşümlü olan bazı bulgulardan (letarji, iritabilite, kas tonusunda değişiklikler, beyin sapı işitsel uyarılma potansiyellerinde (BIUP) düzleşme ve/veya uzamış latans gibi), hayatın ilk günlerinde opistotonus, nöbetler ve ölüm gibi çok daha ağır bulgulara kadar değişebilir. Neonatal bilirubin hasarının, koreoatetoid serebral palsi, yüksek frekanslı işitme kaybı ve yukarı bakış paralizisi gibi geç ve kalıcı bulguları da bilirubin ensefalopatisinin genişletilmiş tanısında yer alabilir (3,15,16).

### 2.1.1. BİLİRUBİN TOKSİSİTESİNİN KLİNİK BULGULARI

Yüksek bilirubin düzeyleri birkaç saat sürmeden genellikle bilirubin nöropatisi belirgin hale gelmez. Azalmış aktivite, beslenme isteksizliği, bebeğin ağlama değişiklikleri, letarji, irritabilite ve apneyi içeren bir geri dönüşümlü bulgular dönemi tanımlanmıştır. Eğer bilirubin düzeyi, örneğin kan değişimi yoluyla hızla azaltılırsa bu bulgular sıklıkla geri döndürülebilir.

Eğer hiperbilirubinemi devam ederse kısa zaman içinde bu belli belirsiz bulguları tüm ekstremitelerin rigid ekstensiyonu, kolların sıkı yumruk pozisyonu, bacakların çapraz ekstansiyonu ve tiz sesli ağlama izler. Bazen bu bulgulara opistotonus ve nöbet aktivitesi eşlik edebilir. Yaşayan bebeklerde birkaç ay sonra kas tonüsü ve beslenme güçlüğü azalır ve tremor, ince motor beceriksizlik, gözlerde takip yetersizliği, sabit yukarı bakış kısıtlılığı ile birlikte genellikle spastik veya koreatetoid serebral palsi gelişir. Yüksek frekanslı işitme kaybı ve mental retardasyon da bu sendromun bir parçasıdır. Çocukluk çağından sonraki en sık bulgular koreatetoz, oküler paralizi ve sekizinci sinir sağırlığıdır, ciddi mental retardasyon ve spastik serebral palsi çok az bir kısmında ortaya çıkar. Genellikle motor bulgular uzun dönem yaşayanlarda en belirgin anormalliklerdir (15,17).

Rh hemolitik hastalığının sorun olduğu ve prematüre yoğun bakımın yetersiz kaldığı yıllarda kern ikterus gelişen bebeklerin yarısından fazlası ölüyor, 1984 ve 1999 yılları arasında ful term ve terme yakın bebeklerin kayıtlarında kern ikteruslu bebekler arasındaki mortalite oranı % 4 olarak saptanmıştır (15). Hemolitik hastalıklı bebeklerin sık izlendiği yıllarda akut bilirubin ensefalopatisinin klinik özellikleri çok iyi tanımlanmış ve 3 faza ayrılarak değerlendirilmiştir (15) (Tablo 2). Birinci fazda ilk birkaç gün içinde stupor, hipotoni ve emme güçlüğü vardır. Bu bulgular nonspesiftir ancak prognoz daha kötü olduğu ikinci faza gidiş nedeniyle riskli çocuklarda akla getirilmelidir. Ayrıca ilk tanımlanan serilerde bu dönemde de mortalite bildirilmiştir. İlk günlerden sonra gelişen ikinci fazda hipertoni ve ateş gelişir. Hipertoni ekstansör kas gruplarını etkiler ve çoğu bebekte retrokolis ve opistotonus görülür. Her ne kadar bu artmış tonus sıklıkla spastisite olarak tanımlansa da hipertoni kortikospinalden ziyade ekstrapiramidal orijinli olduğu için doğru bir tanımlama değildir. Bebeklerin % 80'inde hipertoni ile birlikte ateş de ortaya çıkmaktadır. Ateş herhangi bir nedene bağlanamaz, kern ikterusun diensefalik tutulumu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (16). Üçüncü klinik faz hipertoninin gerilemesi ile karakterizedir. Başlangıcı değişken olabilmekle birlikte genellikle ilk haftadan sonra ortaya çıkar. Tonüste düzelleme gözlenmesinin kern ikterusun kronik formunun gelişmeyeceğinin bir kanıtı olabileceği öne

sürülmüşse de gerçekte ikinci faza girmiş ve hipertoni gelişen hemen tüm bebeklerde kronik bilirubin ensefalopatisi geliştiği görülmüştür (16). Bunun tersi de geçerlidir. Prospektif bir çalışmada kronik bilirubin ensefalopatisi gelişen çocukların % 10'unun yenidoğan döneminde hiçbir bulgusu olmadığı ya da minimal bulguları olduğu görülmüştür (18). Kronik dönemdeki bilirubin ensefalopatisinde hayatın ilk yılında bebekler yetersiz beslenen, tiz tezle ağlayan bebeklerdir. Derin tendon reflekslerinde artış ile birlikte hipotoni vardır. Motor becerilerin kazanımı olguların çoğunda gecikmiştir ve genellikle 5 yaşında yalnız başına yürüyebilir duruma gelirler. Kern ikterusun kronik dönemdeki major klinik bulguları birinci yıldan sonra ortaya çıkar, bazen bu süre birkaç yıl uzayabilir (Tablo 2).

Term bebeklerde hiperbilirubineminin neden olduğu kern ikterusun karakteristik bulguları ekstrapiramidal bozukluklar, bakış anormallikleri ve sensorinöral işitme kaybıdır. Özellikle atetoz olmak üzere belirgin ekstrapiramidal bozukluk 18 ay gibi erken dönemlerde de gelişebilir ancak bazen 8-9 yaşına dek gecikebilir. Ciddi şekilde etkilenmiş çocuklarda ortaya çıkan atetoz ekstremitelerin kullanımını engelleyebilir. Ayrıca bu çocuklar ciddi dizartri, salya akıtma, çiğneme ve yutma güçlüğüne sahip olabilirler (16).

İşitme kaybı; kronik bilirubin ensefalopatili çoğu çocukta değişik derecelerde vardır. Kronik bilirubin ensefalopatili 59 çocuğun prospektif çalışmasında 17 çocuğun işitme kaybına sahip olduğu bunların 10'unda işitme kaybının orta-ağır şiddette olduğu görülmüştür (19). Diğer uzun süreli izlem çalışmalarında da işitme kaybı kronik bilirubin ensefalopatili çocuklarda ağır derecelerde ve en sık gözlenen nörolojik anormallik olarak belirtilmiştir (18). Bakış anormallikleri; özellikle yukarı bakış kısıtlılığı kronik dönemin diğer bir sık bulgusudur. Çoğu çocukta okulosefalik taş bebek manevrasıyla tam vertikal göz hareketleri izlenir, bu da okulomotor çekirdeğin daha yukarısındaki düzeylerde bir hasar olduğunu gösterir.

İzlem çalışmalarında çocuklara uygulanan zeka testlerinin çok az bir kısmında major gerilik saptanmıştır. Atetozlu çocukların yalnızca % 20'sinde IQ < 70 bulunmuştur (18). Kern ikterusun klasik bulguları prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin izlemlerinde genellikle görülmez, çünkü çoğu etkilenmiş bebek bu döneme kadar yaşamaz. Bununla birlikte hafif nörolojik bozukluklar ve belli belirsiz gelişme gerilikleri, serum indirekt bilirubin konsantrasyonunun orta derecede yüksekliği ile ilişkili bulunmuştur. Ancak prematürite ve yenidoğanın diğer hastalıklarının da bu duruma katkısı olabileceği için bu bebeklerde bilirubine bağlanan belirsiz nörolojik hasarın geri dönüşlülüğü veya uzun dönem bulgularına ilişkin tartışmalar vardır (15-17).

**Tablo 1. Kern ikterusun klinik özellikleri**

<b><i>Akut form</i></b>
<b>Faz 1: (ilk 1-2 gün):</b> emme güçlüğü, stupor, hipotoni, nöbet
<b>Faz 2: (ilk haftanın ortaları):</b> Ekstensör kasların hipertoni, opistotonus, retrokolis, ateş
<b>Faz 3 (ilk haftadan sonra):</b> hipertoninin gerilemesi
<b><i>Kronik form</i></b>
<b>İlk yıl:</b> hipotoni, aktif derin tendon refleksi, obligatuar tonik boyun refleksi, motor beceri gecikmesi
<b>İlk yıldan sonra:</b> hareket bozuklukları (koreoatetoz, ballismus, tremor), yukarı bakış kısıtlılığı, sensorinöral işitme kaybı

### 2.1.2. TARİHÇE

Yüksek serum bilirubin konsantrasyonu ile ilişkili klinik ensefalopati ve santral sinir sisteminde belirli bölgelerde sarı boyanma olarak gözlenen önemli patolojik değişiklikler arasındaki ilişki 1875 gibi çok erken dönemlerde tanımlanmıştır. İkterus neonatorum nedeniyle ölmüş bir yenidoğanın beyinde bilirubin kristalleri tanımlanmış ve bu durum nekroze olmuş beyin dokularının ikterik pigmentasyonu absorbe etmesi şeklinde yorumlanmıştır. İlk kez 1904 yılında beynin dejenerasyon olmuş bölgelerinde bazı fokal ikterik pigmentasyonlar için kern ikterus terimi kullanılmıştır. Ancak nekrozun bazı toksinler, belki safra veya trombozisin neden olduğu vasküler hasardan kaynaklandığına inanılmıştır. Ayrıca nöral dokudaki boyanmanın ciddi sarılıklı bebeklerin yalnızca küçük bir kısmında ortaya çıktığı (otopsi yapılan 120 yenidoğan sarılığı olgusunda yalnızca 6 kernikterus) gözlemlenmiştir. Aynı yıllarda sepsisin yenidoğan sarılığı gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiş ve beyin dokusu boyanmasının şu nedenlere bağlı olabileceğini belirtilmiştir: safra pigmentinin nekroza yol açacak şekilde ganglion hücrelerine olan özel ilgisi, boyandığında ganglion hücrelerinin safra tuzları tarafından hasarlanması ve hücrelerin boyanmış hale gelmesine yol açan iskemik veya travmatik olaylar.

Bundan sonraki iki dekad benzer klinik gidiş ve anatomik değişiklikleri olan çeşitli hastaların tanımlanmasıyla geçmiş ve bu sürede sarılık ve nükleusların boyanması arasındaki ilişkiye yönelik olarak fazla bir ilerleme olmamıştır. 1915 gibi çok eski yıllarda bile mental retardasyon ve nöromusküler disfonksiyon ile sonuçlanan ciddi neonatal sarılıklı yaşayan çocuklar tanımlanmış ve sorumlu olarak sarılık düşünülmüştür. 1933'de kern ikterus ile ilgili

literatürün gözden geçirilmesiyle çoğu prematüre olsa da tüm bebeklerin doğumda normal göründükleri, hayatın ikinci gününden önce başlayan sarılık ile konvülsiyon ve spastisiteyi içeren santral sinir sistemi tutulumunun ortaya çıktığı ve ölümün genellikle hayatın beşinci gününde görüldüğü ortaya konmuştur.

Kern ikterusun tarihsel seyrinde kan değişiminin uygulamaya girmesi oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Her ne kadar ailesel sarılıklı bir yenidoğanda yapılmış olan ilk başarılı kan değişimi 1925'de bildirilmiş olsa da bu girişim modeli 1940'larda yenidoğanın hemolitik hastalığı tam olarak anlaşılncaya dek uygulanmamıştır. Kan değişimi total bilirubin yükünü azaltarak bilirubin ensefalopatisi gelişim riskini azaltır. Kan değişiminin ilk uygulamaları kanın sagittal sinüs veya radyal arterden alınıp safen vene verilmesi şeklindeydi. Daha sonra polietilen kateterlerin geliştirilmesi ile umbilikal ven kateterizasyonu yoluyla kan alışı verişinin yapıldığı teknik 1946'da geliştirilmiştir (14,15).

Kan değişiminin 1950'lerde yaygın olarak kullanıma girmesinden önce kern ikterus eritroblastosisli olarak canlı doğan bebeklerin % 15'ini etkiliyordu. Bu olguların % 70'i ilk bir hafta içinde, geriye kalanların çoğu ise ilk bir yıllık sürede kaybediliyordu. Yaşayanlar kalıcı nörolojik sekellere sahipti ve tüm serebral palsili olguların % 10'undan sorumlu olduğu belirtilmekteydi (20). Bu durumun ciddi morbiditesi dikkate alındığında uygulamanın kendine ait tanımlanmış riskleri olsa bile kan değişimi ile sağlanan büyük katkının önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

1950'lerde kern ikterus hemen tümüyle eritroblastosis fetalise ait bir sekel olarak düşünülmüştür ve hasar ile sarılığın şiddeti arasındaki ilişki tanımlanmıştır. Bu nedenle yalnızca Rh uygunsuzluğu önemli olarak düşünülmüştür. Diğer kan grupları, prematürite, sepsis, pulmoner hasar ve maternal diabetin klinik veya patolojik hastalığın ortaya çıkışında kofaktör olarak görülüp görülmeyeceği konusunda tartışmalar yaşanmıştır (15).

1950 ve 1952 yılları arasında yayımlanan bir seride Hsia ve arkadaşları (20) kern ikterus, eritroblastosis fetalis ve yüksek serum indirekt bilirubin konsantrasyonuna bağlı nörolojik hasarı önlemek için girişimlerle ilgili çağdaş bilgi ve yaklaşımı özetlemişlerdir. Bu yayımların sonucunda yazarlar, kern ikterusun serum bilirubin düzeyi 30 mg/dl'den daha fazla olan bebeklerde ortaya çıkmasının olası olduğunu, serum bilirubin düzeyi 20 mg/dl nin altında kaldığında ise olası olmadığını belirtmişlerdir (20). Bu sonuç klinik uygulama, bakım standartları ve hatta yasal durumlarla ilgili kararlar üzerine etkili olmayı günümüzde de sürdürmektedir. Ancak kern ikterusu önlemek için uygun hiperbilirubinemi tedavisi ile ilgili tartışmalar sürmektedir.

Crigler ve Najjar 1952'de kern ikteruslu konjenital ailesel nonhemolitik sarılığı tanımlayarak yalnızca yeni bir hastalığı tanımlamakla kalmamış kern ikterusun spesifik kan grup uygunsuzluğu ve hatta hemolizden ziyade yüksek indirekt bilirubin düzeyleri ile ilişkili bir süreç olduğunun anlaşılmasını da sağlamışlardır.

Neonatal sarılığın tedavisinde kan değişiminden sonraki en büyük gelişme izoimmunizasyonun önlenmesi ve pik serum bilirubin konsantrasyonunu azaltacak daha basit bir yöntem olan fototerapinin etkinliğinin gösterilmesi olmuştur. Kızılderililer bebeklerin sarı renklerinin azalmasında güneş ışığının faydalı etkilerinin uzun zamandır farkında olsalar da neonatal hiperbilirubinemi için fototerapi ilk kez 1958'de İngiltere'de ileri sürülmüştür. Daha sonra bu tedavi yüksek serum bilirubin düzeyinin azaltılmasında ve prematüre bebeklerde hiperbilirubineminin önlenmesinde proflaktik olarak kullanılmıştır. Maternal immunizasyonu önlemek için Rh immunglobülinin geliştirilmesi ve fototerapinin girişi ile sağlıklı term bebeklerde kan değişimi gereksinimi büyük ölçüde azalmıştır (15).

Maternal-fetal kan grup uygunsuzluğunun önlenmesi ve bilirubin konsantrasyonunun azaltılmasındaki bu gelişmeler hasta prematüre bebeklerin yaşatılmaya çalışılması ile aynı dönemdedir. Bu nedenle term bebeklerdeki kern ikterus olguları belirgin ölçüde azalırken bu kez, özellikle respiratuvar distressi, asidozu ve sepsisi olan hasta ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin otopsilerinde kern ikterus görülmeye başlanmıştır. Hatta bu durum daha önce bildirilen sınırlara asla ulaşmayan serum bilirubin düzeylerinde de gösterilmiştir. Bu da düşük doğum ağırlıklı bebeklerdeki bilirubin toksisitesinin eritroblastosis fetalisi term bebeklerdekinden farklı bir yolla ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Kern ikterus büyük ölçüde respiratuvar distressli, asidozlu ve orta derecede yüksek serum bilirubin düzeyleri olan prematüre bebeklerde rastlantısal otopsi bulgusu olarak saptandığı için daha önceki yıllardakine benzer sorular sorulmaya başlanmıştır. Bilirubin hasarın nedeni midir yoksa daha önceki hasarlanmanın neden olduğu bir doku boyanması mıdır? Hastalar kern ikteruslu mu ya da kernikterusa bağlı olarak mı ölüyorlar? Ancak bazı olgularda bilirubin ensefalopatisinin ölümden önce tanımlanması ve otopside santral sinir sisteminde gözlenen tek belirgin bulgunun klasik dağılımdaki sarı nöronal boyanma olması nedeniyle bunun bilirubin gerçekte toksisitesi olduğu kabul edilmiştir (15).

1960'lı yıllara gelindiğinde Rh hemolitik hastalığı olmayan zamanında doğmuş bebeklerde de özellikle serum bilirubin düzeyi 20 mg/dl değerinin üzerine çıktığında kern ikterus gelişen olgular tanımlanmış (21) ve bu nedenle hemolizi olmayan bebeklerde de Rh hemolitik hastalığı olan bebekler için belirlenen kan değişim sınırlarının uygulanması önerilmiştir (22). Bundan sonraki yıllar bu sınırların özellikle sağlıklı term bebeklerde

gerçekten gerekli olup olmadığının tartışılmasıyla geçmiş ve yapılan pek çok araştırmaya karşın bu tartışma günümüzün de en önemli konularından birisi olmaya devam etmiştir.

### 2.1.3. BİLİRUBİN TOKSİSİTESİNİN PATOFİZYOLOJİSİ

Bilirubin nörotoksitesi için, temel mekanizmayı neyin oluşturduğu sorusuna hala cevap aranmaktadır. Bilirubin birçok biyolojik reaksiyonlar ve sistemler için toksiktir. Neonatal bilirubin toksisitesini tam olarak anlayabilmek için bazı faktörlerin açıklanması gerekmektedir. Bunlar; bilirubinin beyne girişi, hücresel düzeydeki hasarı, erken tanı ve nasıl önlenebilir?

#### 2.1.3.1. Bilirubinin Beyne Girişi

Bugüne kadar bilirubinin beyne girişini ve beyinden klirensini etkileyen pekçok durum çalışılmış olsada, kernikterusta bilirubinin nasıl beyinin bazı bölgelerini tercih ettiği ve kalıcı beyin hasarının ortaya çıkması ile ilişkili mekanizmalar hala açık değildir Bilirubinin beyne girişine yönelik çeşitli hipotezler geliştirilmiştir ve henüz çürütülmemiştir.

**Serbest bilirubinin geçişi;** Bu hipotez tam olarak doğrulanamasa da büyük ölçüde kabul görmüştür. Lipofilik diğer maddeler gibi normalde serumda albumine bağlı bilirubin ile bir dengede olan serbest bilirubin de diffüzyon yolu ile kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Böylece serbest bilirubin miktarındaki herhangi bir artış veya albüminin miktarı ya da bilirubin bağlama kapasitesindeki herhangi bir azalma serbest bilirubinin kan beyin bariyerini geçip beyin dokusu içinde birikmesini ve sonuçta nöral hücre membranı içinde bilirubin asit şeklinde çökmesini sağlayabilir. Bu hipotezle uyumlu olan bilgi fizyolojik hiperbilirubinemi sırasında bile bir miktar serbest bilirubinin kan beyin bariyerini kalayca geçebileceğidir. Ancak bu geçişinin klinik önemi bilinmemektedir. Orta derecede serum bilirubin yükseklikleri sırasında ortaya çıkan dikkat, uyanıklık ve motor performanstaki geçici değişikliklerin nedeninin bu olabileceği belirtilmiştir. Albüminin bilirubine olan afinitesini ya da bağlama kapasitesini azaltan veya asidoz, hipoalbüminemi gibi nedenlerle bilirubinin dokulara hareketini arttıran herhangi bir durum varlığında bilirubinin beyne girişi artacaktır (4,15).

**Asidozun bilirubinin çözünürlüğünü azaltarak bilirubin asit formunda dokulara geçişini kolaylaştırması;** İkinci hipotez bilirubinin albümine bağlanma durumu yanında hücre membranlarını geçen bilirubinin kimyasal yapısını incelemiş ve asidotik bebeklerdeki artmış riskin açıklanmasına öncelik vermiştir. Alkali pH'da bilirubin suda eriyen bir sodyum



tuzu yapısındadır, fakat nötral veya düşük pH'da çözünürlüğü oldukça azdır. Bu nedenle bilirubin plazmada iki hidrojen iyonunun ayrılmasıyla albümine bağlı bir dianyon olarak bulunur. Asidik pH'da, serbest bilirubinin çözünürlüğü azalmakta ve ortamda bulunan hidrojen iyonlarıyla bir (monobazik bilirubin şeklinde) ya da iki (bilirubin asit şeklinde) hidrojen iyonu ile bağlanarak kolayca dokulara geçişi mümkün olmaktadır. Serumda bilirubin asit miktarı fazla olduğunda kolayca dokulara çökme eğilimi gösterir. Bu da sarılıklı bebeklerin dokularında bilirubin asidin çöktüğü anlamına gelir (23). Bu modelde bilirubin asidin miktarı plazma pH'sındaki çözünürlüğü ile ilişkili olarak serbest bilirubinin konsantrasyonu tarafından belirlenir.

Bu teori asidozun kern ikterus gelişiminde oynadığı rol için önemli bir açıklama sağlar. (24,25). Prematüre bebeklerde solunum distressine bağlı asidoz ile düşük serum albümin düzeyi bir araya geldiğinde bu bebekler orta derecede bilirubin yüksekliklerinde bile kern ikterus yönünden riskli bir duruma girmektedirler. Ancak bilirubin asit veya bilirubin asit tuzunun (monobazik bilirubin) hücre membranlarını geçen veya dokulara bağlanan bilirubin formu olup olmadığı halen açık değildir (15).

Kan-beyin bariyerinin bozulması ile albumine bağlı bilirubinin geçmesi; Üçüncü teori albumine bağlı olan bilirubinin beyne esas olarak hasarlanmış kan beyin bariyeri aracılığı ile girdiğini öne sürer. Vasküler hasar, anormal dolaşım veya anormal osmolarite gibi durumların varlığında albümin ve bilirubine karşı olan bariyer geri dönüşümlü olarak açılabilir. Hipertermi ve septisemi de benzer etkilere sahip olabilir. Kan beyin bariyeri bağlantısının kaybı herhangi bir serum bilirubin konsantrasyonunda bilirubinin beyne geçişini sağlayabilir. Bu hipoteze göre bilirubinin santral sistemine olan bölgesel toksisitesi için hücre membranında ya da hücre içinde albüminden ayrılması gerekmektedir, çünkü serbest bilirubinin bağlı bilirubine göre çok daha fazla toksik olduğu in vitro çalışmalardan bilinmektedir. Ancak yine de hasarlı bir kan beyin bariyeri varlığında bile albüminden daha fazla bilirubin beyne girer ve bu da bilirubin girişi ile ilgili çeşitli mekanizmaların aynı anda devrede olabileceğini göstermektedir (26,27).

Bir kan beyin bariyeri olduğu ilk kez 19. yüzyılda Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Evan's mavisinin enjeksiyonundan sonra tüm vücut organlarının maviye boyandığı fakat beyin boyanmadığı gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar kan-beyin bariyerinin beyin endotel hücrelerinden oluştuğunu göstermiştir. Beyin endotel hücreleri diğer endotel hücrelerinden bazı farklılıklar göstermektedir. Bunlar arasında "tight junction" bulunmakta ve bu da küçük molekül ve iyonların beyne serbestçe girip çıkmasına engel olmaktadır. Bu hücrelerde çok az sayıda pinositik vezikül bulunmaktadır. Bu nedenle plazma proteinleri

taşınmamaktadır. Bu kapiller endotelin çevresinde bazal membran yer alır. Bazal membran kollajen ve glikoproteinden oluşmakta ve kapiller duvarın gücünü arttıran bir iskelet görevi görmektedir. İmmatür hayvanlarda bazal membran dört kat daha az materyal içerir. Bazal membranın çevresinde astrositler yer alır. Bazal membran iki hücre için ortaktır. Astrositlerin beyin kapiller endotel hücrelerinin bu şekilde diferansiye olmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Tüm bu diferansiyasyon fetal hayatta başlar. Beynin büyüdüğü ve dendritik hücrelerin artmaya devam ettiği dönemde de devam eder. İmmatür beyinde kan-beyin bariyeri erişkinin metabolik ve yapısal özelliklerini taşımasa da bu bariyerin restriktif özellikleri beyin korumak için yeterlidir. Bazı kaynaklarda yenidoğan döneminde kan-beyin bariyerinde bir immatürasyon olduğu ileri sürülmekle birlikte pek çok yayında her hangi bir immatürasyon olmadığı belirtilmektedir. Ancak prematürelde nonlipofilik maddelere karşı pasif permeabilitenin daha fazla olduğu öne sürülmüştür (27).

### 2.1.3.2. Bilirubin Hücresel Düzeydeki Toksik Etkileri

Ciddi hiperbilirubinemi ile ilgili asıl endişe nörotoksik etki potansiyelidir, fakat yaygın hücresel hasar da meydana gelir (17). Bilirubin beyin dokusu içine girişi ile ilgili çelişiklere benzer şekilde hücresel düzeydeki toksik etkilerini gerçekte nasıl ortaya çıkardığı da tam olarak anlaşılamamıştır. Aşağıdaki mekanizmalar teorik olarak öne sürülmüştür (28) ;

- a) Normal sinir iletiminin kesilmesi
- b) Mitokondriyal disfonksiyon
- c) Sellüler ve intrasellüler membran bozukluğu
- d) Enzim aktivitelerinin engellenmesi

**Normal sinir iletiminin kesilmesi;** Beyin sapı işitsel uyarılmış yanıtlarında orta derecede hiperbilirubinemi düzeylerinde geri dönüşlü bazı değişiklikler saptanmış olması nedeniyle sinir iletiminin bilirubin toksisitesinin erken dönemdeki hedefi olduğu düşünülmüştür. Bilirubin nörotransmitter salınımında oldukça önemli olan enzimlerin (örneğin sinapsin I) fosforilasyonunu inhibe ettiği in vitro olarak gösterilmiştir (4). Bilirubin ayrıca sinaptik transmisyonun bir belirleyicisi olan tirozinin alımını inhibe eder ve sinaptik transmisyon ile ilgili hücrelerdeki iyon kanalı reseptörü olan N-metil-D-aspartatın fonksiyonunu inhibe ederek bu hücrelerde membran potansiyel değişikliklerine neden olur. Böylece bilirubin nöroeksitator sinyalleri etkileyerek sinir iletimini (özellikle işitme sinirinde) bozabilmektedir (27-30).

**Mitokondriyal disfonksiyon;** Uzun yıllardır mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun irreversibl bilirubin ensefalopati patogenezinin önemli bir parçası olduğuna inanılmaktadır.

Moleküler mekanizmalar halen anlaşılmamış olsa bile bazı araştırmacılar bilirubin asidin fosfolipid membranlarda çöktüğünü ve bunun mitokondriyal disfonksiyonla sonuçlandığını ileri sürmüşlerdir. Ancak bazı araştırmacılar da bilirubinün çeşitli hücre membranları ile geri dönüşümlü bileşikler oluşturduğunu ve böylece neden kan değişimi veya bilirubin düzeyinin hızla düşürülmesi ile bilirubin toksisitesine ait bazı klinik bulguların geri döndüğünün açıklanabileceğini belirtmişlerdir. İnsan ve rat hücre kültürlerinde bilirubinün mitokondriyal enzimleri inhıbe ettiği, DNA sentezini engelleyebildiği, DNA iplikciklerinde kırılmayı indüklediği, protein sentezi ve fosforilasyonu inhıbe ettiği gösterilmiştir (4,17,27). Ancak moleküler mekanizmaların tam olarak açıklanabilmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

**Sellüler ve intrasellüler membran bozukluğu;** Bilirubinün hem nörotransmisyonu hem de mitokondriyal fonksiyonları bozan toksik etkiyi bilirubin asit şeklinde hücre membranlarındaki hidrojen, sodyum, potasyum gibi iyonların transportunu değiştirerek gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür. Bunu destekleyecek bir örnek, geçmişte bir kern ikterus epidemisine yol açan benzil alkolün membran akışkanlığı ile ilgili bir etkiye sahip olduğunun bilinmesidir. Hüresel ve mitokondriyal membranlar boyunca hidrojen iyon gradiyentinin varlığı mitokondriyal fonksiyonların kontrolünde ve sinapslardaki nörotransmitter salınımında önemli olabilir. Bilirubinün bilirubin asit formunda hücrelere veya mitokondrilere bağlanması bölgesel hidrojen konsantrasyonu ile ilişkili olduğu için membranların hidrojen iyonu gradiyentini sağlama yeteneğindeki herhangi bir değişiklik bilirubin toksisitesinde çok önemli olabilir. (31). Bilirubinün ayrıca renal hücrelerdeki iyon değişimini ve su transportunu da bozabileceği gösterilmiş ve aynı mekanizmanın kern ikterus ile ilişkili bilirubin ensefalopatisinde ortaya çıkan nöronal şişmeyi açıklayabileceği belirtilmiştir (17).

**Enzim aktivitelerinin engellenmesi;** İntrasellüler bilirubin toksisitesini açıklamak için dördüncü hipotez, bilirubin asidin spesifik enzimlerdeki reseptör bölgelerine bağlanabilme yeteneğinin varlığıdır, sonuçta bu enzimler çalışamaz duruma gelir ya da aktiviteleri önemli ölçüde azalır (4,15,28).

Bilirubinün bölgesel serebral metabolik etkilerini araştıran bir çalışmada immatür ratlarda artmış laktat düzeyleri ve azalmış hüresel glukoz düzeyleri ile bozulmuş serebral glukoz metabolizmasının hiperbilirubinemi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (17).

Tüm bu hipotezlere ve çalışmalara karşın kern ikterus patogenezi ve özellikle düşük bilirubin konsantrasyonunda oluşan santral sinir sistemi toksisitesinin gerçek mekanizması halen tam olarak anlaşılammıştır. Bilirubin ensefalopatisi kan beyin bariyeri aracılığı ile beyne giren

serbest bilirubinin tehlikeli bir düzeyini ve duyarlı sinir hücrelerinin varlığını gerektiren multifaktöriyel bir süreçtir.

### 2.1.3.3. Hücre Kültüründe Bilirubin Toksisitesi

Bilirubinin hücrel hasar oluşturmada multifaktöriyel role sahiptir. Bilirubine maruz kalma enerji metabolizmasındaki değişiklikler ile; karbohidrat, amino asit ve lipid metabolizması, membran fonksiyonundaki değişiklikler ile; membran potansiyelinde azalma, enzimatik fonksiyonlarda değişiklikler, ve protein ve DNA sentezinin inhibisyonu ile ilişkilidir (4,5). Bu mekanizmaları çalışmak için hiperozmolarite ile KBB'nin açılması (32) ve konjenital olarak sarılıklı sıçanlar (33) gibi in vivo modeller, veya sinaptozom preperasyonları (34), nöral kaynaklı hücre serileri (35) ve glial hücre kültürleri (36) gibi in vitro modeller kullanılmıştır.

Bilirubin sitotoksisitesi, astrositler (6) ve nöronlarında (7) içeren değişik hücre tiplerinde gösterilmiştir (8). Bilirubin, nöronların metabolizması, depolarizasyonu ve transmitter fonksiyonları ile etkileşerek viyabiliteyi etkileyebilmektedir (30,35,37). Ayrıca neden olduğu toksisite ile, hücrelerde şişlik, vakuol formasyonu, plasma membran bütünlüğünün bozulması, ve pigment birikimini izleyerek intraselüler bileşiklerin salınımına neden olmaktadır (38).

Hücre ölümüne neden olan yolların belirgin derecede heterojenitesine rağmen, bilirubin toksisitesinde ölüm programının sıklıkla mitokondrial bozukluklarla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Bu durum; membran lipidlerinin nonspesifik hasarı veya siklosporin A-sensitif multiprotein por kompleksinin açılmasını içeren mitokondrial membran permeabilitesinin artması sonucu olabilmektedir (39).

Toksik situmulusun neden olacağı hücre ölümüne, yaş gibi adaptif cevapların rezistans oluşturabileceği ileri sürülmektedir. UCB'nin neden olacağı toksisiteyi daha iyi anlayabilmek için nöron ve astrosit hücre kültürleri, yaşda göz önünde bulundurarak hazırlandığında bilirubinin primer kültürden 4-5 gün sonra immatür nöronal hücrelere çok daha toksik olduğu ve bu relatif rezistan farklılığının bilirubin toksisitesine mitokondrial düzeydeki protektif mekanizmaların neden olduğu ileri sürülmektedir (40).

Bilirubin rat astrosit ve nöronlarının primer kültürlerinde apoptozisi indüklemektedir. Astrositler ile karşılaştırıldığında, bilirubin toksisitesine nöronların yatkınlığı daha fazladır. Bu artmış yatkınlık, glial hücreler ile karşılaştırıldığında, bilirubini aktif olarak uzaklaştırma veya oksidize etme yeteneğinin çok daha düşük olması ile ilişkili olabilir. Astrosit ve nöronların bilirubin ile 4 saatlik inkübasyon periyodu nekroz ve apoptozis açısından benzer

özellikte iken, astrositler yüksek bilirubin konsantrasyonlarına uzun süre maruz kaldıklarında, görülen esas hücre ölüm formunun nekroz olduğu görülmüştür. (40,41).

Nöronlarda bilirubin toksisitesi, plazma membran bütünlüğünün bozulması, intraselüler bütünlüğü oluşturan elemanların salınımı ve bundan dolayı hücre ölümü nekrozla ilişkili nöronal fonksiyonların kaybı olarak tanımlanmıştır. Buna karşılık bilirubinin, hücre fonksiyonları için önemli değişik durumları düzenlediği gösterilmiştir; DNA ve protein sentezinin inhibisyonu (42), nörotransmitter sentez, salınım ve geri alınımının bozulması, protein fosforilasyonunun inhibisyonu (43,44), olup bunların tümü hücre ölümü ile sonuçlanabilmektedir.

Beyin kapillerlerinin bariyer özellikleri astrositler tarafından oluşturulmaktadır. Bu hücreler hormonlar ve nutrientlerin beyne transportunda önemli rol oynarlar. Bu nedenle astrositler, KBB yetersizliğinde bilirubin ile ilk temas eden hücreler olabilir (45). Bilirubin toksisitesinde astrositlerin rolü, experimental kernikterusta elektron mikroskopik ve otoradyografik çalışmalar ile daha ileriye götürülmüş, ve bu hücrelerin bilirubinin kandan nöronlara esas taşıyıcısı olduğunu ve bilirubinden hasar görmüş nöronlardan salınan atıkların temizlenmesini sağladıklarını ortaya koymuştur (9). Bilirubin ensefalopatisinde astrositlerin rolü büyük oranda ihmal edilmiştir. Astrositler, insanlarda beyin korteksindeki total hücresel volumün yaklaşık olarak üçte birini kapsar. Astrositlerin biyokimyasal özellikleri oldukça iyi tanımlanmıştır: yüksek metabolik aktiviteye sahiptirler, ekstraselüler aralıktan nöroaktif bileşikler temizlerler, ve beyinde tek veya en önemli glutamin sentez yeridir. Bu özellikleri nedeniyle, bilirubinin neden olacağı biyokimyasal hasarın gösterilmesinde, astrosit kültürü diğer modellere katkı sağlar (45,46). Astrositlerin primer kültürlerinde, morfolojik olarak, bilirubinin neden olduğu hasar, diğer mekanizmalar ile oluşan hücresel hasara benzer olup, hücresel ayrılma ve sitoplazmanın granulasyonu ve/veya koyulaşmasıyla karakterizedir (45). Astrositler bilirubin hasarına karşı, aktif dışı akım pompalarının daha fazla ekspresyonu (47), veya bilirubin detoksifikasyon kapasitesinin daha büyük olması (41) sayesinde nöronlara göre çok daha dayanıklıdır. Ayrıca, bilirubinin toksik etkilerine karşı LDH temel alındığında, nöronlardan LDH salınımının astrositlerden üç kat fazla olması, nöronların bilirubin nekrotik ölüme karşı duyarlılığının daha fazla olduğunu göstermektedir (48). İmmatür astrositlerde LDH salınımının, diferansiye astrositler ile karşılaştırıldığında daha yüksek olması, bilirubine karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir (45). Bu artmış duyarlılık, bilirubin ensefalopatisine yenidoğanların daha yatkın olması ile korele olabilir.

Tüm bu bulgular ciddi hiperbilirubinemi sırasında gelişen ensefalopatide astrositlerin önemli role sahip olduğunu ve gelecekteki tedavi modalitelerinde astrositlerin potansiyel hedef olacağını düşündürmektedir.

#### 2.1.3.4. Bilirubin Toksisitesini Etkileyen Faktörler ve Tedbirler

Hiperbilirubinemi ile ilişkili nörotoksisiteye duyarlılığı arttıran pek çok faktör vardır. Bu nedenle basit olsa bile yalnızca total veya indirekt bilirubin konsantrasyonuna dayandırılan tedavi kararları risk faktörlerinin varlığında yeterli olmayacaktır. Yüksek bilirubin düzeyi varlığında beyin hasarı riskini artıran faktörlerin bilinmesi kimlerin nasıl tedavi edileceğinin belirlenmesinde çok önemlidir (Tablo 2).

Beyindeki bilirubin konsantrasyonu ve bilirubine maruz kalınan süre bilirubinin nörotoksik etkilerinin en önemli belirleyicileridir. Ancak hemolizi olmayan bebeklerde bilirubin düzeyi ile bilirubin ensefalopatisi arasındaki korelasyon zayıftır. Buradaki en önemli belirleyici bilirubin üretim hızıdır.

Serum bilirubin konsantrasyonu albüminin bilirubin bağlama bölgelerinin doyurulmasından daha düşük düzeylerde ise ölçülen değer albümine bağlı olan ya da olmayan dolaşımdaki indirekt bilirubinin tümünü yansıtır. Ancak bu total serum bilirubin konsantrasyonu doku yükünü ya da total vücut yükünü yansıtmaz. Bu önemli bir farktır, çünkü yüksek bilirubin üretim hızı bilirubinin dokulara daha hızlı taşınmasıyla sonuçlanacaktır. Böylece yüksek bilirubin üretim hızı olan bebekler düşük üretim hızlı bebeklere göre büyük ölçüde daha fazla doku bilirubin yüküne sahip olacaktır. Bilirubin düzeyinin artış hızı kadar belirli düzeylere ulaşıldığındaki postnatal yaş da önemlidir. Örneğin hayatın 48. saatinde 20 mg/dl düzeyindeki serum bilirubin konsantrasyonu yedinci gündeki aynı düzeyden farklı bir risk taşır. Serum bilirubin konsantrasyonu albümin bağlama bölgelerini doyuracak kadar arttığında ve total vücut yükü özellikle fazlaysa doku yükü de yüksek olacaktır ve serum bilirubinde oluşacak ek artış, bu zamana dek hala korunmuş olabilen artmış beyin geçiş potansiyelini gösterecektir. Ancak doku yükü düşükse bilirubin vücutta daha fazla depolanabilir ve böylece beyin için acil riskleri ortadan kaldırır. Artmış bilirubin üretimi olan bebeklerdeki yüksek doku yükü bu hastaların neden aynı bilirubin düzeyinde ama düşük bilirubin üretimi olanlara göre beyin hasarına yatkın olduğunu açıklayabilir. Hemoliz gibi artmış bilirubin üretimi olan bebeklerde total vücut yükü ya da doku yükünün yüksek oluşu bu bebeklerde kan değişimi ya da fototerapi sonrası serum bilirubin düzeylerinde neden daha belirgin bir rebound olduğunu da açıklayabilir. Bu nedenle artmış bilirubin üretimi hastaların tanımlanması nörotoksisite riskinin belirlenmesinde ve

uygulanacak tedavilerin planlanmasında oldukça önemlidir. Bu gibi hastaları belirlemek için ekspiratuvar gaz analizi ile karbon monoksit ölçümleri ya da noninvaziv perkutan bilirubin ölçümlerinin yararlı olduğu gösterilmiştir (49).

Serum bilirubin konsantrasyonları bilirubin üretimini, doku bilirubin konsantrasyonunu ve albumine bağlı bilirubin konsantrasyonunu güvenilir olarak yansıtmadığı gibi fototerapi ile değişen bilirubinin konfigürasyonlarını ve ekskrete edilebilen fotoizomerleri de belirleyemez. Bu nedenle fototerapi ile tedavi edilenlerle edilmeyenlerin serum bilirubin değerleri eşit olarak düşünülmemelidir (17).

Rh uygunsuzluğu olan bebeklerde 20 mg/dl'den daha yüksek serum bilirubin konsantrasyonları genellikle kötü prognozu gösterirken (18,20), 25 hatta daha yüksek konsantrasyonlu bazı bebekler normaldir (20). Kern ikterus Rh uygunsuzluğu olan bebeklerde; serum bilirubin konsantrasyonu 19-24 mg/dl olan bebeklerin %8'inde, 25-29 mg/dl olan bebeklerin %33'ünde, 30-40 mg/dl olan bebeklerin %73'ünde saptanmıştır (50)

Albumin bir molar oranına kadar ya da gramı başına maksimum 8.2 mg bilirubin bağlayabilir. Böylece serum albümin konsantrasyonu 3 g/dl olan bir bebek yaklaşık 25 mg/dl albümine bağlı serum bilirubin konsantrasyonuna sahip olacaktır. Eğer serum albümin konsantrasyonu düşükse bilirubin bağlanması tehlikeye girer ve kern ikterus riski artar. 1950'lerde preterm bebeklerin sulfisoksazol ile tedavisi bilirubini albüminden ayırdığı ve böylece beyne girişini kolaylaştırdığı için kern ikterus riskini arttırmıştır. 1970'lerde normal serum fizyolojikler içine koruyucu olarak konulan benzil alkol de benzer mekanizmalarla kern ikterus riskini arttırmış olabilir (51). Beyinde bilirubinin nörotoksik etkilerine duyarlılık hücre tipine, beyin matüritesine ve beyin metabolizmasına göre değişir.

Enfeksiyon, asidoz, hiperoksi, sepsis, prematürite ve hiperozmolarite gibi kan-beyin bariyerini değiştiren durumlar bilirubinin beyne girişini etkileyebilir. Beyinde düşük pH varlığı bilirubinin presipitasyonunu ve toksik etkilerini artırır (16,23,52). Bu nedenle alkali durumlarda bilirubin daha çözünür olduğundan beyin pH' sının arttırılmasının ensefalopatinin önlenmesine yardım edebileceği belirtilmektedir. Hiperbilirubinemili maymunlarda respiratuvar asidozun düzeltilmesi işitsel uyarılmış potansiyellerdeki anormalliklerin tamamen geri dönmesi ile sonuçlanmıştır (53). Son yıllarda ciddi hiperbilirubinemili yenidoğan bebeklerde bikarbonat infüzyonu ile yada pH' yı arttıracak ventilatör tekniklerinin kullanılmasıyla sağlanacak orta derecede alkalinizasyon (pH:7.45-7.55) bilirubin ensefalopatinin önlenmesinde bir yöntem olarak önerilmeye başlanmıştır (17).

Ayrıca farklılaşması süren nöronlar özellikle bilirubin toksisitesine daha duyarlıdır, bu da prematürite bebeklerin bilirubin ensefalopatinine yatkınlığının bir diğer nedenidir (54).

**Tablo 2. Bilirubin nörotoksitesine duyarlılığı arttıran faktörler**

---

<input type="checkbox"/> Asfiksi	<input type="checkbox"/> Düşük gestasyonel yaş	<input type="checkbox"/> Hipertermi
<input type="checkbox"/> Septisemi	<input type="checkbox"/> Düşük doğum ağırlığı	<input type="checkbox"/> Hipoalbüminemi
<input type="checkbox"/> Asidozis	<input type="checkbox"/> Kalorik deprivasyon	<input type="checkbox"/> Aşırı hemoliz

---





### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. BİLİRUBİN SOLÜSYONUNUN HAZIRLANMASI

Astrosit kültürlerine eklenen indirek hiperbilirubinemili hasta serumlarında indirek bilirubin konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

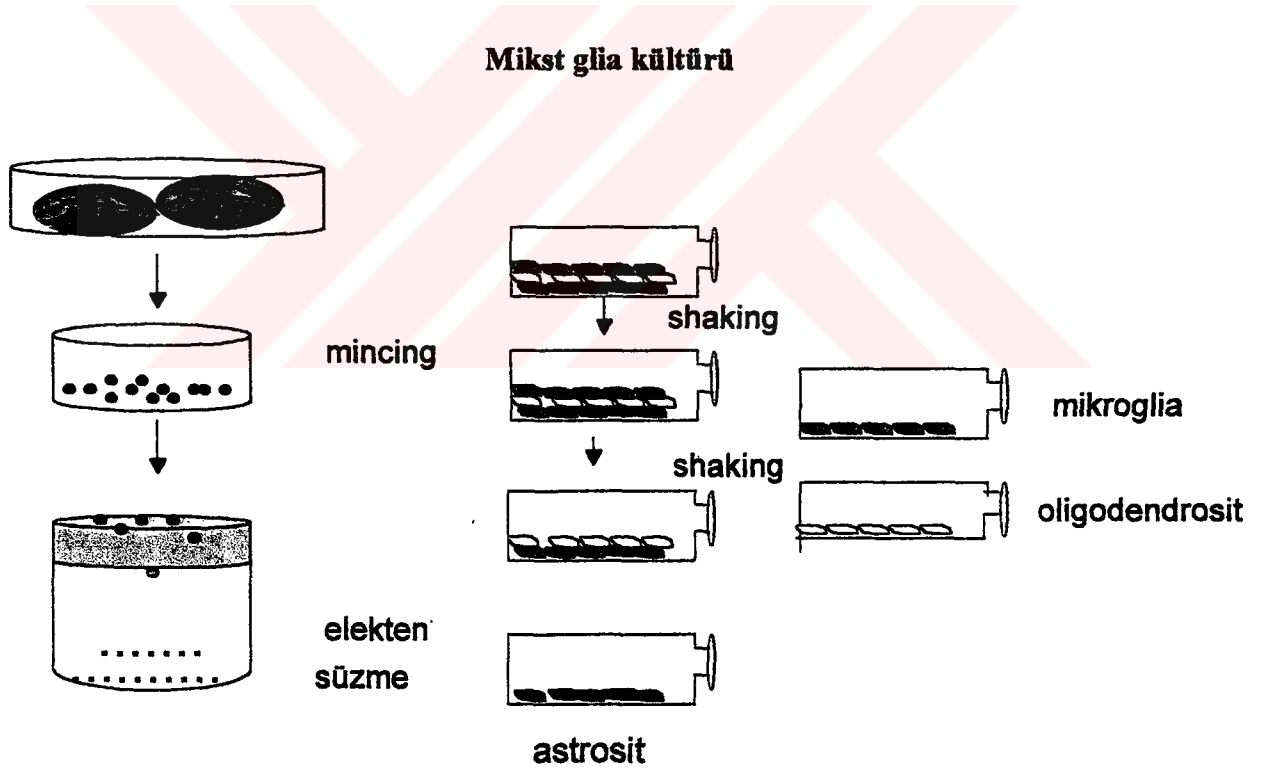
Hasta serum örneklerinin bir bölümü astrosit kültürlerine eklenmeden önce 56°C sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda 30 dakika süreyle tutularak inaktive edildi. Bu işlemde amaç bilirubine bağlı sitotoksositeye ek olarak komplemana bağlı oluşabilecek sitotoksositeyi önlemek için serum kompleman proteinlerinin inaktive edilmesidir. Kompleman proteinlerine bağlı sitotoksosite oluşup olmadığını araştırmak amacıyla da serum örneklerinin geriye kalan bölümleri inaktive edilmeden astrosit kültürlerine eklenmiştir. İnaktive edilen ve edilmeyen hasta serum örnekleri astrosit kültürlerine eklenirken istenilen bilirubin final konsantrasyon değerlerini elde etmek için kültür ortamıyla sulandırıldı.

Kültür ortamına indirek hiperbilirubinemili hastaların serumlarının yanısıra aşağıdaki şekilde hazırlanan bilirubin solüsyonları da eklendi; 20mM bilirubin stok solüsyonu (Sigma Chemical Co.) bilirubin 0.1 N NaOH ile çözülerek hazırlandı ve astrosit kültürlerine eklenirken Dulbecco's Minimal Essential Medium/F12 (DMEM/F12) kültür ortamı kullanılarak sulandırıldı. Bilirubin stok solüsyonu +4°C'de ve karanlık bir ortamda saklanabilmektedir. Deneyler sırasında stok solüsyondan istenilen bilirubin final konsantrasyon değerlerini elde etmek için kültür ortamıyla ileri sulandırma yapıldı (45).

#### 3.2. ASTROSİT KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI

Fare serebral kortikal astrositlerinin primer kültürlerinin preperasyonu, yenidoğan BALB/c farelerden literatürde tanımlandığı şekilde hazırlandı (Şekil 1) (13). Deneyler için tek bir anneden doğan yavrular kullanıldı. Beyin dokuları hafif eter anestezisi altında ve steril koşullarda çıkarıldı. Beyin dokusu mekanik olarak dissosiyasyonla edilerek steril naylon elekten geçirildi ve hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonu polilizin kaplı kültür kaplarına kültür ortamı (DMEM/F12) içinde ekilerek mikst glia kültürü hazırlandı. Kültürler 37°C sıcaklığa ayarlanmış ve % 5 karbondioksit içeren karbondioksit enkübatöründe tutuldu.

Kültürler üç günde bir taze kültür ortamıyla beslenerek gelişimleri faz kontrast mikroskop altında incelendi. Kültürler sıkışık duruma geldiğinde sallama (shaking) yöntemiyle astroglial hücreler oligodendroglial ve mikroglial hücrelerden ayrıldı ve kültürler saf astrosit kültürleri olarak sürdürüldü. Bu amaçla shaker aygıtına konulan kültürlere 37°C sıcaklıkta, 100 rpm devirde 24 saat süreyle shaking işlemi uygulandı. Bu sürenin sonunda kültür kabının tabanından ayrılarak yüzer duruma geçen oligodendroglial ve mikroglial hücreler toplanarak geriye astrositler hücreler bırakıldı. Astrosit kültürleri kültürler sıkışığa yakın duruma geldiğinde 1:4 oranında pasajlanarak sürdürüldü. Pasaj işlemi sırasında hücreler tripsin/EDTA solüsyonuyla kültür kabından ayrıldı. Tripsin/EDTA'nın etkisini sonlandırmak amacıyla serumlu ortam eklendikten sonra toplanan hücreler 200 g devirde, 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant atıldı ve hücre çökeltisi kültür ortamıyla resüspende edilerek yeni kültür kaplarına ekim yapıldı. İn vitro deneylerde değişik pasajlara ait astrosit kültürleri kullanıldı.



**Şekil 1.** Astrosit kültürünün hazırlanması

### 3.3. İMMÜN FLORESAN BOYAMA

Astrosit kültürlerinin saflık derecesinin belirlenmesi amacıyla aynı pasajdan poli-D-lizin ile kaplanmış ve 35 mm'lik petri kültür kapları içinde bulunan lameller üzerine de ekim yapıldı. Ekimin ertesi günü bu kültürlerde anti-Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) immünfloresan boyaması yapılarak astrosit kültürlerinin saflığı araştırıldı. GFAP astrositlerin sitoplazmasında bulunan ve astrositlere spesifik olan sitoplazmik bir antijendir.

#### İmmünfloresan boyama için şu malzemeler kullanıldı :

- Fiksatif : Fiksatif olarak - 20°C sıcaklıkta soğutulan metanol kullanıldı.
- Fosfatlı tampon solüsyonu (PBS)
- % 1 fetal dana serumu içeren PBS
- Anti-GFAP monoklonal antikor
- Fluorescein isothiocyanate (FITC) ya da Texas Red (TR) florokromu ile konjuge anti-fare Ig sekonder antikorları
- Entellan
- Anti-fade
- 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) anti-fade

#### İmmünfloresan boyama işlemi şu basamaklar izlenerek gerçekleştirildi :

- Petri kaplarındaki kültür ortamı çekildikten sonra lameller serumsuz PBS ile birkaç kez yıkandı.
- Fiksasyon için petri kaplarına metanol eklendi. Hücreler metanol ile fiksasyon işleminde - 20°C sıcaklıkta 10 dakika
- Enkübasyon işleminin sonunda metanol uzaklaştırıldıktan sonra lameller serum içeren PBS ile iki kez yıkandı.
- Lamellerin üzerine 10 µl hacimde anti-GFAP primer antikor solüsyonu eklenerek parafilm tabakası kapatıldı. Hücreler primer antikor solüsyonuyla oda sıcaklığında ve nemli ortamda 30 dk enkübe edildi.
- Primer antikorla enkübasyon işleminin ardından antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve lameller serum içeren PBS ile iki kez yıkandı.
- Lamellere FITC ya da TR florokromu ile konjuge sekonder antikor solüsyonu eklendi, parafilm kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dk süreyle enkübe edildi.

- Enkübyasyon süresinin sonunda sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra lameller tekrar serum içeren PBS ile iki kez yıkandı.
- Lameller, üzerine 1-2 damla Entellan konulan lamlara yapıştırıldı.
- Lamellerin üzerine 10 µl hacimde anti-fade konularak bir lamel ile örtüldü. Bazı boyama işlemlerinde anti-fade yerine DAPI nükleus boyasını içeren DAPI-anti-fade konularak hücre çekirdekleri de görünür duruma getirildi.
- Lamalar immünfloresan mikroskop incelemesi yapılanaya kadar karanlık ve soğuk bir ortamda tutuldu.

### 3.4. ANTI-ssDNA ANTİKORUYLA İMMUNFLORESAN BOYAMA YÖNTEMİ İLE APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN SAPTANMASI

Bu yöntemin ilkesi apoptotik hücrelerdeki DNA'nın ısıyla denaturasyona duyarlılığın artışına dayanmaktadır. Bu yöntemde DNA, formamidin varlığında ısıyla denature edilmekte ve ssDNA'ya spesifik monoklonal F7-26 antikoruyla boyanmaktadır. Bu işlem spesifik olarak apoptotik hücrelerin kondanse kromatinini boyamaktadır. Kondanse kromatin apoptotik hücre ölümünün kesin bir göstergesi olduğu için (55) kondanse kromatinin anti-ssDNA antikoruyla histokimyasal olarak gösterilmesi apoptotik hücrelerin spesifik olarak tanınmasını sağlamaktadır. Yöntemin spesifikliği apoptotik hücrelerin kondanse kromatininde DNA'nın ısıyla denaturasyona duyarlılığının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (56,57). Formamidin varlığında 56 ya da 75<sup>0</sup>C sıcaklığa kadar ısıtmayla yalnızca apoptotik çekirdeklerdeki DNA anti-ssDNA'ya spesifik F7-26 antikoruyla saptanabilmektedir (58).

Formamid apoptotik hücrelerde DNA denatasyonunu indüklemekte ve apoptozis bulunmadığında tek ya da çift sarmal DNA kırıkları olan DNA'nın stabilitesini etkilememektedir. Sonuç olarak bu yöntemin kullanılması spesifik olarak yalnızca apoptotik hücrelerin boyanmasını sağlamakta ve apoptozu nekrozdan kesin olarak ayırmaktadır. Yöntemin DNA kırıklarından bağımsız olması önemlidir, çünkü çift sarmal DNA kırıklarını saptayan TUNEL gibi yöntemler apoptoz için spesifik değildir (56,59). Gerçekten de üç ayrı nekrotik hücre ölümü modelinde nekrotik hücrelerin TUNEL ile parlak boyandığı fakat anti-ssDNA F7-26 antikoruyla boyanma olmadığı bildirilmiştir (58). Şu bulgular apoptotik çekirdeklerdeki formamidin varlığında olan selektif denaturasyonunun DNA kırıklarıyla ilgili olmadığını göstermektedir :

- Çift sarmal DNA kırıklarının fazla olduğu nekrotik hücreler TUNEL ile pozitif boyanmakta fakat anti-ssDNA F7-26 antikoru ile boyanmamaktadır.
- DNA fragmantasyonunun çok düşük düzeyde ve yüksek düzeyde bulunduğu apoptotik hücreler anti-ssDNA F7-26 antikoruyla benzer yoğunlukta boyanmaktadır.
- Oksijen radikalleri ile indüklenen tek sarmal DNA kırıklarının bulunduğu çekirdekler formamid ile ısıtma işlemi sonrasında anti-ssDNA antikoruyla boyanmamaktadır. Ancak alkali maddelerle denaturasyon sonrası bu çekirdekler bu antikora boyanmaktadır (58).

Bu veriler apoptotik hücrelerde formamidin varlığında olan DNA denaturasyonunun, DNA kırıklarından bağımsız olarak kondansasyon ile birlikte olan kromatin değişiklikleri ile indüklendiğini göstermektedir. Histonların DNA'yı ısıyla denaturasyona karşı stabilize ettiği bilindiği için, apoptotik çekirdeklerin kondanse kromatinindeki DNA-histon etkileşimi değişiklikleri DNA'nın ısıyla denaturasyona duyarlılığının artmasından sorumlu olabilir. Gerçekten de apoptoz sırasında histonlar dijesyona uğramakta (60,61) ve DNA kırıklarının ortaya çıkmasından önce histonların immunoreaktivitesi ve ekstraktibilitesi artmaktadır (62).

Bu yöntemde kullanılan anti-ssDNA F7-26 monoklonal antikoru dana timus ssDNA'sına karşı oluşturulmuştur ve fare apoptotik hücrelerine reaktivite göstermesi temelinde seçilmiştir. Bu antikor spesifik olarak deoksisistidin ile etkileşmektedir ve ssDNA'ya bağlanması için ssDNA en az 25-30 bazlık uzunlukta olması gerekmektedir (63). F7-26 monoklonal antikoru türe spesifik değildir ve değişik canlı türlerinde apoptotik hücrelerin saptanması için kullanılabilir. Bu antikor fare, rat ve insan hücrelerinde test edilmiştir.

### **3.5. FLORESAN MİKROSKOBİ İNCELEMESİ İÇİN HÜCRE SÜSPANSİYONLARININ BOYANMASI:**

**Yöntem şu basamaklar izlenerek uygulanmaktadır :**

- Altı hokkalk ve daha önceden 10µg/ml konsantrasyonda poli-D-lizin maddesiyle kaplanmış steril kültür kaplarına Astrosit hücreleri  $1 \times 10^6$  /hokka/2ml kültür ortamı yoğunluğunda ekildi.
- Kültür ortamı olarak %1 oranında L-glutamin, 100U/ml penisilin ve 100µ/ml streptomisin içeren DMEM/F12 (Biochrom KG, Almanya) ortamı kullanıldı. Ekim sonrası kültürler %5 karbondioksitli nemli hava içeren enkübatöre konuldu.

- Ekimden 24 saat sonra kültürlerin ortamı çekilerek serumsuz kültür ortamı ya da % 1 oranında G5 astrosit ortamı içeren serumsuz kültür ortamı eklendi. Bilirubin deneylerinde serumsuz kültür ortamı kullanılmasının amacı serumun içindeki albuminin bilirubini bağlamasını önlemektir. Astrosit kültürlerine değişik konsantrasyonlarda (1-1000  $\mu$ M) bilirubin ya da 2.5- 12.5  $\mu$ M bilirubin içeren hasta serumu eklenerek enkübasyona devam edildi.
- 96 saat sonra hücreler tripsin ile kültür plaklarından kaldırılarak santrifüj tüplerine aktarıldı ve fosfatlı tampon solüsyonu (phosphated buffered solüsyon; PBS) ile yıkandı.
- Hücre süspansiyonları oda sıcaklığında 5 dakika süreyle ve 1200 rpm hızda santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılarak hücre pelletleri 1ml soğuk PBS ile resüspende edildi.
- Hücre süspansiyonları vortekste karıştırılırken yavaşça 6ml soğuk ( $-20^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta) metanol eklendi. Bu örnekler metanol içinde 16 saat süreyle ve  $-20^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta tutularak fikse edildi.
- Ertesi gün hücre süspansiyonları santrifüj edilecek ve süpernatant uzaklaştırılarak pellet 0.25ml hacminde ve distile su ile sulandırılan %50'lik formamid (Sigma, Almanya) ile resüspanse edilerek, örnekler oda sıcaklığında 5 dakika tutuldu.
- Tüpler daha sonra  $75^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa getirilmiş su banyosunda 10 dakika tutuldu.
- Bu ısıtma işleminden sonra tüpler hemen oda sıcaklığındaki su banyosuna konuldu.
- Formamid içeren tüplere 2ml %3'lük yağ içermeyen ve distile su ile çözülmüş ve PBS ile sulandırılmış süt tozu (Nestle, İsviçre) eklendi. Vortekste karıştırılan örnekler 15 dakika süreyle oda sıcaklığında tutuldu. Bu işlem non-spesifik boyanmayı önlemek için yapılmaktadır.
- Örnekler tekrar santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak ve pellet 100 $\mu$ l/örnek hacimde F7-26 (Apostain) antikoruyla (Alexis Biochemicals, Almanya) resüspende edildi (final antikor konsantrasyonu 10 $\mu$ g/ml olmaktadır). 15 dakika süreyle oda sıcaklığında enkübasyon yapıldı. Antikor solüsyonu hazırlamak için 1 ml hacminde ve 100 $\mu$ g F7-26 antikoruna PBS ile sulandırılan %1'lik süt tozu süspansiyonundan 9 ml eklenerek, dilüe edilen antikor solüsyonu küçük hacimlerde  $-20^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta saklandı.

- Enkübyasyon işlemleri sonunda örneklere 1 ml PBS eklenecektir. Santrifüj aşamasından sonra Süpernatant uzaklaştırılarak ve pellet 100 µl/örnek hacminde FITC konjuge keçi-anti fare sekonder antikoruyla (Caltag, ABD) resüspende edildi. Oda sıcaklığında 15 dakika enkübyasyon yapıldı. Sekonder antikor da PBS ile sulandırılan %1'lik süt tozu süspansiyonu ile dilüe edilmektedir.
- Enkübyasyon işlemleri sonunda örneklere 1 ml PBS eklendi. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant uzaklaştırılacak ve pellet PBS ile resüspanse edildi. Floresan mikroskopi incelemesi için hücre süspansiyonları Patoloji Anabilim Dalı'nda bulunan cytospin aygıtıyla (Cytospin 3, Shandon) lam üzerine yayıldı. Bu işlem için 900 rpm hız ve 5 dakika süre kullanıldı. Ardından lamın üzerine nükleus boyası DAPI ve floresan solmasını yavaşlatıcı anti-fade maddesi içeren boya solüsyonu (DAPI-antifade) (Oncor, Fransa) eklenerek lamel kapatıldı. Örnekler floresan mikroskopi incelemesi yapılana kadar karanlıkta ve 4°C sıcaklıkta tutuldu. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yapılacak floresan mikroskopi incelemesinde FITC flokromu için yeşil FITC filtresi, DAPI incelemesinde ise UV filtresi kullanıldı. Apostain pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi deney koşullarına kör bir araştırmacı (Dr. Şermin Genç) tarafından belirlendi. Bu amaçla her lamelin değişik bölgelerinden rastgele olarak toplam en az 200 hücre sayıldı.

### 3.6. HÜCRE ÖLÜMÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİNDE LDH YÖNTEMİ

**LDH Yöntemi :** Hücre ölümünün değerlendirilmesinde duyarlılığı fazla olan, kantitatif güvenilir ve otomatize yöntemlere duyulan ihtiyaç nedeniyle çeşitli standart testler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları radyoaktif izotopların (<sup>51</sup>Cr, <sup>3</sup>H-timidin gibi) salınımı ilkesine dayanmaktadır ve zaman alıcı olması, radyoaktif maddelerin kullanılması, hücrelerin test öncesi işaretlenmesinin gerekmesi gibi dezavantajları vardır. Tripkan blue, eozin Y nigrozin, propidium iodid ya da etidium bromid gibi vital boyaların ölü hücreler tarafından alınması ya da alınmaması ilkesine dayanan testler ise zaman alıcıdır ve değerlendiriciden değerlendiriciye fazla değişkenlik gösteren sonuçlar vermektedir. Ayrıca morfolojik bilgiye bağımlı olan bu testlerde ölerek kültür kabının tabanından ayrılan adheran hücreler saptanamamakta ve bu nedenle bulunan ölü hücre oranı gerçek değerden daha düşük olabilmektedir. LDH yöntemi ise hasara uğrayan hücrenin sitozolünden süpernatantla salınan LDH aktivitesinin ölçümüne dayanan ve hücre ölümünün ve lizisinin kantitatif değerlendirilmesini sağlayan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntemin avantajları şunlardır :

- Yöntem radyoaktif izotopların kullanımını gerektirmemektedir.
- Elde edilen sonuçlar lizise uğrayan hücre sayısı ile güçlü bir korelasyon göstermektedir.
- ELISA plağının kullanılması çok sayıda örneğin analizinin aynı anda yapılabilmesini sağlamaktadır.
- Yöntemin uygulanma süresi yarım saati aşmamaktadır.
- Toplanan örnekler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de aylarca stabil kalabilmektedir.
- LDH testi hücre membranı hasarının güvenilir bir göstergesidir. Çünkü LDH enzimi hücre içinde yüksek aktivite göstermekte, ekstraselüler ortamda stabil kalabilmekte ve sağlam hücreler tarafından ya alınmamakta ya da çok az oranda alınmaktadır.

### LDH Kitinin İçeriği

LDH aktivitesinin ölçümü için kullanılan ticari kitin (Roche) içinde şu maddeler bulunmaktadır:

1. Katalist/Diaforoz/NAD<sup>+</sup> karışımı
2. İadotetrazolium klorid ve sodyum laktat içeren boya solüsyonu

### Yöntemin İlkesi

Kültürde hücrelerin ölümü ya da plazma membranının hasara uğraması bu hücrelerden LDH açığa çıkmasına bağlı olarak kültür süpernatında LDH enzim aktivitesinin artışına yol açmaktadır. Bu yöntemde LDH aktivitesi enzimatik olarak değerlendirilmektedir. İlk basamakta LDH laktatı piruvata çevirmektedir. Bu dönüşümle NAD<sup>+</sup>, NADH/H<sup>+</sup>'ya indirgenmektedir. İkinci basamakta katalist madde (diaforoz) NADH/H<sup>+</sup> dan H<sup>+</sup> tetrazolium tuzu olan iadotetrazolium kloride transfer etmekte ve bu madde de formazana indirgenmektedir. Süpernatanttaki LDH aktivitesi artışı belli bir zaman diliminde oluşan formazan miktarıyla doğrudan koreledir. Bu nedenle yöntemde oluşan rengin koyuluğu lizise uğrayan hücre sayısı ile doğrudan orantılıdır. Formazan boyası suda çözünür bir maddedir ve 500nm dalga boyunda maksimuma ulaşan geniş bir absorpsiyon göstermektedir. Ysa tetrazolium tuzu olan iadotetrazolium klorid bu dalga boylarında önemli bir absorpsiyon göstermemektedir.



### Testin Uygulanması

Farklı hücre tipleri farklı miktarlarda LDH içerebildikleri için spesifik bir hücre tipi için kullanılması gereken optimum hücre konsantrasyonunun ön deneylerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu hücre konsantrasyonu genellikle düşük kontrol örneklerinin (hücre ölümüne ve lizise yol açtığı bilinen test maddesiyle karşılaştırılmayan hücrelerden spontan LDH salınımı) absorbansıya yüksek kontrol örneklerinin (belli bir süre enkübasyon sonunda hücrelerin tamamında ölüme yol açtığı bilinen Triton-X ya da ionomisin gibi bir madde ile karşılaştırılan hücrelerden LDH salınımı ya da bir başka deyişle maksimal LDH salınımı) absorbansı arasındaki farkın maksimuma ulaştığı hücre konsantrasyonudur. Astroglial hücreler için bu optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra esas toksisite deneylerine geçildi. Bu deneylerde astrositler 24 hokkalı polilizin kaplı kültür plaklarına 1ml kültür ortamı/ hokka hacimde ve optimum konsantrasyonda ekildi, ardından değişik konsantrasyonlarda bilirubin eklendi. 96 saatlik enkübasyon süresinin her 24 saatinde her hokkadan 50 µl örnek LDH testi için alındı ve 96 hokkalı U tabanlı plaklara aktarıldı. Total LDH salınımı için kullanılacak kontrol hokkalarına başlangıçta % 1 Triton X100 solüsyonu eklenecektir. Bilirubin eklenmeyen hokkalar negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 96 hokkalık plaklara aktarıldıktan sonra LDH kitinin boya ve enzim solüsyonlarından reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan her hokkaya 50 µl eklendi. Absorbans ölçümü Merkez Laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Ölçüm için 492 nm ve referans olarak 620 nm kullanıldı. Absorbans değerleri elde edildikten sonra sitotoksosite yüzdesi aşağıdaki formüle göre her hokka için hesaplandı.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{[\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}]}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri}} \times 100$$

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Astrosit kültüründe, bilirubinin doza ve zamana bağlı yaratacağı nekroz ve apoptozisin değerlendirilmesinde Multivaryant Regresyon Analizi uygulandı.

### Testin Uygulanması

Farklı hücre tipleri farklı miktarlarda LDH içerebildikleri için spesifik bir hücre tipi için kullanılması gereken optimum hücre konsantrasyonunun ön deneylerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu hücre konsantrasyonu genellikle düşük kontrol örneklerinin (hücre ölümüne ve lizise yol açtığı bilinen test maddesiyle karşılaştırılmayan hücrelerden spontan LDH salınımı) absorbansıya yüksek kontrol örneklerinin (belli bir süre enkübasyon sonunda hücrelerin tamamında ölüme yol açtığı bilinen Triton-X ya da ionomisin gibi bir madde ile karşılaştırılan hücrelerden LDH salınımı ya da bir başka deyişle maksimal LDH salınımı) absorbansı arasındaki farkın maksimumuna ulaştığı hücre konsantrasyonudur. Astroglial hücreler için bu optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra esas toksisite deneylerine geçildi. Bu deneylerde astrositler 24 hokkalı polilizin kaplı kültür plaklarına 1ml kültür ortamı/ hokka hacimde ve optimum konsantrasyonda ekildi, ardından değişik konsantrasyonlarda bilirubin eklendi. 96 saatlik enkübasyon süresinin her 24 saatinde her hokkadan 50 µl örnek LDH testi için alındı ve 96 hokkalı U tabanlı plaklara aktarıldı. Total LDH salınımı için kullanılacak kontrol hokkalarına başlangıçta % 1 Triton X100 solüsyonu eklenecektir. Bilirubin eklenmeyen hokkalar negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 96 hokkalık plaklara aktarıldıktan sonra LDH kitinin boya ve enzim solüsyonlarından reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan her hokkaya 50 µl eklendi. Absorbans ölçümü Merkez Laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Ölçüm için 492 nm ve referans olarak 620 nm kullanıldı. Absorbans değerleri elde edildikten sonra sitotoksisite yüzdesi aşağıdaki formüle göre her hokka için hesaplandı.

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \left[ \frac{\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri}} \right] \times 100$$

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Astrosit kültüründe, bilirubinin doza ve zamana bağlı yaratacağı nekroz ve apoptozisin değerlendirilmesinde Multivaryant Regresyon Analizi uygulandı.

### Testin Uygulanması

Farklı hücre tipleri farklı miktarlarda LDH içerebildikleri için spesifik bir hücre tipi için kullanılması gereken optimum hücre konsantrasyonunun ön deneylerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu hücre konsantrasyonu genellikle düşük kontrol örneklerinin (hücre ölümüne ve lizise yol açtığı bilinen test maddesiyle karşılaştırılmayan hücrelerden spontan LDH salınımı) absorbansıya yüksek kontrol örneklerinin (belli bir süre enkübasyon sonunda hücrelerin tamamında ölüme yol açtığı bilinen Triton-X ya da ionomisin gibi bir madde ile karşılaştırılan hücrelerden LDH salınımı ya da bir başka deyişle maksimal LDH salınımı) absorbansı arasındaki farkın maksimuma ulaştığı hücre konsantrasyonudur. Astroglial hücreler için bu optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra esas toksisite deneylerine geçildi. Bu deneylerde astrositler 24 hokkalı polilizin kaplı kültür plaklarına 1ml kültür ortamı/ hokka hacimde ve optimum konsantrasyonda ekildi, ardından değişik konsantrasyonlarda bilirubin eklendi. 96 saatlik enkübasyon süresinin her 24 saatinde her hokkadan 50 µl örnek LDH testi için alındı ve 96 hokkalı U tabanlı plaklara aktarıldı. Total LDH salınımı için kullanılacak kontrol hokkalarına başlangıçta % 1 Triton X100 solüsyonu eklenecektir. Bilirubin eklenmeyen hokkalar negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 96 hokkalık plaklara aktarıldıktan sonra LDH kitinin boya ve enzim solüsyonlarından reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan her hokkaya 50 µl eklendi. Absorbans ölçümü Merkez Laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Ölçüm için 492 nm ve referans olarak 620 nm kullanıldı. Absorbans değerleri elde edildikten sonra sitotoksisite yüzdesi aşağıdaki formüle göre her hokka için hesaplandı.

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{[\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}]}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri}} \times 100$$

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Astrosit kültüründe, bilirubinin doza ve zamana bağlı yaratacağı nekroz ve apoptozisin değerlendirilmesinde Multivaryant Regresyon Analizi uygulandı.

### Testin Uygulanması

Farklı hücre tipleri farklı miktarlarda LDH içerebildikleri için spesifik bir hücre tipi için kullanılması gereken optimum hücre konsantrasyonunun ön deneylerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu hücre konsantrasyonu genellikle düşük kontrol örneklerinin (hücre ölümüne ve lizise yol açtığı bilinen test maddesiyle karşılaştırılmayan hücrelerden spontan LDH salınımı) absorbansıya yüksek kontrol örneklerinin (belli bir süre enkübasyon sonunda hücrelerin tamamında ölüme yol açtığı bilinen Triton-X ya da ionomisin gibi bir madde ile karşılaştırılan hücrelerden LDH salınımı ya da bir başka deyişle maksimal LDH salınımı) absorbansı arasındaki farkın maksimuma ulaştığı hücre konsantrasyonudur. Astroglial hücreler için bu optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra esas toksisite deneylerine geçildi. Bu deneylerde astrositler 24 hokkalı polilizin kaplı kültür plaklarına 1ml kültür ortamı/ hokka hacimde ve optimum konsantrasyonda ekildi, ardından değişik konsantrasyonlarda bilirubin eklendi. 96 saatlik enkübasyon süresinin her 24 saatinde her hokkadan 50 µl örnek LDH testi için alındı ve 96 hokkalı U tabanlı plaklara aktarıldı. Total LDH salınımı için kullanılacak kontrol hokkalarına başlangıçta % 1 Triton X100 solüsyonu eklenecektir. Bilirubin eklenmeyen hokkalar negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 96 hokkalık plaklara aktarıldıktan sonra LDH kitinin boya ve enzim solüsyonlarından reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan her hokkaya 50 µl eklendi. Absorbans ölçümü Merkez Laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Ölçüm için 492 nm ve referans olarak 620 nm kullanıldı. Absorbans değerleri elde edildikten sonra sitotoksisite yüzdesi aşağıdaki formüle göre her hokka için hesaplandı.

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{[\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}]}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri}} \times 100$$

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Astrosit kültüründe, bilirubinin doza ve zamana bağlı yaratacağı nekroz ve apoptozisin değerlendirilmesinde Multivaryant Regresyon Analizi uygulandı.

### Testin Uygulanması

Farklı hücre tipleri farklı miktarlarda LDH içerebildikleri için spesifik bir hücre tipi için kullanılması gereken optimum hücre konsantrasyonunun ön deneylerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu hücre konsantrasyonu genellikle düşük kontrol örneklerinin (hücre ölümüne ve lizise yol açtığı bilinen test maddesiyle karşılaştırılmayan hücrelerden spontan LDH salınımı) absorbansıya yüksek kontrol örneklerinin (belli bir süre enkübasyon sonunda hücrelerin tamamında ölüme yol açtığı bilinen Triton-X ya da ionomisin gibi bir madde ile karşılaştırılan hücrelerden LDH salınımı ya da bir başka deyişle maksimal LDH salınımı) absorbansı arasındaki farkın maksimuma ulaştığı hücre konsantrasyonudur. Astroglial hücreler için bu optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra esas toksisite deneylerine geçildi. Bu deneylerde astrositler 24 hokkalı polilizin kaplı kültür plaklarına 1ml kültür ortamı/ hokka hacimde ve optimum konsantrasyonda ekildi, ardından değişik konsantrasyonlarda bilirubin eklendi. 96 saatlik enkübasyon süresinin her 24 saatinde her hokkadan 50 µl örnek LDH testi için alındı ve 96 hokkalı U tabanlı plaklara aktarıldı. Total LDH salınımı için kullanılacak kontrol hokkalarına başlangıçta % 1 Triton X100 solüsyonu eklenecektir. Bilirubin eklenmeyen hokkalar negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 96 hokkalık plaklara aktarıldıktan sonra LDH kitinin boya ve enzim solüsyonlarından reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan her hokkaya 50 µl eklendi. Absorbans ölçümü Merkez Laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Ölçüm için 492 nm ve referans olarak 620 nm kullanıldı. Absorbans değerleri elde edildikten sonra sitotoksosite yüzdesi aşağıdaki formüle göre her hokka için hesaplandı.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{[\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}]}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri}} \times 100$$

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Astrosit kültüründe, bilirubinin doza ve zamana bağlı yaratacağı nekroz ve apoptozisin değerlendirilmesinde Multivaryant Regresyon Analizi uygulandı.

### Testin Uygulanması

Farklı hücre tipleri farklı miktarlarda LDH içerebildikleri için spesifik bir hücre tipi için kullanılması gereken optimum hücre konsantrasyonunun ön deneylerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu hücre konsantrasyonu genellikle düşük kontrol örneklerinin (hücre ölümüne ve lizise yol açtığı bilinen test maddesiyle karşılaştırılmayan hücrelerden spontan LDH salınımı) absorbansıya yüksek kontrol örneklerinin (belli bir süre enkübasyon sonunda hücrelerin tamamında ölüme yol açtığı bilinen Triton-X ya da ionomisin gibi bir madde ile karşılaştırılan hücrelerden LDH salınımı ya da bir başka deyişle maksimal LDH salınımı) absorbansı arasındaki farkın maksimuma ulaştığı hücre konsantrasyonudur. Astroglial hücreler için bu optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra esas toksisite deneylerine geçildi. Bu deneylerde astrositler 24 hokkalı polilizin kaplı kültür plaklarına 1ml kültür ortamı/ hokka hacimde ve optimum konsantrasyonda ekildi, ardından değişik konsantrasyonlarda bilirubin eklendi. 96 saatlik enkübasyon süresinin her 24 saatinde her hokkadan 50 µl örnek LDH testi için alındı ve 96 hokkalı U tabanlı plaklara aktarıldı. Total LDH salınımı için kullanılacak kontrol hokkalarına başlangıçta % 1 Triton X100 solüsyonu eklenecektir. Bilirubin eklenmeyen hokkalar negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 96 hokkalık plaklara aktarıldıktan sonra LDH kitinin boya ve enzim solüsyonlarından reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan her hokkaya 50 µl eklendi. Absorbans ölçümü Merkez Laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Ölçüm için 492 nm ve referans olarak 620 nm kullanıldı. Absorbans değerleri elde edildikten sonra sitotoksosite yüzdesi aşağıdaki formüle göre her hokka için hesaplandı.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{[\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}]}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri}} \times 100$$

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Astrosit kültüründe, bilirubinin doza ve zamana bağlı yaratacağı nekroz ve apoptozisin değerlendirilmesinde Multivaryant Regresyon Analizi uygulandı.

### Testin Uygulanması

Farklı hücre tipleri farklı miktarlarda LDH içerebildikleri için spesifik bir hücre tipi için kullanılması gereken optimum hücre konsantrasyonunun ön deneylerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu hücre konsantrasyonu genellikle düşük kontrol örneklerinin (hücre ölümüne ve lizise yol açtığı bilinen test maddesiyle karşılaştırılmayan hücrelerden spontan LDH salınımı) absorbansıya yüksek kontrol örneklerinin (belli bir süre enkübasyon sonunda hücrelerin tamamında ölüme yol açtığı bilinen Triton-X ya da ionomisin gibi bir madde ile karşılaştırılan hücrelerden LDH salınımı ya da bir başka deyişle maksimal LDH salınımı) absorbansı arasındaki farkın maksimuma ulaştığı hücre konsantrasyonudur. Astroglial hücreler için bu optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra esas toksisite deneylerine geçildi. Bu deneylerde astrositler 24 hokkalı polilizin kaplı kültür plaklarına 1ml kültür ortamı/ hokka hacimde ve optimum konsantrasyonda ekildi, ardından değişik konsantrasyonlarda bilirubin eklendi. 96 saatlik enkübasyon süresinin her 24 saatinde her hokkadan 50 µl örnek LDH testi için alındı ve 96 hokkalı U tabanlı plaklara aktarıldı. Total LDH salınımı için kullanılacak kontrol hokkalarına başlangıçta % 1 Triton X100 solüsyonu eklenecektir. Bilirubin eklenmeyen hokkalar negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 96 hokkalık plaklara aktarıldıktan sonra LDH kitinin boya ve enzim solüsyonlarından reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan her hokkaya 50 µl eklendi. Absorbans ölçümü Merkez Laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Ölçüm için 492 nm ve referans olarak 620 nm kullanıldı. Absorbans değerleri elde edildikten sonra sitotoksosite yüzdesi aşağıdaki formüle göre her hokka için hesaplandı.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{[\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}]}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri}} \times 100$$

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Astrosit kültüründe, bilirubinin doza ve zamana bağlı yaratacağı nekroz ve apoptozisin değerlendirilmesinde Multivaryant Regresyon Analizi uygulandı.

### Testin Uygulanması

Farklı hücre tipleri farklı miktarlarda LDH içerebildikleri için spesifik bir hücre tipi için kullanılması gereken optimum hücre konsantrasyonunun ön deneylerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu hücre konsantrasyonu genellikle düşük kontrol örneklerinin (hücre ölümüne ve lizise yol açtığı bilinen test maddesiyle karşılaştırılmayan hücrelerden spontan LDH salınımı) absorbansıya yüksek kontrol örneklerinin (belli bir süre enkübasyon sonunda hücrelerin tamamında ölüme yol açtığı bilinen Triton-X ya da ionomisin gibi bir madde ile karşılaştırılan hücrelerden LDH salınımı ya da bir başka deyişle maksimal LDH salınımı) absorbansı arasındaki farkın maksimuma ulaştığı hücre konsantrasyonudur. Astroglial hücreler için bu optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra esas toksisite deneylerine geçildi. Bu deneylerde astrositler 24 hokkalı polilizin kaplı kültür plaklarına 1ml kültür ortamı/ hokka hacimde ve optimum konsantrasyonda ekildi, ardından değişik konsantrasyonlarda bilirubin eklendi. 96 saatlik enkübasyon süresinin her 24 saatinde her hokkadan 50 µl örnek LDH testi için alındı ve 96 hokkalı U tabanlı plaklara aktarıldı. Total LDH salınımı için kullanılacak kontrol hokkalarına başlangıçta % 1 Triton X100 solüsyonu eklenecektir. Bilirubin eklenmeyen hokkalar negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 96 hokkalık plaklara aktarıldıktan sonra LDH kitinin boya ve enzim solüsyonlarından reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan her hokkaya 50 µl eklendi. Absorbans ölçümü Merkez Laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Ölçüm için 492 nm ve referans olarak 620 nm kullanıldı. Absorbans değerleri elde edildikten sonra sitotoksosite yüzdesi aşağıdaki formüle göre her hokka için hesaplandı.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{[\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}]}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri}} \times 100$$

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Astrosit kültüründe, bilirubinin doza ve zamana bağlı yaratacağı nekroz ve apoptozisin değerlendirilmesinde Multivaryant Regresyon Analizi uygulandı.



### Testin Uygulanması

Farklı hücre tipleri farklı miktarlarda LDH içerebildikleri için spesifik bir hücre tipi için kullanılması gereken optimum hücre konsantrasyonunun ön deneylerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu hücre konsantrasyonu genellikle düşük kontrol örneklerinin (hücre ölümüne ve lizise yol açtığı bilinen test maddesiyle karşılaştırılmayan hücrelerden spontan LDH salınımı) absorbansıya yüksek kontrol örneklerinin (belli bir süre enkübasyon sonunda hücrelerin tamamında ölüme yol açtığı bilinen Triton-X ya da ionomisin gibi bir madde ile karşılaştırılan hücrelerden LDH salınımı ya da bir başka deyişle maksimal LDH salınımı) absorbansı arasındaki farkın maksimuma ulaştığı hücre konsantrasyonudur. Astroglial hücreler için bu optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra esas toksisite deneylerine geçildi. Bu deneylerde astrositler 24 hokkalı polilizin kaplı kültür plaklarına 1ml kültür ortamı/ hokka hacimde ve optimum konsantrasyonda ekildi, ardından değişik konsantrasyonlarda bilirubin eklendi. 96 saatlik enkübasyon süresinin her 24 saatinde her hokkadan 50 µl örnek LDH testi için alındı ve 96 hokkalı U tabanlı plaklara aktarıldı. Total LDH salınımı için kullanılacak kontrol hokkalarına başlangıçta % 1 Triton X100 solüsyonu eklenecektir. Bilirubin eklenmeyen hokkalar negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 96 hokkalık plaklara aktarıldıktan sonra LDH kitinin boya ve enzim solüsyonlarından reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan her hokkaya 50 µl eklendi. Absorbans ölçümü Merkez Laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Ölçüm için 492 nm ve referans olarak 620 nm kullanıldı. Absorbans değerleri elde edildikten sonra sitotoksosite yüzdesi aşağıdaki formüle göre her hokka için hesaplandı.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{[\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}]}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri}} \times 100$$

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Astrosit kültüründe, bilirubinin doza ve zamana bağlı yaratacağı nekroz ve apoptozisin değerlendirilmesinde Multivaryant Regresyon Analizi uygulandı.

## 5. TARTIŞMA

Hiperbilirubineminin neden olduğu ensefalopati, iyi tanımlanmış bir antite olmasına rağmen, bilirubin nörotoksisitesinin altta yatan ana mekanizmasını anlamak, oldukça güç olmaktadır (4,5). Bilirubin neden olduğu sitotoksisite astrositler (6) ve nöronları da (7) içeren değişik hücre tiplerinde gösterilmiştir (8). Eksperimental kernikterusta, elektron mikroskopik ve otoradyografik çalışmalar, kandan nöronlara bilirubin ana taşıyıcısının astrositler olduğunu göstermiştir (9). Astrositlerin, beyindeki en çok fonksiyon gören hücrelerden biri olduğu (10), enerji homeostazisini düzenlediği (11), KBB'nin bütünlüğünü sağladığı ve fagositik, immun ve detoksifikasyon fonksiyonlarına sahip olduğu yakın zamanda gösterilmiştir (12).

Astrositlerin primer kültürü ile yapılan çalışmaların değişik avantajlarının olması nedeniyle, bu çalışmada bilirubin toksisitesini çalışmak amacıyla astrositlerin primer kültürünü seçtik. Astrositler, biyokimyasal ve morfolojik özellikleri ile in vivo bulunan normal diploid hücrelere benzerler. Astrositler in vitro kültür ortamında yüksek derecede çoğalma özelliklerini korumaktadır. Diğer hücre tipleri ve sistemik faktörler ile olan etkileşimlerinin elimine edilebilir olması nedeniyle astrosit kültürü basit bir sistemdir (13). Astrositler, bu özellikleri nedeniyle bilirubin neden olacağı primer hasarın ve mekanizmalarının ortaya konulmasına olanak sağlayabilir.

Beyin kapillerlerinin bariyer özellikleri astrositler tarafından oluşturulmaktadır. Bu hücreler hormonlar ve nutrientlerin beyne transportunda önemli rol oynarlar. Bu nedenle astrositler, KBB yetersizliğinde bilirubin ile ilk temas eden hücreler olabilir (45). Bilirubin toksisitesinde astrositlerin rolü, eksperimental kernikterusta elektron mikroskopik ve otoradyografik çalışmalar ile daha ileriye götürülmüş, ve bu hücrelerin bilirubin kandan nöronlara esas taşıyıcısı olduğunu ve bilirubinden hasar görmüş nöronlardan salınan atıkların temizlenmesini sağladıklarını ortaya koymuştur (9). Bilirubin ensefalopatisinde astrositlerin rolü büyük oranda ihmal edilmiştir. Astrositler, insanlarda beyin korteksindeki total hücresel volumün yaklaşık olarak üçte birini kapsar. Astrositlerin biyokimyasal özellikleri oldukça iyi tanımlanmıştır: yüksek metabolik aktiviteye sahiptirler, ekstraselüler aralıktan nöroaktif bileşikler temizlerler, ve beyinde tek veya en önemli glutamin sentez yeridir. Bu özellikleri nedeniyle, bilirubin neden olacağı biyokimyasal hasarın gösterilmesinde, astrosit kültürü diğer modellere katkı sağlar (45,46). Astrositlerin primer kültürlerinde, morfolojik olarak, bilirubin neden olduğu hasar, diğer mekanizmalar ile oluşan hücresel hasara benzer olup, hücresel ayrılma ve sitoplazmanın granülasyonu ve/veya koyulaşmasıyla karakterizedir (45).

Astrositler bilirubin hasarına karşı, aktif dışı akım pompalarının daha fazla ekspresyonu (47), veya bilirubin detoksifikasyon kapasitesinin daha büyük olması (41) sayesinde nöronlara göre çok daha dayanıklıdır. Ayrıca, bilirubinün toksik etkilerine karşı LDH temel alındığında, nöronlardan LDH salınımının astrositlerden üç kat fazla olması, nöronların bilirubin nekrotik ölüme karşı duyarlılığının daha fazla olduğunu göstermektedir (48). İmmatür astrositlerde LDH salınımının, diferansiye astrositler ile karşılaştırıldığında daha yüksek olması, bilirubine karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir (45). Bu artmış duyarlılık, bilirubin ensefalopatisine yenidoğanların daha yatkın olması ile korele olabilir.

Yukarıda sözü edilen tüm bu bulgular ciddi hiperbilirubinemi sırasında gelişen ensefalopatide astrositlerin önemli role sahip olduğunu ve gelecekteki tedavi modalitelerinde astrositlerin potansiyel hedef olacağını düşündürmektedir. Bu nedenle bu çalışmada bilirubinün sitotoksik etkilerini değerlendirmek için fare primer astrosit kültürü seçilmiştir. Ancak daha önceki sınırlı sayıda çalışmadan farklı olarak ilk kez bu çalışmada bilirubin toksisitesi oluşturmak için bilirubin stok solüsyonlarının yanında, ısıyla inaktive edilmiş sarılıklı yenidoğan hastaların serumları da kullanıldı. Bu yaklaşımın avantajı indirekt hiperbilirubinemili hasta serumlarının bilirubin yanısıra başka soluble ve ısıya dirençli toksik faktörler aracılığıyla da sitotoksositeye yol açıp açmadığını göstermesidir. Gerçekten de LDH testinin sonuçları indirekt hiperbilirubinemili hasta serumunun çok daha düşük bilirubin konsantrasyonlarında kültür ortamına doğrudan eklenen bilirubinden daha fazla sitotoksositeye yol açtığını işaret etmektedir (Şekil 3-6). Isıyla inaktive edilmiş hasta serumu örneklerinde bu ek soluble faktörlerin kompleman proteinleri olması olası değildir. Çünkü serumun ısıyla muamelesi komplemanı inaktive etmektedir. Şekil 5'de de görüldüğü gibi ısıyla inaktive edilmemiş kontrol hasta serumu inaktive edilmiş serum örneğine göre daha fazla sitotoksositeye yol açmaktadır ve bu komplemana bağlıdır. İndirekt hiperbilirubinemili hasta serumunun içerdiği, kompleman ve bilirubin dışı ısıya dirençli olası toksik faktörler tümör nekrozis faktör alfa, interferon gamma gibi pro-inflamatuvar sitokinler ya da henüz tanımlanmamış gliotoksik ve nörotoksik faktörler olabilir. Benzeri gliotoksik faktörler multipl skleroz, Parkinson hastalığı gibi nöroinflamatuvar ve nörodejeneratif hastalığı olan hastaların beyin-omurilik sıvısı, serum ve idrar örneklerinde saptanmıştır (64-67).

Hiperbilirubinemideki çalışmamızın sonuçlarıyla da varlığı desteklenen, bilirubin dışı olası toksik soluble serum faktörlerinin doğasının belirlenmesi daha ileri çalışmaların konusudur.

Bu tez çalışmasında anti-GFAP immünfloresan boyamasıyla gösterildiği gibi fare primer astrosit kültürlerinin saflığı deneyler süresince % 95'den aşağı düşmemiştir (Şekil 2).

Primer astrosit kültürlerinin saflığı içerebilecekleri nöronal ve diğer glial hücrelerin (mikroglial ve oligodendroglial hücreler) bilirubin sitotoksitesisi deneylerinin sonuçlarını etkileyebilmesi açısından önemlidir. Örneğin nöronal hücrelerin bilirubin toksisitesine astrositlerden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (41). Bu çalışmada nöronal hücrelere spesifik kültür ortamı kullanılmadığı için ve nöronal hücreler proliferasyon göstermediği için mikst glia kültürlerinde ekimden sonraki birkaç günde nöronal hücre kalmamaktadır. Ayrıca astrosit kültürlerinin ileri pasajları (10 ve daha sonrası) kullanıldığı için bu kültürlerin nöronal hücreler içermesi olasılığı bulunmamaktadır. Primer astrosit kültürlerinin saflığı içerebilecekleri diğer glial hücrelerin (mikroglial ve oligodendroglial hücreler) bilirubin sitotoksitesisi deneylerinin sonuçlarını etkileyebilmesi açısından da önemlidir. Bugüne kadar bilirubin oligodendroglial ya da mikroglial hücreler üzerine toksik etkisi konusunda bir çalışma bildirilmemiştir. Bilirubin bu glia hücre tipleri üzerine olası toksik etkisi gelecekteki çalışmaların konusudur. Bilirubin ayrıca mikroglial hücreleri aktive edici etkisi de olabilir. Aktive mikroglial hücrelerden salgılanan nitrik oksid gibi ek toksik faktörler bilirubin toksisitesi sonuçlarında yanlışlıklara neden olabilir. Bilirubin mikroglial hücre aktivasyonuna yol açıp açmadığı da henüz bilinmeyen bir konudur. Sonuç olarak bu çalışmada astrosit kültürlerinde saflık oranının yüksek olması yukarıda sayılan sonuçları etkileyebilecek bu faktörlerin elimine edildiği anlamına gelmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları gerek indirek hiperbilirubinemi hasta serumunun gerekse bilirubin astrosit kültürlerinde doza ve zamana bağlı sitotoksitesiyeye yol açtığını göstermektedir. İndirek hiperbilirubinemi hasta serumunun astrosit üzerine toksik etkisi ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Bilirubin astrosit kültürlerindeki toksik etkisi daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (6,45,48). İlk çalışmada sitotoksitesinin değerlendirilmesinde bu çalışmada da seçilen LDH testi kullanılmışken, diğer iki çalışmada MTT hücre canlılığı testi kullanılmıştır. Ancak kültür ortamına 10  $\mu\text{M}$ 'ın üzerinde konsantrasyonlarda eklenen bilirubin MTT testiyle etkileşerek yanlış sonuçlara yol açtığı bildirilmiştir (68). Bu tez çalışmasında 10  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki bilirubin konsantrasyonları kullanıldığı için sitotoksitesinin değerlendirilmesinde LDH testi seçilmiştir. Rhine ve arkadaşlarının çalışmasında hem immatür, hem de diferansiye sıçan astrosit kültürleri kullanılmış ve immatür astrositler bilirubin toksisitesine daha duyarlı bulunmuştur. Bu tez çalışmasında ise yalnızca immatür fare astrositleri kullanılmıştır. Bu çalışma aynı zamanda bilirubin fare astrositleri üzerine toksik etkisinin gösterildiği ilk çalışma özelliğini de taşımaktadır. Daha önce bildirilen üç çalışma sıçan astrosit kültürleriyle yapılmıştır ve bizim çalışmamızdakine benzer sonuçlar

elde edilmiştir (6,45,48). Bu durum kemirgen astrositlerinin bilirubin toksisitesine karşı duyarlılığında canlı türü farkı faktörünün rol oynamadığını düşündürmektedir.

LDH testinin sonuçları astrosit kültür ortamına eklenen bilirubinin 100  $\mu$ M ve üzerinde uygulanan konsantrasyonlarda 48 saatlik enkübasyon süresinin sonunda pik yapan sitotoksik etkiye yol açtığını göstermektedir. Bu sonuç daha önceki çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur (6,45). 72. ve 96. saatlerde LDH salınımının özellikle yüksek dozlar için 48. saat değerlerinden daha düşük olması kültürlerin yüksek bilirubin konsantrasyona maruz kalması sonucu lizise uğramamış ve LDH salınımı olabilecek hücre sayısının çok azalmış olmasıyla açıklanabilir.

Bilirubinin hücresel düzeydeki toksik etkilerini gerçekte nasıl ortaya çıkardığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Dört olası mekanizma teorik olarak öne sürülmüştür (28); normal sinir iletiminin kesilmesi, mitokondriyal disfonksiyon, sellüler ve intrasellüler membran bozukluğu ve enzim aktivitelerinin engellenmesidir.

Bilirubine maruz kalma süresine ve konsantrasyonuna bağlı olarak hücre ölümünün iki ayrı morfolojik tipi olan apoptoz ve nekroza yol açtığı gösterilmiştir. Morfolojik ölçütlere dayanılarak hücre ölümünün iki formu tanımlanmıştır (48). Apoptotik hücre ölümü nükleer piknoz, kromatin kondansasyonu, plazma membranının ve hücre organellerinin bütünlüğünü koruması ile karakterizedir. Apoptotik hücre ölümü, aktif enerji tüketimini gerektirmektedir ve bu tip hücre ölümünde internükleozomal DNA fragmentasyonu, spesifik sistein proteazların (kaspazlar) aktivasyonu ve spesifik substratların aspartik asid rezidü bölgelerinde spesifik parçalanması görülmektedir. Bunun tersine nekrotik hücre ölümü sitoplazmik şişme, subsellüler komponentlerin entegrasyonunun ve plazma membranının bütünlüğünün bozulması ve enerji kaybıyla karakterizedir.

Bu çalışmada gerek indirek hiperbilirubinemili hasta serumunun ve gerekse bilirubinin astrosit kültürlerinde apoptotik hücre ölümünü indükleyip indüklediği de araştırılmıştır. Bu amaçla apoptotik hücre ölümünün spesifik bir göstergesi olan apostain immünfloresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar hem hasta serumunun hem de bilirubinin doza ve zamana bağımlı astrosit apoptozuna yol açtığını göstermektedir. Bilirubinin eritrosit, hepatosit, endotel hücreleri (39), astrosit ve nöron gibi çeşitli hücre tiplerinde in vitro apoptotik hücre ölümüne yol açtığı daha önceki çalışmalarla bildirilmiştir. Bu tez çalışması indirek hiperbilirubinemili hasta serumunun apoptotik astrosit ölümüne yol açtığını gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca ilk kez bu çalışmada bilirubinin fare astrositlerinin apoptotik ölümünü indüklediği gösterilmiştir.

Bu çalışmanın yukarıda sözü edilen çalışmalardan bir başka ayrı yönü de apoptotik hücre ölümünü belirlemede kullanılan metodolojik farklılıktır. Apostain yönteminin DNA kırıklarından bağımsız olması önemlidir, çünkü çift sarmal DNA kırıklarını saptayan TUNEL gibi yöntemler apoptoz için spesifik değildir (56,59). Gerçekten de üç ayrı nekrotik hücre ölümü modelinde nekrotik hücrelerin TUNEL ile parlak boyandığı fakat anti-ssDNA F7-26 antikoruyla boyanma olmadığı bildirilmiştir (58). Önceki bilirubin çalışmalarında kullanılan TUNEL ya da nukleus boyamaları gibi apoptoz saptama yöntemlerinin apoptoza spesifik olmadığı ve nekrotik hücre ölümünde de pozitif sonuçlar verebildiği bildirilmiştir (56, 59). Bu nedenle bu tez çalışmasında apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde apostain boyama yöntemi seçilmiştir.

Apostain immüno Floresan boyama sonuçları gerek hasta serumunun gerekse bilirubin astrosit kültürlerinde doza bağımlı apoptotik hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir (Şekil 7-13). LDH sonuçlarına benzer biçimde bilirubin apoptotik hücre ölümünü indükleyici etkisi 48. saatte 72. saattekinden daha belirgin bulunmuştur (Şekil 10, 11). Bu sonuç herhangi bir toksik ajana maruz kalma süresinin ve dozunun gelişen hücre ölümü tipini etkilediğini düşündürmektedir. Benzer bir durum nöronlarda glutamat toksisitesi için de bildirilmiştir (69).

Bilirubin apoptotik hücre ölümünü indükleyici etkisinin mekanizmaları henüz aydınlığa kavuşmamıştır. Bilirubin mitokondriyal disfonksiyona yol açıcı etkisi apoptotik hücre ölümünün tetiklenmesinden sorumlu olabilir. Uzun yıllardır mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun irreversibl bilirubin ensefalopati patogenezinin önemli bir parçası olduğuna inanılmaktadır. Moleküler mekanizmalar halen anlaşılmamış olsa bile bazı araştırmacılar bilirubin asidin fosfolipid membranlarda çöktüğünü ve bunun mitokondriyal disfonksiyonla sonuçlandığını ileri sürmüşlerdir. Ancak bazı araştırmacılar da bilirubin çeşitli hücre membranları ile geri dönüşümlü bileşikler oluşturduğunu ve böylece neden kan değişimi veya bilirubin düzeyinin hızla düşürülmesi ile bilirubin toksisitesine ait bazı klinik bulguların geri döndüğünün açıklanabileceğini belirtmişlerdir. İnsan ve rat hücre kültürlerinde bilirubin mitokondriyal enzimleri inhibe ettiği, DNA sentezini engelleyebildiği, DNA iplikciklerinde kırılmayı indüklediği, protein sentezi ve fosforilasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (4,17,27). Ancak bilirubin apoptozu indükleyici etkisinin temelinde bulunan moleküler mekanizmaların tam olarak açıklanabilmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada indirek hiperbilirubinemi hasta serumunun ve bilirubin yenidoğan fare astrosit kültüründe doza ve zamana bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. İn vitro kültür çalışmaları ortam değişkenlerinin

kontrolünün kolaylığı açısından hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasında temel bir öneme sahiptir. Buna karşın saf primer kültürlerin in vivo canlı organizmaların kompleksliğinden çok uzak olması in vitro elde edilen çalışma sonuçlarının in vivo duruma ekstrapolasyonu sorununu doğurmaktadır. Buna karşın özellikle birebir in vivo hastalık modelinin henüz bulunmadığı bilirubin nörotoksitesi gibi hastalık tablolarında hücre kültürü çalışmaları hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasına büyük katkı sağlayabilir. Bu çalışmada kullanılan fare astrosit kültürlerinden elde edilen sonuçlar daha önce sıçan astrosit kültürlerinde yapılan çalışmaların sonuçlarıyla büyük paralellik göstermektedir. Fakat bu deneylerin insan astrosit kültürlerinde de tekrarlanması uygun olacaktır. Bu tez çalışmasının devamı niteliğinde olabilecek gelecek çalışmalarda fare ve sıçan beyninin değişik bölgelerinden (örneğin kortikal, striatal ya da serebellar) elde edilecek astrosit kültürlerinde bilirubin toksitesinin değerlendirilmesi beyinde farklı bölgelerdeki astrositlerin bilirubine farklı yanıtlar verip vermediğini ortaya koyabilir. Bu durum kern ikterus gibi bazal ganglionlar gibi oldukça seçici beyin hasarına yol açan hastalık tablosu açısından önemlidir. Bir başka araştırılması gereken konu da asidoz, hipoksi ve sitokinlerle indüklenen hücre hasarıyla bilirubin toksitesi arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Gerçekten de nöronal hücre kültürlerinde sitokinlerle indüklenen hücre hasarının ve hipoksinin bilirubin toksitesiyle additif etkisi gösterilmiştir (70,71).

Tüm bu bulgular ciddi hiperbilirubinemi sırasında gelişen ensefalopatide astrositlerin önemli role sahip olduğunu ve gelecekteki tedavi modalitelerinde astrositlerin potansiyel hedef olacağını düşündürmektedir.

## SONUÇLAR

Fare astrosit hücre kültüründe, bilirubin stok solüsyonlarının yanında, inaktive edilmiş sarılıklı yenidoğanların serumları kullanılarak, bilirubin toksisitesi ile indüklenen apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün Apostein ve LDH sitotoksitesi testiyle değerlendirilmiş ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1. LDH testi sonuçlarına göre astrosit kültürlerine eklenen indirek hiperbilirubinemili hasta serumu bu hücrelerde doza ve zamana bağımlı sitotoksositeye yol açmaktadır.
2. Astrosit kültürlerine eklenen bilirubin bu hücrelerde doza ve zamana bağımlı sitotoksik etkiye yol açmaktadır. Sitotoksosite değerleri bütün bilirubin konsantrasyonları için 48. saatte tepe noktasına ulaşmaktadır. Sitotoksosite hem aynı zaman dilimindeki, hem de farklı zamanlardaki artan bilirubin konsantrasyonuna bağılı olarak artmaktadır.
3. Apostain immünfloresan boyama sonuçlarına göre astrosit kültürlerine eklenen indirek hiperbilirubinemili hasta serumu bu hücrelerde doza bağımlı apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır.
4. Apostain immünfloresan boyama sonuçlarına göre astrosit kültürlerine eklenen bilirubin bu hücrelerde doza bağımlı apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır.



## KAYNAKLAR

1. McMahon JR, Stevenson DK, Oski FA. Management of neonatal hyperbilirubinemia. In: Tausch HW, Ballard RA, eds. *Avery's Disease of the Newborn*, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998, pp 1033-1043.
2. Halamek LP, Stevenson DK. Neonatal jaundice. In: Fanaroff AA, Martin RJ, eds. *Neonatal Perinatal Medicine. Disease of the Fetus and Infants*, 6<sup>th</sup> ed. St Louis, Mosby-Year Book, 1997, pp 1345-1389.
3. Gartner LM. Neonatal jaundice. *Pediatr Rev* 1994;15:422-432.
4. Cashore WJ. The neurotoxicity of bilirubin. *Clin Perinatol* 1990;17:437-447
5. Hansen TWR, Bratlid D. Bilirubin and brain toxicity. *Acta Paediatr Scand* 1986;75:513-522
6. Chuniaud L, Dessante M, Chantoux F, Blondeau JP, Francon J, Trivin F. Cytotoxicity of bilirubin for human fibroblast and rat astrocytes in culture. Effect of the ratio of bilirubin to serum albumin. *Clin Chim Acta* 1996;256(2):103-114
7. Danbolt C, Hansen TW, Oyasoeter S, Storm-Mathisen J, Bratlid D. In vitro binding of (3H) bilirubin to neurons in rat brain sections. *Biol Neonate* 1993;63(1):35-39
8. Brito MA, Silva RM, Matos DC, da Silva AT, Brites DT. Alterations of erythrocyte morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia. *Clin Chim Acta* 1996;249(1-2):149-165
9. Chen HC, Tsai DJ, Wang CH, Chen YC. An electron microscopic and radioautographic study on experimental kernicterus. I. Bilirubin transport via astroglia. *Am J Pathol* 1969; 56(1):31-58
10. Sivron T, Schwartz M. Glial cell types, lineages, and response to injury in rat and fish: implications for regeneration. *Glia* 1995;13(3):157-165
11. Tsacopoulos M, Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 1996;16(3):877-885
12. Montgomery DL. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol* 1994;31(2):145-167
13. Yu ACH, Gregory GA, Chan PH. Hypoxia-induced dysfunctions and injury of astrocytes in primary cell cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:20-28
14. Hansen TWR. Pioneers in the scientific study of neonatal jaundice and kernicterus. *Pediatrics* 2000;106:e15.

15. McMahon JR, Stevenson DK, Oski FA. Bilirubin toxicity, encephalopathy, and kernicterus. In: Taeusch HW, Ballard RA, eds. *Avery's Disease of the Newborn*, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998, pp1003-1007.
16. Connolly AM, Volpe JJ. Clinical feature of bilirubin encephalopathy. *Clin Perinatol* 1990;17:371-379.
17. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 2001; 344:581-590.
18. Johnston WH, Angara V, Baumal R, et al. Erythroblastosis fetalis and hyperbilirubinemia: a five-year follow up with neurological, psychological, and audiological evaluation. *Pediatrics* 1967; 39:88.
19. Keaster J, Hyman CB, Harris I. Hearing problems subsequent to neonatal hemolytic disease or hyperbilirubinemia. *Am J Dis Child* 1969;117:406.
20. Hsia DY-Y, Allen FH Jr, Gellis SS, Diamond LK. Erythroblastosis fetalis. VIII. Studies of serum bilirubin in relation to kernicterus. *N Engl J Med* 1952;247:668-671.
21. Killander A, Müller EU, Sjölin S. Indications for exchange transfusion in newborn infants with hyperbilirubinemia not due to Rh immunization. *Acta Paediatr Scand* 1960;49:377-390.
22. Maisels MJ. Neonatal jaundice. In: Avery GB, ed. *Neonatology, Pathophysiology and Management of the Newborn*, 3<sup>th</sup> ed. Philadelphia JB Lippincott, 1987, pp 534-629.
23. Brodersen R, Stern L. Deposition of bilirubin acid in the central nervous system—a hypothesis for the development of kernicterus. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:12-19.
24. Gartner L, Synder RM, Chabon RS. Kernicterus: high incidence in premature infants with low serum bilirubin concentrations. *Pediatrics* 1970;45:906-917.
25. Stern L, Denton RL. Kernicterus in small premature infants. *Pediatrics* 1965;10:483-485.
26. Levine RL, Fredericks WR, Rapaport SI. Entry of bilirubin into the brain due to opening of the blood-brain barrier. *Pediatrics* 1982;69:255-259.
27. Bratlid D. How bilirubin gets into the brain. *Clin Perinatol* 1990;17:449-465.
28. Palmer CC, Smith MB. Assessing the risk of kernicterus using nuclear magnetic resonance. *Clin Perinatol* 1990;17:307-329.
29. Amato MM, Kilguss NV, Gelardi NL, Cashore WJ. Dose-effect relationship of bilirubin on striatal synaptosomes in rats. *Biol Neonate* 1994;66:288-293.
30. Hoffman DJ, Zanelli SA, Kubin J, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. The in vivo effect of bilirubin on the N-methyl-D-aspartate receptor/ion channel complex in the brains of newborn piglets. *Pediatr Res* 1996;40:804-808.

31. Wennberg RP. The importance of free bilirubin acid salt in bilirubin uptake by erythrocytes and mitochondria. *Pediatr Res* 1988;23:443-447.
32. Ives NK, Bolas NM, Gardiner RM. The effects of bilirubin on brain energy metabolism during hyperosmolar opening of the blood-brain barrier: an in vivo study using <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 1989;26:356-361
33. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312
34. Karp WB. Biochemical alterations in neonatal hyperbilirubinemia and bilirubin encephalopathy : a review. *Pediatrics* 1979;64:361-368
35. Roseth S, Hansen TW, Fonnum F, Walaas SI. Bilirubin inhibits transport of neurotransmitters in synaptic vesicles. *Pediatr Res* 1998;44:312-316
36. Amit Y, Chan G, Fedunec S, Poznansky MJ, Schiff D. Bilirubin toxicity in a neuroblastoma cell line N-115: I. Effects on Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase, (<sup>3</sup>H)-thymidine uptake, L-(<sup>35</sup>S)-methionine incorporation, and mitochondrial function. *Pediatr Res* 1989;25:364-368
37. Amit Y, Brenner T. Age-dependent sensitivity of cultured rat glial cells to bilirubin toxicity. *Exp Neurol* 1993;121:248-255
38. Notter MF, Kendig JW. Differential sensitivity of neural cells to bilirubin toxicity. *Exp Neurol* 1986;94(3):670-682
39. Silva RFM, Rodrigues CMP, Brites D. Bilirubin-induced apoptosis in cultured rat neural cells is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid. *J hepatol* 2001;34:402-408
40. Rodrigues CMP, Sola S, Silva RFM, Brites D. Aging confers different sensitivity to the neurotoxic properties of unconjugated bilirubin. *Pediatr Res* 2002;51(1):112-118
41. Hansen TWR, Allen JW. Oxidation of bilirubin by rat brain mitochondrial membranes-dependence on cell type and postnatal age. *Biochem Mol Med* 1997;60:155-160
42. Majumdar APN. Bilirubin encephalopathy: effect on RNA polymerase activity and chromatin template activity in the brain of Gnn rat. *Neurobiology* 1974;4:425-431
43. Hansen TWR, Bratlid D, Walaas SI. Bilirubin decreases phosphorylation of synapsin I, a synaptic vesicle-associated neuronal phosphoprotein, in intact synaptosomes from rat cerebral cortex. *Pediatr Res* 1988;23:219-223
44. Sano K, Nakamura H, Matsuo T. Mode of inhibitory action of bilirubin on protein kinase C. *Pediatr Res* 1985;19:587-590
45. Rhine WD, Schmitter SP, Yu ACH, Eng LF, Stevenson Dk. Bilirubin toxicity and differentiation of cultured astrocytes. *J Perinatol* 1999;19(3):206-211

46. Kimelberg HK. Primary astrocyte cultures-a key to astrocyte function. *Cell Mol Neurobiol*. 1983;3(1):1-16
47. Decleves X, Regina A, Laplanche JL, Roux F, Boval B, Launay JM, Schermann JM. Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 2000;60:594-601
48. Silva RFM, Rodrigues CMP, Brites D. Rat cultured neuronal and glial cells respond differently to toxicity of unconjugated bilirubin. *Pediatr Res* 2002;51(4):535-541
49. Stevenson DK, Fanaroff AA, Maisels MJ, et al. Prediction of hyperbilirubinemia in near-term and term infants. *Pediatrics*. 2001; 108:31-39.
50. Bilirubin and brain injury. In: Volpe JJ. *Neonatal neurology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995:490-514
51. Jardine DS, Rogers K. Relationship of benzyl alcohol to kernicterus, intraventricular hemorrhage, and mortality in preterm infants. *Pediatrics* 1989;83:153-160.
52. Ahlfors CE. Criteria for exchange transfusion in jaundiced newborns. *Pediatrics* 1994;93:488-494.
53. Wennberg RP, Gospe SM Jr, Rhine WD, Seyal M, Saeed D, Sosa G. Brainstem bilirubin toxicity in the newborn primate may be promoted and reversed by modulating PCO<sub>2</sub>. *Pediatr Res* 1993;34:6-9.
54. Conlee JW, Shapiro SM. Development of cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: a quantitative light microscopic analysis. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997;93:450-460.
55. Zamzani N, Kroemer J. Condensed matter in cell death. *Nature* 1999 ; 401 : 127-128
56. Allera C, et al. The condensation of chromatin in apoptotic thymocytes shows a specific structural change. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 10817-10822
57. Frankfurt OS. Detection of apoptotic leukemic and breast cancer cells with monoclonal antibody to single-stranded DNA. *Anticancer Res* 1994 ; 14 : 1861-1870
58. Frankfurt Os, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide induced DNA denaturation in situ. *J Histochem Cytochem* 2001 ; 49 : 369-378
59. Grasl-Kraipp B, et al. In situ detection of fragmented DNA (TUNNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death : A cautionary note. *Hepatology* 1995 ; 21 : 1465-1468
60. Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human leukemia cells by etoposide, camptotecin, and other cytotoxic anticancer agents: A cautionary note. *Cancer Res* 1989 ; 49 : 5870-5878

61. Kuribayashi N, et al. Chromatin structure and endonuclease sensitivity in human leukemic cell line. *Anticancer Res* 1996 ; 16 : 1225-1230
62. McGahon AJ, et al. The end of the (cell) line : methods for the study of apoptosis in vitro. In 'Methods in Cell Biology, Vol 46, Cell Death, LM Schwartz and BA Osborne (eds.), pp. 150-181, Academic Press, San Diego, 1995
63. Frankfurt OS. Decreased stability of DNA in cells treated with alkylating agents. *Exp Cell Res* 1990 ; 191 : 181-185
64. Yu SJ, Lo ES, Cochran EJ, Faselis CJ, Klawans HL, Carvey PM. Cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease alters the survival of dopamine neurons in mesencephalic culture. *Exp Neurol* 1994; 126(1): 15-24
65. Malcus-Vocanson C, Giraud P, Micoud F, Janin V, Charles MH, Broussolle E, Chazot G, Mandrand B, Perron H. Glial toxicity in urine and multiple sclerosis. *Mult Scler* 2001;7(6): 383-388
66. Benjelloun N, Charriaut-Marlangue C, Hantaz-Ambroise D, Menard A, Pierig R, Alliel PM, Rieger F. Induction of cell death in rat brain by a gliotoxic factor from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Cell Mol Biol* 2002;48(2):205-212
67. Hao R, Ebadi M, Pfeiffer RF. Selegiline protects dopaminergic neurons in culture from toxic factor(s) present in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1995;200(2):77-80
68. Grojean S, Koziel V, Vert P, Daval JL. Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons. *Exp Neurol* 2000;166:334-341
69. Choi DW. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res* 1994;100:47-51
70. Yeung CY, Ngai KC. Cytokine-and endotoxin bilirubin cytotoxicity. *J Perinatol* 2001;21(1):56-58
71. Grojean S, Lievre V, Koziel V, Vert P, Daval JL. Bilirubin exerts additional toxic effects in hypoxic cultured neurons from the developing rat brain by the recruitment of glutamate neurotoxicity. *Pediatr Res* 2001;49:507-513