



**T.C.**

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**NÖRON HÜCRE KÜLTÜRÜNDE BİLİRUBİNİN OLUŞTURDUĞU  
NÖROTOKSİSİTEDE HİPOTERMINİN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

Dr. NAZLI KUTER

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2017





**T.C.**

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**NÖRON HÜCRE KÜLTÜRÜNDE BİLİRUBİNİN OLUŞTURDUĞU  
NÖROTOKSİSİTEDE HİPOTERMINİN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

Dr. NAZLI KUTER

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. EREN ÖZEK

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL 2017

## ÖNSÖZ

Tüm asistanlığım boyunca her şeyden önce duruşuyla, bilgisiyle, mesleğine olan sevgisi ve adanmışlığıyla, hekimlik ve akademisyenlik anlayışımı biçimlendiren, düşündüğümün çok ötesinde bu tez çalışmamı yapabileceğime inanan ve çalışmam boyunca emeğini ve vaktini benden esirgemeyen, geleceğimle ilgili hayallerimi gerçekleştirmem için bana destek olan ve beni yüreklendiren, yaşamımın her evresinde düşünceleriyle bana ışık tutacağına inandığım değerli hocam Prof. Dr. Eren Özek'e,

Tez çalışmamı hayata geçirmeme olanak veren ve rehberlik eden Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e, bu aşamada gece gündüz hep yanımda olan Neşe Ayşit Altuncu'ya ve keyifle araştırma yapabilmemi sağlayan REMER ekibine,

Bize büyük emeği geçen, bilgi ve tecrübeleriyle bize yol gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ayşe Gülnur Tokuç ve tüm hocalarıma, mesleki yönümü bulabilmemi sağlayan sevgili Marmara Yenidoğan ailesine,

Bilgileriyle, nasihatlarıyla bize abilik ve ablalık yapan başta Dr. Saygın Abalı ve Dr. Birol Öztürk olmak üzere yandal uzmanlarımıza,

Berber öğrendiğim ve beraber yorulduğum, Serdar Pekuz başta olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Asistanlığımın bana hediyelerinden biri olan, pediatriye beraber gözümü açtığım ömürlük dostum Özge Kamer Karalar Pekuz'a,

Bana ayaklarımın üzerinde durmayı öğreten, bulunduğum yere gelmemde her adımda emeği olan, hayatımın en değişmezi sevgili anneme, bana araştırmanın heyecanını göstermiş olan, sevgisini ve desteğini hep yanımda hissettiğim babama, anne yarım canım teyzeme, her daim yanımda olan Nuri abime, biricik öğretmenim Nihal Neriman Bekiroğlu ve Nihat amcama,

Son olarak da bu mesleği seçmeme sebep, yaptığım işten keyif almamı sağlayan tüm çocuklara teşekkür ederim.

Dr. Nazlı Kuter  
Ocak 2017

## ÖZET

**Amaç:** Primer fare nöron hücre kültürlerinde bilirubin kaynaklı toksisitede hipotermimin nöroprotektif etkilerini araştırmak.

**Gereç ve Yöntem:** Yenidoğan fare beyinlerinden izole edilen hipokampus hücre kültürleri in vitro 3. günde bilirubin uygulanarak normotermik ortamdan alınıp farklı derecelerde hipotermiye maruz bırakıldılar. Başlangıçta ve bilirubin ile 24 saat inkübasyon sonrasında normotermik (37°C), hafif hipotermik (34°C), orta hipotermik (32°C) ve ağır hipotermik (29°C) gruplar arasındaki hücre sağ kalım ve apoptoz oranları karşılaştırıldı. Hücre ölümü değerlendirmelerinde konfokal mikroskop ve floresan boyalar (Propidiyum-İyodür ve JC-1) kullanıldı. Hipotermimin geç etkilerinin değerlendirilebilmesi için kültürler normotermik ortama geri alındıktan sonra in vitro 7. günde tekrar incelendi. Sonuçların elde edilmesi için tüm deneyler üç kez tekrarlandı.

**Bulgular:** Bilirubin maruziyetinden 24 saat sonra nöral hücrelerin mortalite oranları 37°C’de %44,2±0,98 (ort±SEM); 34°C’de %33,4±5,62; 32°C’de %18,1±0,48; 29°C’de %27,6±2,33 olarak saptandı (p=0,002). Alt grup analizlerinde normotermik gruba göre orta ve ağır hipotermik gruplarda mortalitede anlamlı düşüş görüldü (p=0,002 ve p=0,032, sırasıyla). Hafif hipotermi grubunun mortalite oranı da normotermik gruba göre düşük olmakla birlikte, anlamlı fark saptanmadı (p=0,230). Ancak apoptoz oranları hafif ve orta hipotermi gruplarında daha düşük iken (%36,5±0,33 ve %32,3±0,63, sırasıyla), ağır hipotermi grubunda düşüş saptanmadı (%45,6±2,61). İn vitro 7. günde (bilirubin maruziyeti sonrası 3. günde), orta hipotermi grubu %25,9±2,7 ile en düşük mortalite oranına sahip olan grup idi ve normotermik gruba göre anlamlı fark mevcuttu (p=0,043).

**Sonuç:** Sonuç olarak hipotermi, nöron hücrelerinde bilirubin kaynaklı hücre ölümünü azaltmaktadır. Hafif hipotermiye kıyasla orta hipotermimin etkileri daha olumlu iken, 29°C’ye kadar inilen derin hipotermimin hücre viabilitesine olumsuz etkileri mevcuttur. Ağır yenidoğan sarılığında soğutmanın risk ve faydalarının belirlenebilmesi için ileri in vitro ve in vivo çalışmaların yapılması gerekmektedir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** hiperbilirubinemi, hipotermi, nörotoksisite, apoptoz, nöral hücre kültürü

## ABSTRACT

**Aim:** To investigate the neuroprotective effects of hypothermia on bilirubin induced toxicity in primary mouse neuronal cell cultures.

**Material and Method:** Hippocampal cell cultures, isolated from newborn mouse brain were incubated with bilirubin at 3 days in vitro (DIV) and immediately exposed to varying degrees of hypothermia. Before and after 24 hours of incubation with bilirubin, the cell viability and apoptosis rates were compared between the normothermic (37°C), mild (34°C), moderate (32°C) and severe (29°C) hypothermic groups. Confocal microscopy and florescent dyes (Propidium-Iodide and JC-1) were used for cell death evaluation. To determine the late effects of hypothermia, the cultures were also examined at 7 DIV after returning to normothermic conditions. Three independent experiments were carried out to obtain the results.

**Results:** After 24 hours of bilirubin exposure, the mortality rates of the neural cells were  $44.2 \pm 0.98\%$  (mean $\pm$ SEM) at 37°C;  $33.4 \pm 5.62\%$  at 34°C;  $18.1 \pm 0.48\%$  at 32°C and  $27.6 \pm 2.33\%$  at 29°C, ( $p=0.002$ ). The subgroup analysis showed significant decrease in the overall mortality in the moderate and severe hypothermic groups compared to the normothermic group ( $p=0,002$  and  $p=0,032$  respectively). Mortality in the mild hypothermic group was also lower than the normothermic group, although not significantly ( $p=0,230$ ). However the apoptosis rate, although lower in the mild and moderate hypothermic groups ( $36.5 \pm 0.33\%$  and  $32.3 \pm 0.63\%$  respectively), was not decreased in the severe hypothermic group ( $45.6 \pm 2.61\%$ ). At 7 DIV (3 days after bilirubin exposure), the moderate hypothermic group had the lowest mortality rate with  $25.9 \pm 2.7\%$ , significantly different from the normothermic group ( $p=0,043$ ).

**Conclusion:** We conclude that hypothermia reduces the cell death induced by bilirubin toxicity in neuronal cells. Although moderate hypothermia has a better outcome than mild hypothermia, deep hypothermia as low as 29°C has adverse effects on neuronal cell viability. Further in vitro and in vivo studies should be performed to assess the risks and benefits of cooling in severe neonatal jaundice.

**KEY WORDS:** hyperbilirubinemia, hypothermia, neurotoxicity, apoptosis, neural cell culture

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TABLOLAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Yenidoğanda Bilirubin Metabolizması.....	3
2.2. Yenidoğanlarda Hiperbilirubinemi Risk Faktörleri.....	4
2.3. Yenidoğanda Patolojik İndirekt Hiperbilirubinemi.....	6
2.4. Yenidoğanlarda Bilirubin Oluşturduğu Nörotoksisite.....	8
2.4.1. Kan Beyin Bariyeri ve Bilirubin Beyne Geçişi.....	8
2.4.2. Hüresel ve Moleküler Boyutta Bilirubin Nörotoksisitesi.....	10
2.4.2.1. Bilirubin Nöronlar Üzerindeki Toksisitesi.....	10
2.4.2.2. Astrositler ve Mikrogliaların Bilirubin Nörotoksisitesindeki Yeri.....	13
2.4.3. Bilirubin İndüklediği Nörolojik Disfonksiyon (BIND), Akut Bilirubin Ensefalopatisi ve Kernikteru.....	14
2.5. Yenidoğanlarda İndirekt Hiperbilirubinemi Tedavisi.....	17
2.5.1. Fototerapi.....	17
2.5.2. Kan Değişimi.....	18
2.5.3. Farmakolojik Tedaviler.....	20
2.5.3.1. İntravenöz İmmünglobulin.....	20

2.5.3.2. Fenobarbital.....	21
2.5.3.3. Ursodeoksikolik Asit.....	21
2.5.3.4. Metalloporfirinler.....	21
2.6. Yenidoğanlarda Hipotermi Tedavisi Uygulamaları.....	21
2.6.1. Hipoksik İskemik Ensefalopati.....	21
2.6.2. Diğer Endikasyonlar ile Hipotermi Uygulamaları.....	23
2.6.3. Hipotermi ve Nöron Koruyucu Etkileri.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Deney Planı.....	26
3.1.1. Genel Deney Planı.....	26
3.2. Bilirubin Hazırlanması.....	27
3.2.1. Bilirubin Saflaştırılması.....	27
3.2.2. Bilirubin Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Albumin ile Kullanılması.....	27
3.3. Nöron Hücre Kültürlerinin Oluşturulması.....	28
3.3.1. Petrilerin Kaplanması.....	28
3.3.2. Diseksiyon.....	28
3.3.3. Kültür ve Hücre Yaşam Besiyeri.....	28
3.3.4. Kimyasal Ayrıştırma.....	29
3.3.5. Mekanik Ayrıştırma.....	29
3.3.6. Hücre Ekimi.....	30
3.4. Kültürlerde %50 Mortalite Sağlayan Bilirubin Dozunun Bulunması.....	30
3.5. Bilirubin Uygulanmış Kültürlerin Soğutulması.....	31
3.6. Kültürlerin Görüntülemeleri.....	32
3.6.1. PI Görüntülemeleri.....	32

3.6.2. JC-1 Görüntülemeleri.....	33
3.7. İstatistiksel Analizler.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Bilirubin Dozlarına Göre Hücre Ölüm Oranları.....	36
4.2. Soğutma Derecelerine Göre Mortalite.....	37
4.2.1. Normotermik (37°C) Grupta Mortalite.....	37
4.2.2. Hafif Hipotermik (34°C) Grupta Mortalite.....	38
4.2.3. Orta Hipotermik (32°C) Grupta Mortalite.....	40
4.2.4. Ağır Hipotermik (29°C) Grupta Mortalite.....	41
4.2.5. Soğutma Derecelerine Göre Bilirubin Maruziyeti Sonrası Nöral Hücrelerde Hayatta Kalım.....	43
4.3. Soğutma Derecelerine Göre Bilirubin Maruziyeti Sonrası Apoptoz Oranları.....	45
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇLAR.....	55
KAYNAKLAR.....	58

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Yenidoğanlarda İndirekt Hiperbilirubinemi Nedenleri.....	7
<b>Tablo 2.</b> BIND skorlaması.....	15
<b>Tablo 3.</b> Kan Değişiminde için Bilirubin/Albumin Oranları.....	20
<b>Tablo 4.</b> Hipotermimin Potansiyel Nöron Koruyucu Mekanizmaları.....	25
<b>Tablo 5.</b> Normotermik Ortamda 24 Saat Bilirubin ile İnkübasyon Sonrası Mortalite Oranları.....	36
<b>Tablo 6.</b> Normotermik Grupta Mortalite Oranları.....	37
<b>Tablo 7.</b> Hafif Hipotermik Grupta Mortalite Oranları.....	39
<b>Tablo 8.</b> Orta Hipotermik Grupta Mortalite Oranları.....	40
<b>Tablo 9.</b> Ağır Hipotermik Grupta Mortalite Oranları.....	42
<b>Tablo 10.</b> Soğutma Derecelerine Göre Bilirubin Sonrası Mortalite Oranları.....	44
<b>Tablo 11.</b> Soğutma Derecelerine Göre Bilirubin Sonrası Apoptoz Oranları.....	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bilirubin Metabolizması.....	4
Şekil 2. Yenidoğanlarda Postnatal Yaş ve Bilirubin Seviyesine Göre Hiperbilirubinemi Risk Monogramı.....	6
Şekil 3. Nörovasküler birim.....	9
Şekil 4. Kan Beyin Bariyeri.....	9
Şekil 5. Konjuge edilmemiş bilirubinin nöral hücre zarı ve hücre içi yollar ile etkileşimleri.....	12
Şekil 6. Kernikterus.....	15
Şekil 7. Gestasyon haftası 35 ve üzeri bebeklerde fototerapi endikasyonları.....	18
Şekil 8. Gestasyon haftası 35 ve üzeri bebekler için kan değişimi endikasyonları....	19
Şekil 9. A) Yenidoğan Balb-c fare; B) İzole edilmiş beyin; C) İzole edilmiş hipokampus dokuları.....	29
Şekil 10. Kültürlere Bilirubin Uygulanması ve Sonraki Değerlendirmelerin Deney Planı.....	33
Şekil 11. A, Hipokampus kültürü, BF ile görüntüleme; B, Hipokampus kültürü, PI ile görüntüleme; C, Hipokampus kültürü, PI ve BF ile görüntüleme.....	34
Şekil 12. Bilirubin maruziyeti sonrası apoptoz, JC-1 ile görüntüleme.....	34
Şekil 13. Bilirubin Dozlarına Göre Mortalite Oranları.....	36
Şekil 14. Normotermik Grupta Bilirubin Eklenen Petrilerde Mortalite Oranları.....	38
Şekil 15. Hafif Hipotermik Grupta Bilirubin Eklenen Petrilerde Mortalite Oranları.....	39
Şekil 16. Orta Hipotermik Grupta Bilirubin Eklenen Petrilerde Mortalite Oranları.....	41

<b>Şekil 17.</b> Ağır Hipotermik Grupta Bilirubin Eklenen Petrilerde Mortalite	
Oranları.....	42
<b>Şekil 18.</b> Sıcaklık Gruplarına Göre Bilirubinün 24. Saatinde Mortalite.....	44
<b>Şekil 19.</b> Sıcaklık Gruplarına Göre Bilirubinün 3. Gününde Mortalite.....	45
<b>Şekil 20.</b> Bilirubin Maruziyeti Sonrası Hipotermi Derecelerine Göre Apoptoz	
Oranları.....	46
<b>Şekil 21.</b> A) Bilirubin sonrası PI; B) Bilirubin öncesi JC-1; C)Bilirubin sonrası	
JC-1.....	47



## KISALTMALAR

<b>AAP:</b>	Amerikan Pediatri Akademisi (American Academy of Pediatrics)
<b>ABE:</b>	Akut Bilirubin Ensefalopatisi
<b>ADP:</b>	Adenozin difosfat
<b>ATP:</b>	Adenozin trifosfat
<b>BF:</b>	Bright Field
<b>BIND:</b>	Bilirubinindüklediği nörolojik disfonksiyon (Bilirubin induced neurological dysfunction)
<b>DIV:</b>	İn vitro gün (Days in vitro)
<b>ECMO:</b>	Ektrakorporeal membran oksijenizasyonu
<b>FBS:</b>	Fetal dana serumu (Fetal bovine serum)
<b>G6PD:</b>	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
<b>HİE:</b>	Hipoksik iskemik ensefalopati
<b>IL-1<math>\beta</math>:</b>	İnterlökin 1-beta
<b>IL-6:</b>	İnterlökin 6
<b>JC-1:</b>	5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolikarbosiyanin iyodid
<b>KBB:</b>	Kan beyin bariyeri
<b>MAP:</b>	Mikrotübül ilişkili protein (Microtubule associated protein)
<b>MAPK:</b>	Mitojen aktive protein kinaz
<b>MRP1:</b>	Çoklu ilaç direnci ilişkili protein 1 (Multidrug resistance associated protein 1)
<b>NEK:</b>	Nekrotizan enterokolit
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	Nükleer faktör kappa-B
<b>NMDA:</b>	N-metil-D-aspartat

<b>NO:</b>	Nitrik oksit
<b>NOS:</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>Ort±SEM:</b>	Ortalama ± Standard error of mean
<b>Pgp:</b>	P-glikoprotein
<b>PI:</b>	Propidiyum İyodür
<b>RES:</b>	Retiküloendoteliyel Sistem
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tümör nekroz faktör-alfa
<b>TSB:</b>	Total serum bilirubin
<b>UDP:</b>	Uridin difosfat

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yenidoğan döneminde sarılık, birçok ülkede halen önemli bir sağlık sorunudur. Sağlıklı term bebeklerin %60'ında indirekt hiperbilirubinemi görülürken, bu oran preterm bebeklerde %80'lere çıkmaktadır [1].

Normalde, güçlü bir antioksidan olan bilirubinün fizyolojik yükselişi, doğum sonrası hayata adaptasyonun bir sonucudur [2]. Ancak risk grubundaki yenidoğan bebekte indirekt hiperbilirubinemi, uygun yaklaşım yapılmadığı takdirde, akut bilirubin ensefalopatisi ve kernikterus gibi, minimal nörolojik disfonksiyondan ağır serebral palsiye uzanan bir spektrumda mortalite ve morbiditeyi artıran tablolara neden olabilmektedir [2-4]. Gelişmekte olan ülkelerde kernikteruslu olguların %35'i hayatını kaybetmekte ve sağ kalanların önemli bir kısmında ise kalıcı nörolojik sekel gelişmektedir [4, 5]. Hiperbilirubinemi erken tanı alındığında ve uygun yaklaşım yapıldığında, ağır komplikasyonların önüne geçilebilse de, öğrenme güçlüğü gibi minimal nörolojik disfonksiyonu önlemek her zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenlerle günümüzde yenidoğan acil pratiğinde indirekt hiperbilirubinemi önemini korumaktadır [4, 6].

Artmış indirekt bilirubin santral sinir sisteminde birçok farklı yolak üzerinden hasar oluşturmaktadır. Oluşan hasarın temelinde nöro-inflamasyon, oksidatif stres, eksitotoksisitenin ve apoptozun majör rol oynadığı düşünülmektedir [7, 8]. Ancak oluşan nörotoksisitenin tam boyutu ve toksisiteye yol açan mekanizmalar henüz bütünüyle bilinmemektedir [9].

Günümüzde yenidoğan sarılığı tedavisi temel olarak fototerapi ve kan değişimi ile sınırlıdır [1]. Bu tedavi yöntemlerinde ana hedef, bilirubini uzaklaştırmaktır, nörotoksisiteyi önleyici veya oluşan hasarı geri çevirici etkileri yoktur. Bu nedenle hiperbilirubineminin yol açtığı nörotoksisitenin, oluşum mekanizmaları tanımlanmalı ve nöronal hasara etkili tedaviler araştırılmalıdır [9, 10].

Serebral hipotermi tedavisi, hipoksik iskemik ensefalopatinin uzun dönemde

prognozunu olumlu yönde etkilediği kanıtlanmış olan tek tedavi yöntemidir. Yapılan geniş olgu serili klinik çalışmalarda serebral ve total vücut soğutmasının, sağ kalanlarda majör nörogelişimsel handikapı belirgin olarak düşürdüğü gösterilmiştir [11]. Günümüz neonatoloji pratiğinde hipotermi tedavisi, belli bir protokol çerçevesinde asfiktik bebeklerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve önemli bir yan etkisi olmadığı gösterilmiştir. Hipotermi, hipoksi modellerinde apoptozis oranını azaltabilmekte, serebral metabolik hızı yavaşlatabilmekte, eksitatuar amino asitlerin salgılanmasını ve nitrik oksit, serbest radikaller gibi toksik madde üretimini azaltabilmektedir [11-13].

Hipoksi ve hiperbilirubineminin nöronal hasar yaratma mekanizmaları birçok açıdan örtüşmektedir. Bu durum göz önüne alınarak planlanan bu çalışmada, primer fare nöron hücre kültürlerinde bilirubin toksisitesi oluşturulmuş ve sonrasında hipoterminin, oluşan toksisite üzerindeki nöroprotektif etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Yenidoğan sarılığı çoğunlukla doğum sonrası ilk bir haftada görülen ve selim seyreden bir durumdur. Sarılık, konjuge edilmemiş, apolar ve yağda çözülebilen bilirubin pigmentinin ciltte birikmesi ile meydana gelir [1]. Çoğu yenidoğanda hiperbilirubinemi fizyolojik düzeylerde seyretmekte ve müdahale edilmeden düzelmekte olsa da, ağır hiperbilirubinemi halen yaşamın ilk haftasında morbiditeye neden olan en önemli sorunlardan biridir [14, 15].

Patolojik hiperbilirubineminin etiyolojisi çok farklıdır. Temel mekanizma olarak artmış bilirubin yapımı ve azalmış bilirubin eliminasyonundan kaynaklanır. Konstitüsyonel ve çevresel faktörler de hem bilirubin seviyelerini hem de klinik gidişi etkileyebilir [6].

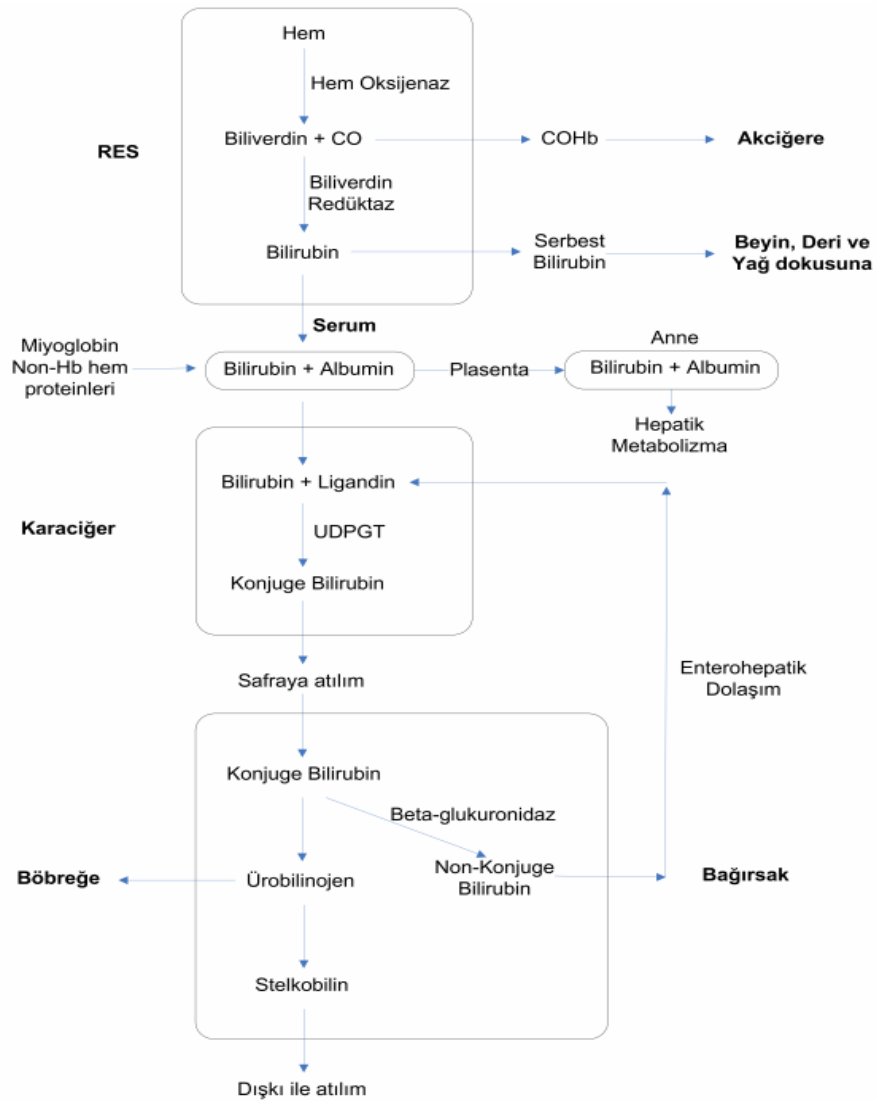
### 2.1. Yenidoğanda Bilirubin Metabolizması

Normal şartlarda vücuttaki bilirubinün %75'i, retiküloendotelial sistemde (RES) yaşlanmış eritrositlerin yıkımı sonucu meydana gelir. Geri kalan %25 ise miyogloblin, sitokrom ve guanil siklaz gibi hem-proteinlerinin yıkımı ile oluşur [16].

RES'ten dolaşıma karışan bilirubine indirekt veya konjuge olmamış bilirubin denir ve fizyolojik pH'da suda çözünmez. Konjuge edilmemiş bilirubin serumda albumine bağlanarak karaciğere taşınır ve hepatosit içerine alınarak endoplazmik retikulumda, üridin difosfat (UDP) glukuronil transferaz enzimi aracılığı ile konjuge edilerek suda çözünebilen UDP-glukuronik asit ve bu asitin tuzlarına dönüştürülür. Sonrasında konjuge bilirubin safra yolu ile bağırsaklara atılarak ve daha az miktarı da idrar ile vücuttan uzaklaştırılır. Albumine bağlanamayan çok az miktarda konjuge edilmemiş bilirubin ise dolaşımda serbest halde bulunur (Şekil 1) [16, 17].

Yenidoğanlarda sarılığın sık görülmesinin temel nedenleri, fetal eritrosit yıkımı nedeniyle bilirubin üretiminin artması, hepatositlerde bilirubin bağlayan ligandin proteininin yetersiz konsantrasyonu ve glukuronil transferaz enzim aktivitesindeki düşüklük nedeni ile bilirubinün glukuronik asit ile konjuge edilerek safra yolundan yeterli miktarda atılamamasıdır [18]. Bu nedenlere ek olarak safra yoluyla bağırsağa atılmış olan bir miktar konjuge bilirubin, yenidoğan bebeğin

bağırsağında bulunan  $\beta$ -glukuronidaz enzimi ile konjuge edilmemiş bilirubine dönüştürülerek tekrar dolaşıma katılabilir. Bu döngüye enterohepatik dolaşım denir ve geri emilen bilirubin, toplam bilirubin yükünde önemli bir rol oynar [17]. Bağırsak motilitesinin az olması, düşük kalori alımı ve  $\beta$ -glukuronidaz enzim aktivitesinin yüksek olması, enterohepatik dolaşımı artıran faktörler arasında yer alır (Tablo 1) [19].



**Şekil 1: Bilirubin Metabolizması**

## 2.2. Yenidoğanlarda Hiperbilirubinemi Risk Faktörleri

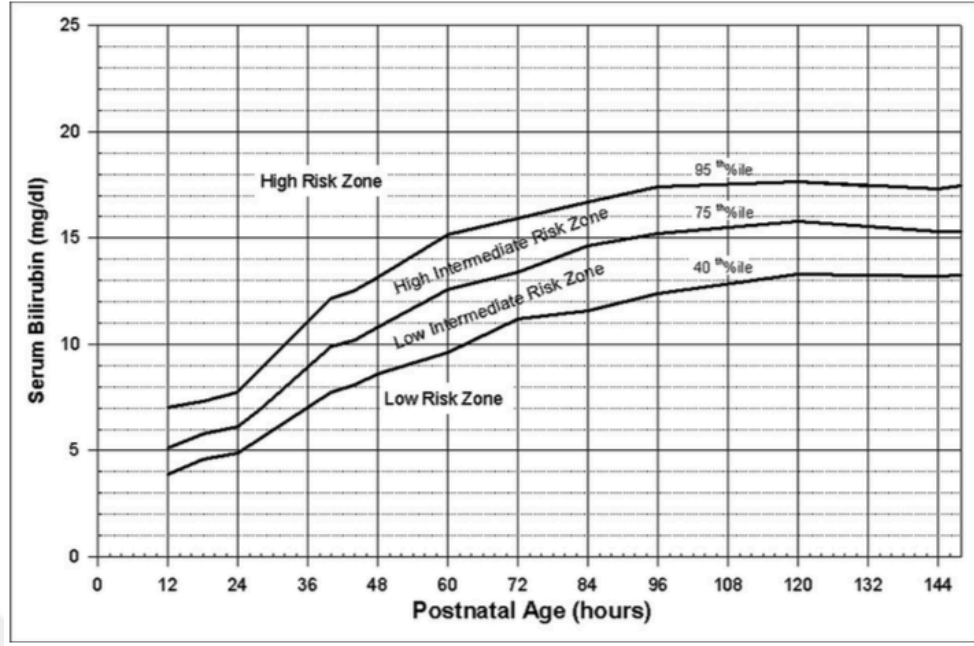
35 gestasyon haftası ve üzerinde doğmuş bebekler için hiperbilirubinemi açısından majör ve minör risk faktörleri tanımlanmıştır [10]. Prematüre bebeklerde ise prematürelilik ve düşük doğum ağırlığı başlı başına bir risk faktörüdür.

### Majör Risk Faktörleri

1. Taburculuk öncesi yüksek risk zonuna giren total bilirubin seviyesi (serum veya transkütanöz) (Şekil 2) [20]
2. İlk 24 saatte ortaya çıkan sarılık
3. Direkt antiglobulin testi pozitif kan grubu uyumsuzluğu, diğer hemolitik hastalıklar, yüksek end-tidal karbon monoksit (ETCO) düzeyleri
4. Gestasyon haftasının 35-36 haftalarda olması
5. Fototerapi almış olan kardeş öyküsü
6. Sefal hematoma veya yaygın ekimoz
7. Sadece anne sütü ile beslenmek, özellikle emzirme sorunu varlığında ve fizyolojik düzeylerin üstünde tartı kaybı var ise
8. Doğu Asya ırkı

### Minör Faktörler

1. Taburculuk öncesi total serum veya transkütanöz bilirubin bilirubin seviyelerinin orta-yüksek risk zonunda olması (Şekil 2)
2. 37-38 gestasyon haftalarındaki bebekler
3. Taburculuk öncesi sarılık görülmesi
4. Sarılık olmuş olan kardeş öyküsü
5. Makrozomisi olan diyabetik anne bebeği
6. Anne yaşının 25 ve üzerinde olması
7. Erkek cinsiyet



**Şekil 2: Yenidoğanlarda Postnatal Yaş ve Bilirubin Seviyesine Göre Hiperbilirubinemi Risk Nomogramı [20]**

### 2.3. Yenidoğanda Patolojik İndirekt Hiperbilirubinemi

Fizyolojik sarılık terimi total serum bilirubin (TSB) düzeyi normal sınırlar içinde olan bebekler için kullanılmaktadır. Anne sütü ile beslenmenin bu kadar yaygın olmadığı ve fototerapinin uygulanmadığı dönemde yenidoğanların %95'inde TSB'nin 12,9 mg/dl düzeyinin altında olduğu görülmüş ve bu değer fizyolojik sarılık değeri olarak kabul görmüştür. Ancak günümüzde birçok faktöre göre infantlarda TSB'nin normal kabul edilen değerlerinin değiştiği bilinmektedir. Bu nedenle sarılığın fizyolojik veya patolojik kabul edileceği TSB değeri bebeğin gestasyon haftasına, postnatal yaşına, risk faktörlerine ve bilirubin artış hızına göre değişmektedir [21, 22].

Yenidoğanda indirekt hiperbilirubineminin nedenleri Tablo 1'de verilmektedir. İndirekt hiperbilirubineminin en büyük riski, yüksek bilirubin seviyelerinde meydana gelen nörolojik disfonksiyondur. Çok düşük doğum ağırlıklı

ve hasta bebeklerde nöronal hasar yaratan indirekt bilirubin seviyesi kesin olarak bilinmemektedir [1, 19].



**Tablo 1: Yenidoğanlarda İndirekt Hiperbilirubinemi Nedenleri [19]**

### Artmış Üretim veya Karaciğerde Bilirubin Yükü

#### *Hemolitik Hastalıklar*

- İmmün Kaynaklı
  - Rh alloimmünizasyonu, ABO ve diğer kan grubu uyumsuzlukları
- Kalıtsal
  - Eritrosit membran defektleri: Herediter sferositoz, elliptositoz, piropoikilositoz, stomatositoz
  - Eritrosit enzim eksiklikleri: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği, piruvat kinaz eksikliği ve diğer enzim defektleri
  - Hemoglobinopatiler: Alfa ve beta talasemi
  - Stabil olmayan hemoglobin: Konjenital Heinz Cisimciği hemolitik anemisi

#### *Üretimi Artıran Diğer Nedenler*

- Sepsis
- Disemine intravasküler koagülasyon
- Kan ekstrevasyonu: Pulmoner, abdominal, serebral hematomlar
- Polisistemi
- Makrozomik diyanetik anne bebekleri

#### *Artmış Enterohepatik Dolaşım*

- Anne sütü sarılığı
- Pilor stenozu
- İnce veya kalın bağırsak obstrüksiyonu veya ileus tablosu

### Azalmış Klirens

- Prematürite
- Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği

#### *Metabolizma Bozuklukları*

- Crigler-Najjar sendromları
- Gilbert sendromu
- Galaktozemi
- Tirozinemi
- Hipermetiyoninemi

#### *Metabolik Sorunlar*

- Hipotiroidizm
- Hipopitüitarizm

## **2.4. Yenidoğanlarda Bilirubin Oluşturduğu Nörotoksisite**

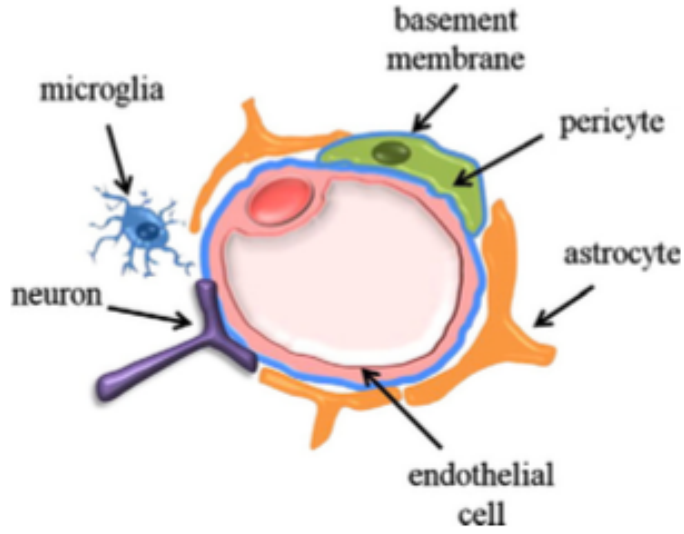
Bilirubin santral sinir sistemini etkileyebilmesi için öncelikle kan beyin bariyerini geçmesi gerekir. İnsanlarda bulunan ana bilirubin izomeri bilirubin-IXa'dır. Farklı konfigürasyonlarda suda çözünürlüğü farklı olan izomer, hidrofobik formu ile oluşan toksik etkilerden sorumludur. Suda çözünen bilirubin izomerinin toksik etkisi bulunmamaktadır. Bilirubin; konjugasyon sonrası, transport için albumine bağlandığında ve ışığa maruziyet sonrası izomerizasyon ile suda çözünür hale gelir [23].

Vücuttaki membranlara karşı lipofilik özelliği olan bilirubin, bu nedenle kan beyin bariyerinden rahatlıkla geçebildiği düşünülür. Ancak indirekt bilirubin normalde albumine bağlı halde bulunur ve albuminin bilirubin affinitesi normal olduğu sürece bilirubin-albumin kompleksinin santral sinir sistemine giremediği farzedilir. Bu nedenle nörotoksisite yaratan serbest indirekt bilirubindir [9].

### **2.4.1. Kan Beyin Bariyeri ve Bilirubin Beyne Geçişi**

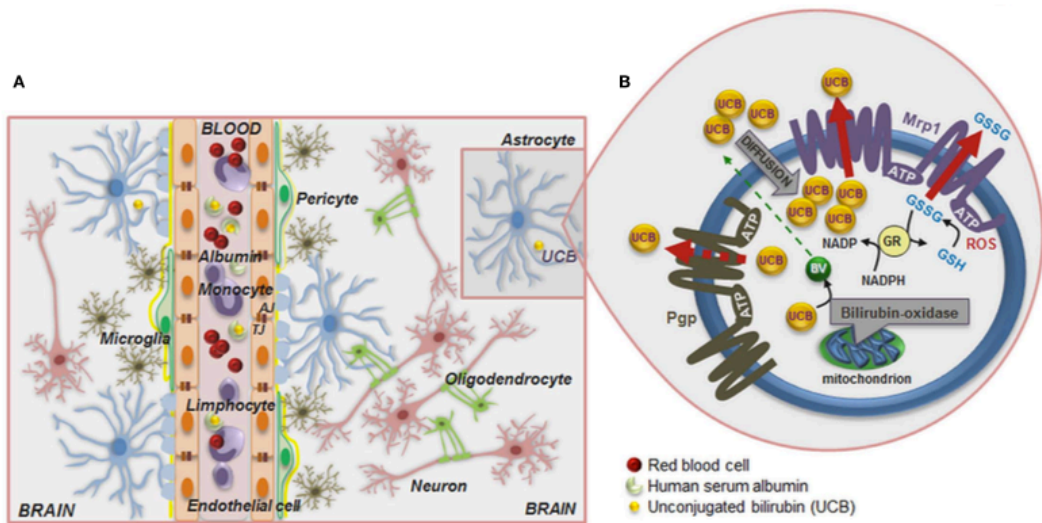
Kan-beyin bariyeri (KBB), beyin ile dolaşım sistemi arasında solüt transportunu sınırlayan; endotelyal hücreler, bazal membran, perisitler, astrositler ve mikroglialar tarafından oluşturulan bir bariyerdir (Şekil 3). KBB'nin fonksiyonları arasında sinir sistemi homeostazını sağlamak, beyni ekstrasellüler çevreden korumak, spesifik transport sistemleri ile besin girişini sağlamak ve lokal çevresel değişikliklere göre inflamatuvar yanıtı sağlamak yer alır [24].

Yaşamın ilk haftasında yükselen konjuge edilmemiş bilirubin belli bir kısmı diffüzyon yolu ile KBB'den geçerek beyne ulaşır. Beyinde biriken bilirubin konsantrasyonu; bilirubin bağlanma kapasitesi düştüğü durumlarda veya KBB geçirgenliğinin arttığı (radyasyon, asfiksi, hiperozmolarite) durumlarda yükselir. Hiperkarbinin ise beyin kan akımını artırarak bilirubin konsantrasyonunu artırdığı düşünülmektedir [25, 26]. İn-vitro ve in-vivo çalışmalarda bilirubine maruziyet süresinin nörotoksisitenin ağırlığına etkisi gösterilmiştir [25, 27].



**Şekil 3: Nörovasküler birim. Endotelyal hücre, bazal membran, astrosit, mikroglia, nöron ve perisit [24]**

Beyne geçmiş olan serbest bilirubin KBB ve serebrospinal sıvıda yüksek konsantrasyonda eksprese olan P-glycoprotein (Pgp) ve multidrug resistance-associated protein 1 (MRP 1) aracılığı ile ATP bağımlı olarak hücre dışına atılır. Böylece bilirubinün hücre içinde birikimi sınırlandırılmış olur (Şekil 4). Yenidoğanlarda Pgp'nin ekspresyonunun düşük olması ve yüksek bilirubin seviyelerine bağlı olarak MRP1'in down regülasyonu, bilirubin atılımını düşürerek toksisiteyi artırır [2, 28].



**Şekil 4: KBB. Pgp ve MRP1 ile bilirubinün hücre dışına atılımı [2]**

Yüksek konjuge edilmemiş bilirubin seviyeleri glutasyon homeostazında yarattığı bozulma ile nitrik oksit (NO) ve sitokin salınımının artmasına yol açarak da KBB bütünlüğünü bozar ve bilirubinin beyne geçişini daha da kolaylaştırır [29]. NO mikrovasküler geçirgenliği artırarak bilirubin geçişine olanak sağlar. Mrp1 ile kontrol edilen glutasyon salınımı ise normalde oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek ve peroksitleri indirgeyerek reaktif oksijen türlerine karşı nöronal hücreleri korur [30, 31].

## **2.4.2. Hücresel ve Moleküler Boyutta Bilirubin Nörotoksitesi**

### **2.4.2.1. Bilirubinin Nöronlar Üzerindeki Toksisitesi**

Otopsilerde konjuge edilmemiş bilirubinin nöronlarda ve glialarda birikerek nöron kaybına, demyelinizasyona ve gliozise yol açtığı görülmüştür. İzole hücre kültürlerinde ise bilirubinin nöronal dallanmayı etkilediği, mikroglia ve astrositlerden pro-inflamatuar sitokin salgılanmasını indüklediği gösterilmiştir. Ancak konjuge edilmemiş bilirubine olan hücresel hassasiyet ve nörotoksitede farklı nöral hücrelerin durumu kesin olarak bilinmemektedir [2].

Çalışmalarda, total serum bilirubin (TSB) düzeyinin pik yaptığı gestasyon haftasının, meydana gelen nöropatolojide önemli yeri olduğu gösterilmiştir [32, 33]. 34 gestasyon haftasının altındaki bebeklerde kernikterus tablosunda işitme kayıpları daha belirgin iken, geç preterm ve term bebeklerde, motor bozuklukların daha ön planda olduğu görülmüştür. Bu nedenle nöronal maturasyonun nörotoksitenin şekli üzerinde önemli bir rolü olduğu düşünülür [34].

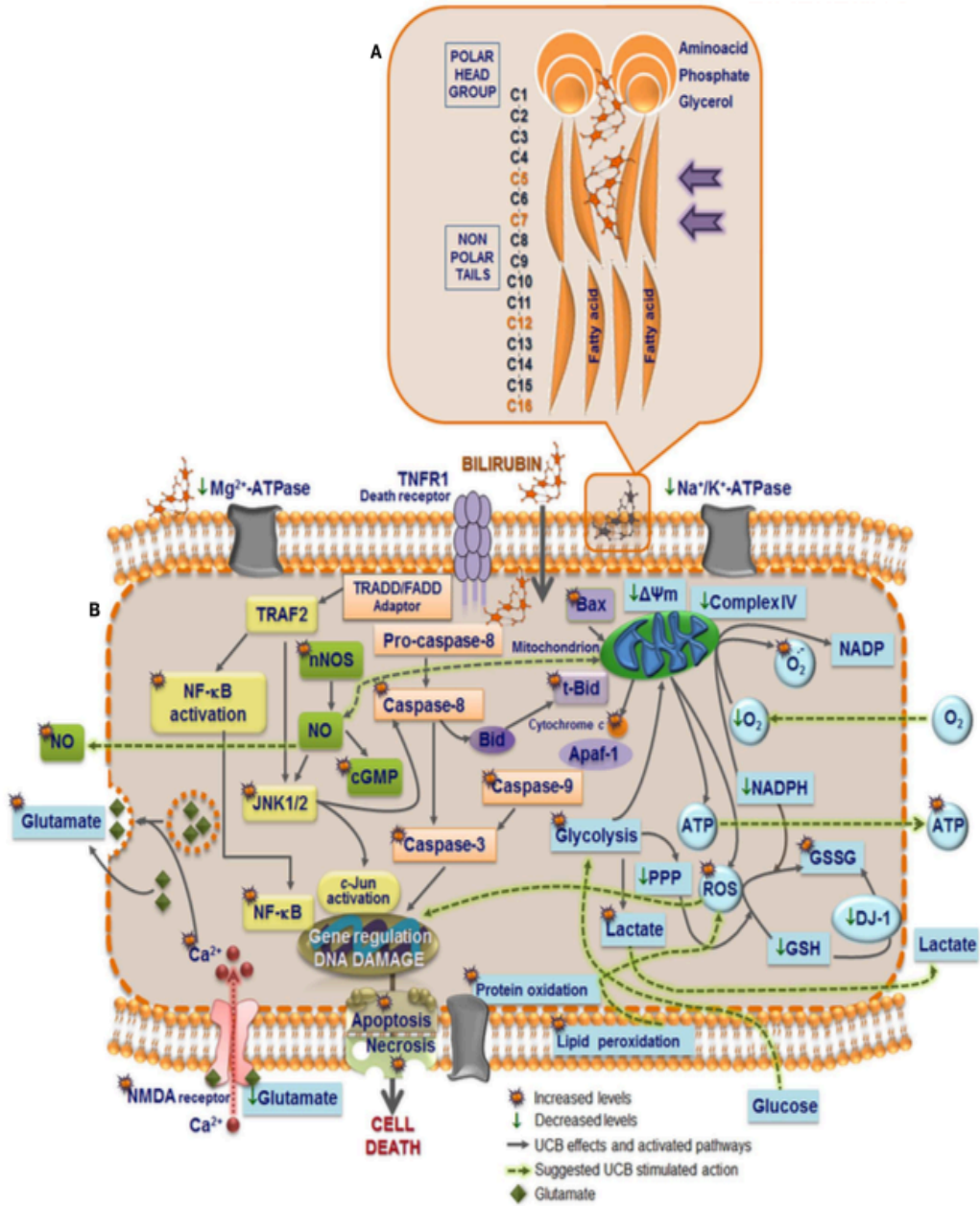
Nöronların, astrositlere kıyasla glutasyon içeriklerinin daha az olması nedeniyle konjuge edilmemiş bilirubinin etkilerine karşı daha hassas oldukları gösterilmiştir [35, 36]. Bilirubin maruziyeti sonrası farklı nöron subgruplarında astrositlere göre daha yüksek protein oksidasyon ve lipid peroksidasyon oranları saptanmıştır [35]. Nörotoksitenin anlaşılmasındaki en zor adımlardan biri hasarın başlama şeklinin, zaman, ağırlık ve yer olarak hücreden hücreye değişip değişmediğinin anlaşılmasıdır [37, 38].

Konjuge edilmemiş bilirubinin hücre ile etkileşimi, daha hücre zarından geçerken başlar. Hücresel membranlardan hızlıca geçebilse de polarite ve akışkanlığı etkilediği ve sonuçta nöronal hücre zarı yapısını bozduğu düşünülmektedir [39]. Benzer etkileri astrositler, eritrositler ve mitokondrial zarların üzerinde de gösterilmiştir [39-41]. Membran üzerindeki değişiklikler sonucu etkilenen elektron transport mekanizmaları, hücre içi kalsiyum seviyelerini artırarak hücre ölümüne yol açabilir (Şekil 5) [2].

Bilirubin hasarına, gelişmekte olan nöronlar normalden daha açıktır ve bu hasar nörogenezin bozulmasına, nöronal atrofiye, nekroz ve apoptoz aracılı hücre ölümüne neden olabilir. Daha uzun dönemde ise ani ve kalıcı nöronal dallanmada ve dendritik sinapslarda azalmaya neden olur. Hücreler sekonder toksik uyarılara daha açık ve duyarlı hale gelmiş olur [42]. Nöronal dallanmadaki değişimlerin bir kısmı, immatür nöronlardaki mikrotübül ilişkili proteinlerin (MAP) etkilenmesine bağlanır. MAP ailesinden olan, mikrotübül yapımında, stabilizasyonunda ve normal nöron morfolojisinin korunmasında önemli rolü olan Tau proteinin ekspresyonu ve yer değişikliği de nöronal dallanmada önem taşır [43]. Tau proteinin serumda yüksek bulunmasının nörodejenerasyon belirteci olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [2].

Bilirubin kaynaklı nöronal apoptoz mekanizmalarında mitokondride şişme, Bax translokasyonu, mitokondride depolarizasyon, sitokrom-c salınımı, kaspaz-3 aktivasyonu ve poli(ADP)-riboz polimeraz yıkımının rol oynadığı düşünülmektedir [44].

İmmatür hücrelerdeki ölümlerin çoğu apoptoz yolu ile meydana gelir ve büyük oranda süperoksit anyon radikal üretiminin artmasına bağlı oksidatif kriz ile indüklenir [45]. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü üzerinden eksitotoksik sinyaller ile kalsiyum yükselmesine bağlı nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS) aktivasyonu görülebilir [46]. Hipokampusun serebellar ve kortikal nöronlara göre NO kaynaklı strese daha açık olmasında bilirubin ile indüklenmiş NOS ekspresyonundaki artışın yeri olduğu düşünülmektedir. Daha da önemlisi bilirubin nedenli işitme kaybındaki sinaptik iletinin bozulmasındaki majör etkenin NO jenerasyonu olduğu düşünülmektedir [47, 48].



Şekil 5: Konjuge edilmemiş bilirubinin nöral hücre zarı ve hücre içi yollar ile etkileşimleri [2]

Hipokampal nöronlarda diğer nöronlara göre belirgin olarak nöronal dinamiklerin bozulmasında glutamat ve oksidatif stresin de rol oynadığı gösterilmiştir [47].

#### 2.4.2.2. Astrositler ve Mikrogliaların Bilirubin Nörotoksitesinde Yeri

Nöronların hayatta kalabilmesi ve fonksiyonlarının korunabilmesi glial hücrelerin varlığına bağlıdır. Özellikle beyin hasarında büyük önem taşıyan bu hücre grubunda oligodendrositler, astrositler ve mikroglialar bulunur. Astrositler ve mikrogliaların kendi arasındaki IL-1 ve ATP aracılı olan iletişimi ise bir çok patolojik durumda hasarın gelişimini ve ağırlığını belirleyen faktörlerden biri haline gelir [49].

Mikroglial aktivasyonda mikroglia ile nöronların arasındaki iletişimin temel nokta olduğu ve aktive edilmiş mikroglialardan salgılanan sitokinlerin hem komşu nöronları hem de astrositleri etkilediği düşünülmektedir [2].

Glial hücrelerin arasında en yoğun olarak astrositler bulunur. Sinapsların çoğunu astrosit süreçleri kılıf şeklinde sarar. Astrositlerin nöronlar üzerine hem nörotoksik hem de nöroprotektif etkileri olabilir. Salınan pro-inflamatuar sitokinler, glutamat, ATP ve serbest radikaller nöron hayatta kalımını azaltabilir ve nörotoksiklere karşı da nöronları açık hale getirebilir. Astrosit fonksiyonlarındaki bozulmanın nöronal disfonksiyonda göz ardı edilemez bir önemi vardır [50].

Çalışmalarda primer hücre kültürlerinde konjuge edilmemiş bilirubinin astrositlerin viabilitesini, morfolojisini ve mitokondrial fonksiyonunu etkilediği görülmüştür [32, 51]. Aynı zamanda hipoksi ve oksijen-glukoz yoksunluğunun da astrositleri bilirubin hasarına karşı daha duyarlı hale getirerek nörotoksitede rol oynadıkları düşünülmektedir [52].

Mikroglialar nörojenez, lezyon sonrası doku onarımı ve “sinaptik soyulmada” rol oynarlar. Aynı zamanda doku homeostazının temelinde mikroglia tarafından yapılan doku fagositozu yer alır [53, 54]. Ancak aşırı aktive olmalarının nörotoksik sonuçları olabilir. Bilirubin maruziyetinde astrositlerde olduğu gibi mikroglialarda da mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolları ve nükleer faktör kappa-B (NF- $\kappa$ B) sinyal yolları üzerinden pro-inflamatuar sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) salgılanır [53, 55]. Aynı şekilde bilirubin hasarında glutamat ve NO salınımı da artarak belli düzeye geldiklerinde nörotoksik hale gelirler [56, 57].

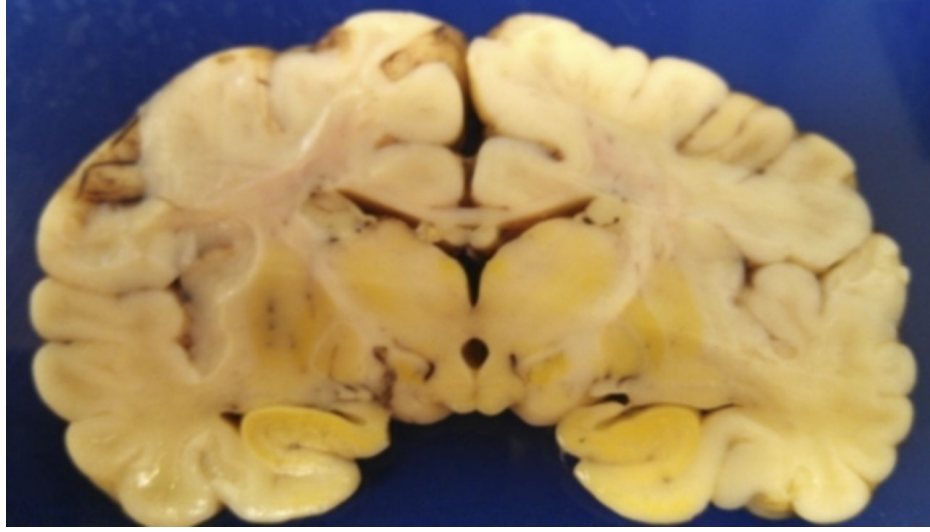
Yapılan çalışmalarda konjuge edilmemiş bilirubinin bir başka etkilediği hücre grubunun da oligodendrositler olduğu görülmüştür[58]. Mekanizmalar çok iyi

bilinmemekle birlikte bilirubin oligodendrosit prekürsör hücreleri etkileyerek oligodendrosit matürasyonunu bozduğu ve sonuçta myelinojenezisi bozduğu düşünülmektedir[58, 59].

### **2.4.3. Bilirubin İndüklediği Nörolojik Disfonksiyon (BIND), Akut Bilirubin Ensefalopatisi ve Kernikterus**

Ağır indirekt hiperbilirubinemi sonrasında gelişen ve kronik süreçte koeroatetotik serebral palsi, işitme kaybı, yukarı bakış paralizi ve bazen de zihinsel engel ile karakterize olan tabloya kernikterus adı verilir. Beyin dokularının sarıya boyanmasına atfen Yunanca “çekirdek sarılığı” (Şekil 6, [60]) anlamına gelen bu terim ilk kez 1900’lü yılların başında kullanılmıştır [61]. Makroskopik olarak etkilenen bölgelerin başında globus pallidus, hipokampus, lateral ventrikül duvarları, serebellum ve subtalamik nukleus gelir [2]. Kernikterus günümüzde ağır hiperbilirubinemi sonrasında uzun dönemde ortaya çıkan kronik tabloyu tarif etmek için kullanılırken, ağır yenidoğan sarılığı sonrasındaki akut ensefalopatik tablo akut bilirubin ensefalopatisi olarak adlandırılır. Bilirubin indüklediği nörolojik disfonksiyon (BIND) ise beyin hasarının daha hafif formlarından komaya uzanan bir spektrumda bilirubin neden olduğu tüm nörolojik hasarı tarif etmek kullanılır [4, 10].

Günümüzde hem prognoz öngörüsü hem de tedaviye yönelik standardizasyon amacıyla yenidoğan sarılığı gelişmiş olan bebeklere BIND skoru [62, 63] uygulanmaktadır (Tablo 2).



**Şekil 6: Kernikterus. Koroner kesitte bilirubin ile sarıya boyanan bazal ganglia ve korteks [60]**

**Tablo 2: BIND Skorlaması**

KLİNİK	1 PUAN	2 PUAN	3 PUAN
Mental durum	Uyuklama, emmede zayıflık	Letarji, İritabilite	Semikoma konvulziyon.
Kas tonusu	Hafif azalmış	Hiper/hipotoni, hafif kemer pozisyonu	Belirgin azalma/artma, opistotonus, bisiklet hareketi
Ağlama	Yüksek sesli	Tiz sesli/ seyrek ağlama	Durdurulamayan/ sadece uyararla ağlama

**BIND skorlaması :**

**1-3 Puan:** Minimal ensefalopati belirtileri

**4-6 Puan:** Progresif ancak reversibl ensefalopati belirtileri

**7-9 Puan:** İleri, çoğunlukla irreversible ensefalopati belirtileri

Akut bilirubin ensefalopatisinde (ABE) ilk ortaya çıkan bulgular emmede azalma, letarji, uykuya meyil, hafif hipotoni ve hafif tiz sesli ağlamadır. İlerleyen süreçte iritabilite, değişken tonus (çoğunlukla artmış tonus), emmede belirgin gerileme, tiz sesli ağlama ve bir kısmında retrokollis ve opistotonus gelişebilir. Bu evrede acil kan değişimi ile nörolojik fonksiyonda düzelme olduğu bildirilmiş vakalar bulunmaktadır [64]. ABE'nin ileri evresinde ise bebekte ağır stupor, koma, artmış tonus, retrokollis, opistotonus, emmeme ve çok tiz sesli ağlama görülebilir [10, 19]. İlerlemiş evrede bebeklerin tama yakınında, santral sinir sistemi hasarı geri döndürülemez [10].

Kernikterus tablosu oturduktan sonra ileri yaşlarda, çocuklarda ekstrapiramidal bozukluklar, özellikle atetoz, bakış anomalileri, özellikle yukarı bakış paralizisi, işitme bozuklukları, özellikle sensörinöral işitme kaybı, zihinsel bozukluklar ve mental retardasyon görülebilir [19].

Gelişmiş ülkelerde ve fototerapinin yaygın uygulamaya geçmesi sonrasında, kernikterusun en önemli nedenlerinden olan Rh immünizasyonunun gebelikte profilaksi ile azaltılabilmesi sayesinde, kernikterus vakalarında belirgin düşüş görülmüştür. Ancak son yıllarda bildirilen kernikterus vakalarında artış gözlenmiştir [4, 6]. Bu artışın vaka bildirimlerinin daha kontrollü yapılıyor olması ile ilgisi halen tartışılmakta olsa da, doğum sonrası erken taburculuk, anne sütünün öneminin anlaşılması ile yaşamın ilk günlerinde formüle ile beslenmenin azaltılmasının özellikle term sağlıklı bebeklerde görülen ağır hiperbilirubinemilerde rolü olduğu düşünülmektedir [4, 6, 19].

Günümüzde kernikterusun kesin insidansı bilinmemektedir. 35 gestasyon haftası üzerindeki bebeklerin yaklaşık olarak 1/650-1000'inde serum bilirubin değerlerinin >25 mg/dL, yaklaşık 1/10000'inde ise >30 mg/dL ye ulaşabildiği düşünülmektedir [6]. Ancak bu demografik veriler birçok faktöre göre, özellikle bulunulan ülkenin gelişmişlik düzeyine göre değişebilmektedir. Özellikle tıbbi yardımın geç gelebildiği veya tıbbi cihaza ulaşılamayan ülkeler ve savaş bölgelerinde ABE ve ABE kaynaklı mortalite oranları çarpıcı olarak yüksektir [4, 14].

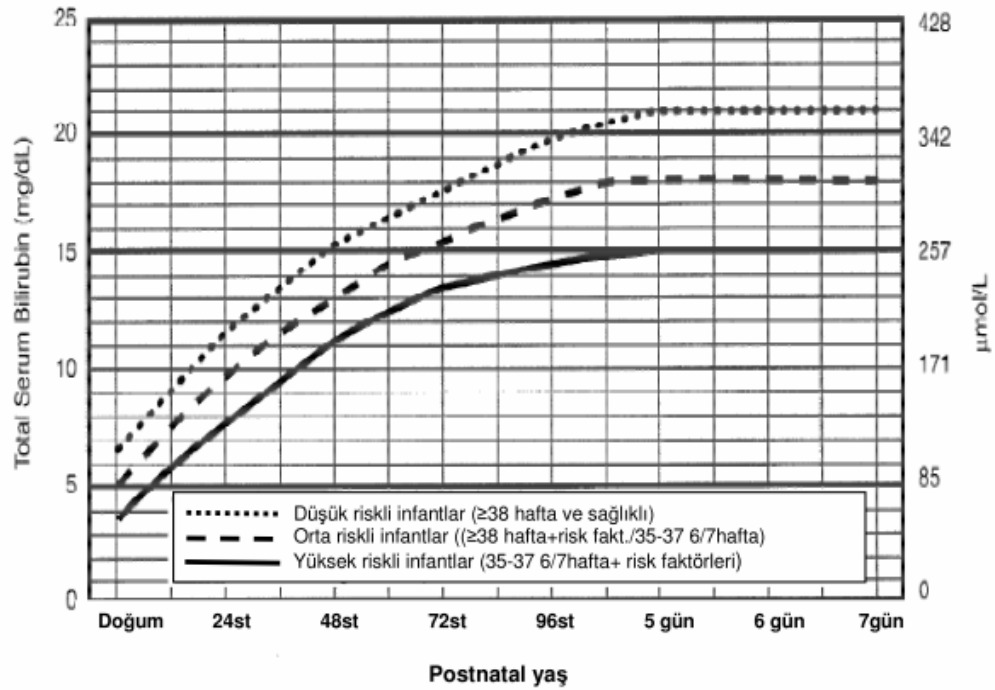
## 2.5. Yenidoğanlarda İndirekt Hiperbilirubinemi Tedavisi

İndirekt hiperbilirubineminin acil ve doğru tedavisi ağır sarılığı olan bebeklerin hayatta kalması ve morbiditenin engellenmesi açısından büyük öneme sahiptir. Günümüzde 3 ana tedavi şekli mevcuttur: 1) Bilirubin vücuttan atılımını kolaylaştıran izomerlere dönüştüren fototerapi 2) Bilirubin direkt olarak vücuttan uzaklaşmasını sağlayan kan değişimi 3) Bilirubin üretimini azaltan, normal bilirubin metabolik yollarını hızlandıran veya enterohepatik dolaşımı engelleyen farmakolojik ajanlar. Ancak bu tedavilerin hepsi yüksek bilirubin yükünü azaltmaya yönelik olup primer olarak bilirubin hücresel düzeydeki toksisitesinde etkin değildir. Fototerapi ve kan değişimi endikasyonları, Amerikan Pediatri Akademisi (AAP) tarafından yayınlanmış kılavuzlarda belirtilmiştir (Şekil 7-8) [10].

### 2.5.1. Fototerapi

Fototerapinin çalışma prensibi, ciltte ve subkutan dokuda bulunan bilirubin fotonları absorbe ederek daha polar, suda daha rahat çözünen ve safra yolu ile bağırsaktan ve ufak bir kısmı da böbrekten atılabilen foto-izomerlere dönüşmesidir [65]. Doz-bağımlı bir tedavi olan fototerapide ışık kaynağının tipi, bebeğin ışık kaynağına olan uzaklığı ve ışığa maruz kalan vücut yüzey alanı tedavinin etkinliğini belirler [10]. Bilirubin ve cildin optik özellikleri göz önüne alındığında, en etkili dalga boylarının 425-490 nm spektrumunda (mavi-yeşil spektrum) olduğu bilinmektedir [66].

Fototerapinin sürekli mi yoksa aralıklarla mı uygulanması gerektiği konusunda kesin bir öneri yoktur ancak TSB düzeyinde anlamlı düşüş sağlanıncaya kadar yoğun ve devamlı verilmesi yaygın olarak kabul görmektedir [10, 66]. Tedavide amaç, total serum bilirubin (TSB) düzeylerini kan değişimi gerektirecek seviyelere ulaşmadan düşürebilmektir [10]. Fototerapi etkinliği kanıtlanmış, saptanmış önemli yan etkileri olmayan bir tedavi yöntemidir [1].



**Şekil 7. Gestasyon haftası 35 ve üzeri bebeklerde fototerapi endikasyonları [10]**

Fototerapi çizelgesi risk faktörleri, izoimmün hemolitik hastalık, G6PD eksikliği, asfiksi, belirgin letarji, ısı düzensizliği, sepsis, asidoz, albumin <3 g/dL olması olarak belirtilmiştir

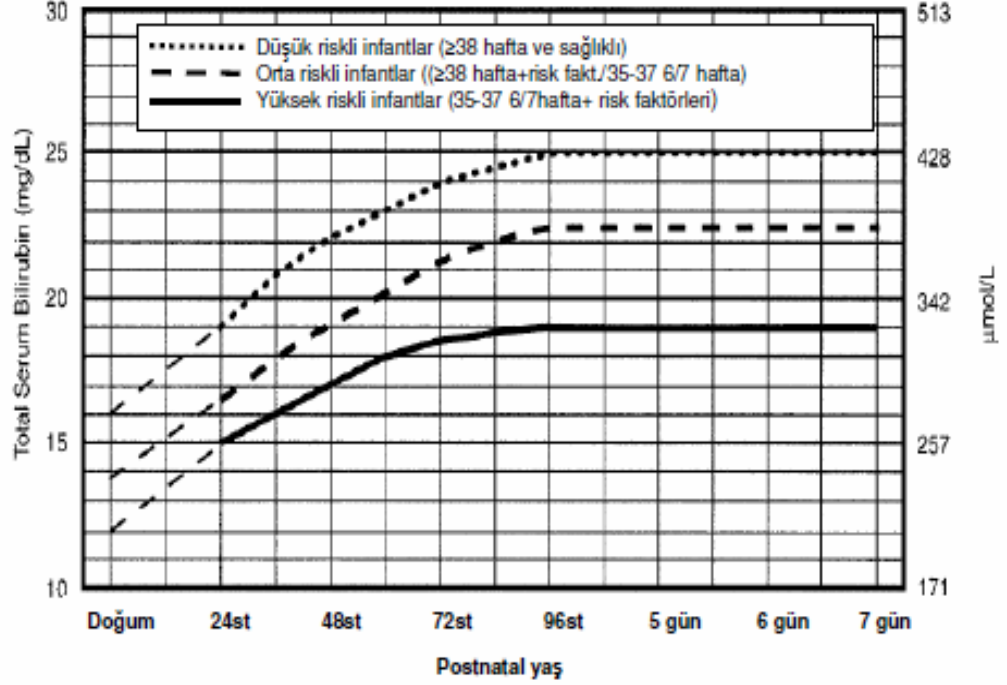
### 2.5.2. Kan Değişimi

Kan değişimi, bilirubin düzeyleri ile beraber maternal antikorları ve diğer toksik maddeleri uzaklaştıran, anemiye düzelen bir tedavi yöntemidir [67]. Postnatal saat esas alınarak yaşa göre kan değişimi için önerilen TSB seviyeleri, AAP tarafından bildirilmiştir (Şekil 8) [10].

Düşük gestasyon haftasındaki ve hasta infantlarda fototerapi ve kan değişimi için daha düşük TSB değerlerinin kabul edilebilmesinin nedeni, bu durumlarda kernikterus riskinin normalde beklenenden daha düşük TSB seviyelerinde mevcut olmasıdır. Bu durumlarda tedavi kararı verirken bebeklerin klinik durumu, gestasyon haftası ve doğum ağırlığı göz önünde bulundurulmalıdır [68-70].

Kan değişimi yapılmadan önce göz önünde bulundurulması gereken risk faktörlerinden biri de bilirubin/albumin oranıdır [19]. Albumine bağlanmış olan bilirubinin KBB'den geçemeyeceği varsayımı ile, albumin serum seviyelerinin düşük olması kernikterus için başlı başına risk oluşturur. AAP tarafından kan değişimi

açısından değerlendirme yapılırken dikkat edilmesi gereken bilirubin/albumin oranları da belirlenmiştir (Tablo 3) [10].



**Şekil 8. Gestasyon haftası 35 ve üzeri bebekler için kan değişimi endikasyonları [10]**

Kan değişimi çizelgesi risk faktörleri, İzimmün hemolitik hastalık, G6PD eksikliği, asfiksi, belirgin letarji, ısı düzensizliği, sepsis, asidoz, albumin <3 g/dL olması olarak belirtilmiştir.

Kan değişimi sonrasında dokulardaki bilirubinin plazmadaki bilirubin ile dengelenmesi sonucu TSB'nin değişim öncesi değerinin %60'ı kadarına düşmesi beklenir [67].

**Tablo 3. Kan Değişimi İçin Bilirubin/Albumin Oranları**

<b>Risk Kategorisi</b>	<b>Kan Değişimi Düşünülmesi gereken Bilirubin/Albumin Oranları (TSB mg/dL, Alb g/dL)</b>
≥38 0/7 hafta infantlar	8.0
35 0/7-36 6/7 hafta ve sağlıklı veya ≥38 0/7 hafta ve yüksek riskli veya izoimmün hemolitik hastalığı veya G6PD eksikliği olan infantlar	7.2
35 0/7-37 6/7 hafta ve yüksek riskli veya izoimmün hemolitik hastalık veya G6PD eksikliği olan infantlar	6.8

### **2.5.3. Farmakolojik Tedaviler**

İndirekt hiperbilirubinemi tedavisinde denenmiş farmakolojik ajanlar, intravenöz immünglobulin (IVIG), fenobarbital, ursodeoksikolik asit ve metalloporfirinlerdir.

#### **2.5.3.1. İntravenöz İmmünglobulin**

Günümüzde kanıta dayalı etkinliği tartışmalı olmakla birlikte intravenöz immünglobulin (IVIG), yenidoğanın hemolitik hastalığında kullanılmaktadır [71]. Kesin mekanizma bilinmemekle birlikte, IVIG'in anti-D ile duyarlanmış neonatal eritrositler ile yarışarak anti-D antikorlarının Fc reseptör alanlarına tutunduğu ve böylelikle ileri hemolizi ve hemoliz kaynaklı indirekt hiperbilirubinemiye engellediği düşünülmektedir [72].

Kanıt düzeyinin yüksekliği için henüz gerekli sayıda araştırma bulunmasa da yapılan çalışmalarda yenidoğanın hemolitik hastalığında IVIG kullanımı ile kan değişimi gereksiniminde azalma olduğu gösterilmiştir [71, 73].

### **2.5.3.2. Fenobarbital**

Fenobarbital hem karaciğerde mikrozomal enzim indüksiyonu yaparak bilirubin konjugasyonunu artırır hem de bilirubinin karaciğere alınmasını ve safra atılımını artırır. Ancak yan etkileri nedeniyle günümüzde yenidoğan sarılığında kullanılmamaktadır [74].

### **2.5.3.3. Ursodeoksikolik Asit**

Ursodeoksikolik asit safra atılımını artırarak serum bilirubin düzeylerinin düşmesine yardımcı olur [19].

### **2.5.3.4 Metalloporfirinler**

Metalloporfirinler, hem katabolizmasında hız kısıtlayıcı enzim olan hem oksijenazı inhibe eden hem-analoglarıdır. Hem yıkımını durdurarak bilirubin oluşumunu engeller ve yenidoğanın indirekt hiperbilirubinemisinde bilirubin üretimini azaltırlar. Bu konudaki meta-analizde, metalloporfirin kullanımının fototerapi ihtiyacını ve hastanede yatış süresini azalttığı saptanmıştır [75, 76]. Ancak kernikterus riskini ve bilirubin ensefalopatisine bağlı nöro-gelişimsel bozuklukları engellediğine dair yeterli kanıt bulunmamaktadır. Aynı şekilde kütanöz ışık duyarlılığını artırıp artırmadığına dair de kesin bir sonuca ulaşılammıştır. Bu nedenlerle yenidoğan sarılığı rutin tedavisinde henüz yerini almamıştır [76].

## **2.6. Yenidoğanlarda Hipotermi Tedavisi Uygulamaları**

### **2.6.1. Hipoksik İskemik Ensefalopati**

Gelişmiş ülkelerde peripartum asfiksi, 1000 canlı doğumdan 3-5'ini etkilemekte ve 0,5-1'inde orta veya ağır hipoksik iskemik ensefalopatiye (HIE) neden olmaktadır [77]. Etkilenen infantların %10-60'ı hayatını kaybederken, hayatta kalanların en az %25'inde nöro-gelişimsel sekel kalmaktadır [78].

Hipoksik-iskemik beyin hasarında, yaşanan hipoksi ve iskeminin ağırlığı, şekli, süresi, bebeğin gestasyonel yaşı ve metabolik durumu, oluşan nöropatolojiyi

belirleyen ana faktörlerdir [79]. Klinik ve deneysel çalışmalara göre geçici hipoksik-iskemik hasar sonrası nöronal ölüm, iki aşamada meydana gelmektedir. Eğer hipoksi ağır ise, olay anında hücrel hipoksi ile hücrelerin enerji depolarının tükenmesi sonucu primer nöronal ölüm gerçekleşir. Bu olaydan en az 6 saat sonrasında ise ikinci faz olan sekonder nöronal ölüm meydana gelir [80]. Gecikmiş nöronal ölümden rol oynayan mekanizmalar ise hiperemi, sitotoksik ödem, mitokondrial bozukluklar, eksitotoksinlerin birikimi, gelişimsel apoptoz, NO sentezi, serbest radikal hasarı ve aktive olmuş mikroglialın sitotoksik etkileridir [79].

Erken ve gecikmiş nöronal hücre ölüm fazları arasındaki pencerede, HİE gelişmiş olan bebeklerde hipotermi'nin nöroprotektif olduğu 2007 Cochrane meta-analizinde gösterilmiştir [11]. Analizde toplamda 8 ayrı çalışmada 638 orta-ağır ensefalopatisi ve intrapartum asfiksisi olan term bebeğin verileri değerlendirilmiştir. Değerlendirmeye alınan çalışmalarda dış kulak yolunda sıcaklık 33-33,5°C olacak şekilde baş soğutma [81]; rektal sıcaklık 32,5-33,5°C olacak şekilde tüm vücut soğutma [82]; rektal sıcaklık 34-35°C olacak şekilde baş soğutma [83]; rektal sıcaklık 34,5-35,4°C olacak şekilde baş soğutma [84]; rektal sıcaklık 33,5-34,5°C olacak şekilde baş soğutma [85]; rektal sıcaklık 34-35°C olacak şekilde baş soğutma [86]; özefageal sıcaklık 34,5°C olacak şekilde tüm vücut soğutma [87] ve özefageal sıcaklık 33-34°C olacak şekilde tüm vücut soğutma yapılmıştır [88]. Soğutmanın sağ kalanlarda majör engel oranını artırmadan mortaliteyi düşürdüğü saptanmıştır. HİE geçirmiş bebeklerin soğutma tedavisi uygulananlarında 18. ayda, uygulanmayan gruba göre nörolojik disfonksiyonun daha iyi olduğu görülmüştür. Günümüzde serebral soğutma HİE'de uzun dönemde nöro-gelişimsel prognozu olumlu etkilediği kanıtlanmış tek tedavi yöntemidir. Ancak soğutma şekli, soğutma süresi ve derecesi ile ilgili ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir [11].

Shankaran ve ark.'nın, HİE'de daha derin ve daha uzun soğutma ile ilgili yaptığı randomize klinik çalışma hasta güvenliği açısından bitmeden sonlandırılmıştır. Ancak elde ettikleri verilerde derin hipotermi'nin (32°C) veya uzun süreli hipotermi'nin (120 saat) mortalite açısından olumlu etkileri olmadığı saptanmıştır. Uzun soğutma, aritmi, anüri ve daha uzun hastane yatışı ile ilişkilendirilirken; derin soğutma, daha sık NO ve ekstrakorporeal membran

oksijenizasyonu (ECMO) kullanımı, daha uzun süre oksijen ihtiyacı ve daha sık bradikardi ile ilişkilendirilmiştir [89].

### **2.6.2. Diğer Endikasyonlar ile Hipotermi Uygulamaları:**

Hipotermi erişkinlerde miyokardial infarkt, organ transplantı, kardiyopulmoner bypass, spinal kord hasarı ve intestinal iskemide yapılmış olan küçük sayılı klinik çalışmalarda hücre koruyucu etkisi gösterilmiştir [90]. Erişkinde “inme” de bakılan nöroprotektivitesi ise meta-analizde anlamlı bulunmamıştır ancak bu durum çalışmaların boyutuna ve sayıdaki azlığa bağlanmıştır [91].

Yenidoğanlarda ise hipotermimin, HİE’de belirlenmiş olan kriterlerin dışındaki infantlarda ve diğer endikasyonlarda kullanımı ile ilgili çalışmalar söz konusu olmuştur [92, 93].

Term ve erken term bebeklerde serebral palsinin en sık nedeni perinatal arterial iskemik inmedir ve sıklık neredeyse erişkinlerdeki büyük damar iskemik inmesi insidansına yaklaşmaktadır [94]. İskemide soğutmanın etkilerine bakılan hayvan çalışmalarının meta-analizinde hipotermimin iskemik lezyonu belirgin şekilde küçülttüğü gösterilmiştir [95]. HİE nedeniyle serebral soğutma uygulanmış infantların da içine alındığı bir çalışmada, perinatal inme varlığında soğutma uygulanmış grupta uygulanmamış gruba göre nöbet geçirme sıklığında azalma olduğu gösterilmiştir [96].

Kardiyak arrest sonrası hipotermimin koruyucu etkileri erişkin hastalarda yapılan randomize klinik çalışmalar ile kanıtlanmış ve rutin klinik uygulamada kullanılmaya başlanmıştır [97]. Moler ve ark., pediatrik hasta grubunda (postnatal 48 saat-18 yaş) kardiyak arrest sonrası soğutma ile ilgili 2009 yılında çok merkezli randomize klinik pilot çalışmaları başlatmışlardır. Ümit verici sonuçlar görülmekle birlikte henüz yapılan çalışmalarda terapötik hipotermimin pediatrik pratiğe girmesini sağlayacak kanıt düzeyinde veri bulunmamaktadır [98].

İntestinal iskemi oluşturulmuş hayvan modeli kullanılan bir çalışmada hipotermimin intestinal hasarı ve mortaliteyi azalttığı görülmüştür [99]. Son yıllarda yapılmış olan, 15 ileri evre nekrotizan enterekolit (NEK) ve çoklu organ yetmezliği olan bebeğe hafif ve orta hipotermi uygulanan pilot klinik çalışmada ise hipotermiye

bağlı majör bir yan etki görülmemiştir [100]. Soğutma, NEK'te araştırılması gereken tedavi yöntemleri arasındadır [90].

### **2.6.3. Hipotermi ve Nöron Koruyucu Etkileri**

Hipoterminin nöron koruyucu etki oluşturma mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte birden fazla metabolik yolağı etkilediğı düşünölmektedir. Apoptoz aracılı hücre ölümlünde nöron sağ kalımını artırdığı gösterilmiştir [13]. Hipoterminin serebral metabolik hızı, eksitatuvar amino asit (glutamat, dopamin) salınımını, NO ve serbest radikal üretimini azaltarak nöroprotektif etki gösterdiği saptanmıştır [12]. Aynı zamanda inflamasyonu, ekstrinsik hücre ölüm yolaklarını ve anormal glutamat reseptör aktivitesini baskılayarak da hücre ölümlerini azalttığı gösterilmiştir (Tablo 4) [101].

İskemi sonrası reperfüzyon tedavisinde hipoterminin yerini araştıran bir hayvan çalışmasında, hipoterminin KBB bütönlüğünün korunmasına da olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir [102]. Yenidoğan ratlar üzerinde yapılan başka bir hayvan deneyinde hipoterminin nörojenezisi artırdığı ve apoptozu engelleme mekanizmalarından birinin Bcl-2 yoluyla olduğu anlaşılmıştır (Tablo 4) [103].

**Tablo 4. Hipoterminin Potansiyel Nöron Koruyucu Mekanizmaları [101]**

<b>Hasar Mekanizması</b>	<b>Terapötik Hipotermi ile İlişkisi</b>
Anoksik depolarizasyon	Kısıtlı. Hipoksi-iskemi (HI) anında soğutma ile alakalı, örn., kardiyak cerrahi.
Reaktif oksijen radikallerinin birikimi	Kısıtlı. HI anında etkili. Geç soğutma ile ilişkisi konusunda az kanıt mevcut.
KBB yıkımının engellenmesi	Kısıtlı. KBB yıkımını engellediği gösterilmekte ancak etki geç meydana gelmekte.
Programlı hücre ölümü	Güçlü. Kaspaz-3, hipoksi-ilişkili protein sentezini, mitokondrial geçirgenliği, intrinsik ve ekstrinsik ölüm yollarını etkilediği bilinmektedir.
Sekonder inflamasyon	Güçlü. Mikroglial aktivasyonu, inflamatuvar sitokin ve diğer nörotoksin salınımlarını baskılamakta.
Anormal glutamat reseptör aktivasyonu	Orta. Reseptör aktivitesini etkilediği bilinmektedir ancak yeterli klinik çalışma mevcut değil
Serebral hiperperfüzyon	Düşük ihtimal. Serebral hipoperfüzyon evresini uzatmakta.
Sitotoksik ödem	Düşük ihtimal. Gecikmiş hücrel ödemi azaltmakta ancak nöron koruyucu etkisi ile ilişkilendirilememekte.
Büyüme faktörlerinin indüklenmesi	Kısıtlı. Bazı büyüme faktörlerini artırdığı bilinmektedir ancak nöron koruyucu etki ile ilişkilendirilememekte.
Elektrografik nöbetler	Kısıtlı. Yeterli destekleyici veri bulunmamakta.

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Deney Planı**

Deneyde 4 ana ısı grubunun, 37°C, 34°C, 32°C ve 29°C, karşılaştırılması planlandı. Her grup için 2 adet bilirubin eklenecek, 1 adet sham , 1 adet kontrol olacak şekilde 4 petri olmasına karar verildi. Nöral hücrelerde normotermik ortamda %50 ölüme neden olan bilirubin dozunun bulunması için artan dozlarda bilirubin eklenen deneyler için kontrol grubu dahil 4 petri yapılması planlandı. Her deneyin 3 kez tekrar edilmesi kararlaştırıldı. Bir yenidoğan fareden izole edilen hipokampuslerden 4 adet petriye kültür yapılması planlandı. Sonuç olarak çalışmada toplam 15 adet Balb-c yenidoğan fare (Postnatal 0-1. gün) kullanıldı. Bu çalışma, İstanbul Medipol Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 15.06.2015 tarihindeki 45 No'lu karar ile onay alındıktan sonra İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları (REMER) Laboratuvarı'nda yapıldı.

##### **3.1.1. Genel Deney Planı**

1. Toz konjuge edilmemiş bilirubinin saflaştırılması.
2. Yenidoğan farelerden diseksiyon ile hipokampus elde edilmesi.
3. Hipokampus primer nöron hücre kültürlerinin elde edilmesi
4. Bilirubin stok solüsyonu hazırlanması ve hücre kültürlerine artan dozlarda uygulanarak, normotermik ortamda %50 mortaliteye neden olan bilirubin dozunun saptanması.
5. Saptanan dozda bilirubinin, hazırlanmış olan in vitro 3. Günündeki (DIV3) hücre kültürlerine uygulanması ve kültürlerde bilirubin nörotoksitesisi oluşturulması.
6. Bilirubine maruz kalmış kültürlerin ve bilirubin uygulanmamış kontrol grubu kültürlerin, normotermik, hafif, orta ve ağır hipotermik ortamlarda 24 saat inkübe edilmesi.

7. 24 saat inkübasyon sonrası normotermik ve hipotermik hücre kültürlerindeki hücre sağ kalımının, apoptoz ve nekroz oranlarının konfokal mikroskop incelemesi, PI ve JC-1 boyamaları ile değerlendirilmesi ve karşılaştırılması
8. Hipoterminin geç etkilerini görebilmek amacıyla deney gruplarının in vitro 7. Günde (DIV7) tekrar incelenmesi.

### **3.2. Bilirubin Hazırlanması**

#### **3.2.1. Bilirubin Saflaştırılması**

Kimyasal firmasından alınmış olan toz, konjuge edilmemiş bilirubin (Sigma Aldrich, B4126) öncelikle McDonagh ve Assisi [104] metodu ile saflaştırıldı. Tüm deney ışıktan korunarak yapıldı.

1. 500 mg bilirubin, 500 ml kloroform ile karıştırılarak kaynayanaya kadar ısıtıldı ve sonrasında oda ısısına kadar soğutulmaya bırakıldı.
2. Solüt de içeren solüsyon, 500 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> solüsyonu ile (5x100ml) ile yıkandı ve ekstraksiyon yapıldı.
3. Elde edilen solüsyon anhidroz NaSO<sub>4</sub> yavaş yavaş eklenerek kurutuldu ve filtrelendi.
4. Solüsyon kloroformun yaklaşık ½'si uçana kadar kaynatıldı.
5. Kaynayan solüsyona ufak miktarlarda metanol kristalize olana kadar eklendi.
6. Oda sıcaklığına soğuduktan sonra preparat metanol ile yıkandı ve azot ile kurutularak elde edilen saf bilirubin alikotlanarak ve ışıktan korunarak -20°C'de saklandı.

#### **3.2.2. Bilirubin Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Albumin ile Kullanılması**

Saflaştırılmış bilirubin kullanılmadan hemen önce 0,1 M NaOH ile 10 mM konsantrasyonunda olacak şekilde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Solüsyon yoğun hazırlanarak kültürler eklenecek miktarın azaltılabilmesi amaçlandı. Kültürlere eklenmeden önce 1:1 molarite oranında insan serum albumini (Sigma Aldrich, A1887) (Fraksiyon V, yağ asitsiz) ile karıştırıldı. Albumin ile bağlanması

sağlanarak yüksek konjuge edilmemiş bilirubin oligomerleri ve hatta presipitatları oluşması nedeniyle hücre zarlarının etkilenmesinin engellenmesi amaçlandı. Bilirubin/albumin oranı ise çalışmamızda ağır indirekt hiperbilirubinemi araştırılması amaçlandığından 1:1 olarak ayarlandı. Literatürdeki çalışmalarda, hafif-orta hiperbilirubinemi modellerinde 1:2 oranı kullanılırken ağır hiperbilirubinemi tablosunda fizyolojiye uygun olarak albumin oranı daha düşük kullanıldı [57, 105, 106]. Kültürlere bilirubin eklendikten sonra ortam pH'nın 7,4 civarında tutulmasına özen gösterildi. Çalışmaların hepsi, fotodegradasyonu engellemek amacıyla minimal ışıklı ortamda yapıldı.

### **3.3. Nöron Hücre Kültürlerinin Oluşturulması**

#### **3.3.1. Petrilerin Kaplanması**

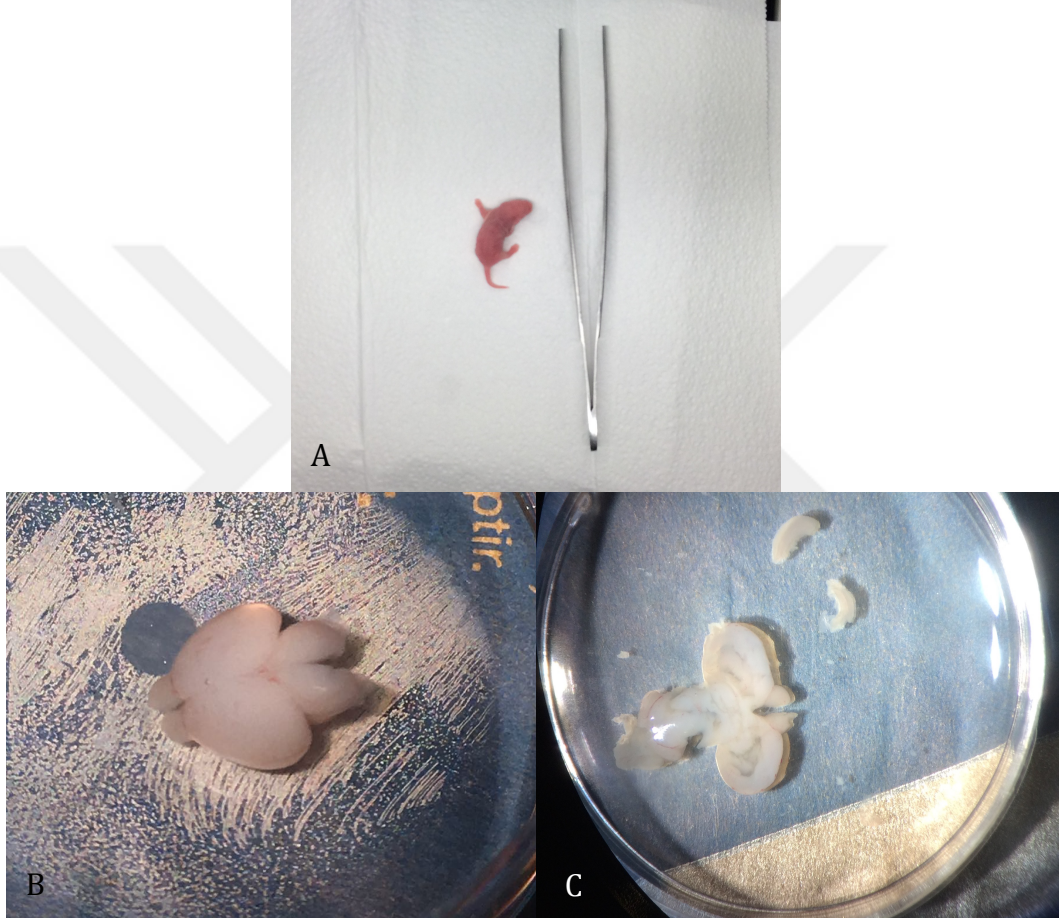
Hücrelerin in vitro ortamda canlılıklarını uzun süre koruyabilmeleri ve bir yüzeye tutunabilmeleri için petrilerin kaplanması gerekir. Petriler öncelikle elektrostatik özelliği sayesinde hücrelerin yapışmasını sağlayan %10 poly-L-lizin ile kaplanarak oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Sonrasında steril distile su ile yıkandı.

#### **3.3.2. Diseksiyon**

Diseksiyon besiyeri olarak Hibernate-A (Gibco, A1247501) kullanıldı. Hibernate-A, birçok hücre kültüründe kullanılan zenginleştirilmiş bir besi ortamıdır. Hibernate-A, içerisine %1 oranında glutamin ve aynı oranda antibiyotik-antimikotik solüsyonunun aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Diseksiyon süresince besiyeri soğuk olarak kullanıldı. Postnatal 0. günündeki Balb-c fareler dekapite edildi ve beyinleri hazırlanmış Hibernate-A üzerinde diseke edilerek hipokampus dokuları mikroskop altında izole edildi (Şekil 9). Hipokampus dokusunun daha önce yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere bilirubine olan hassasiyeti nedeniyle deneylerimizde özellikle hipokampus nöron kültürleri kullanıldı [47].

### 3.3.3. Kültür ve Hücre Yaşam Besiyeri

İzole edilen hipokampus dokuları L-15 (Sigma Aldrich, L5520) atmosfere uyumlu besiyeri içesinde kimyasal ayrıştırmaya bırakıldı. L15 içerisine %1 oranında glutamin ve aynı oranda antibiyotik-antimikotik solüsyonunun aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı.



Şekil 9. A) Yenidoğan Balb-c fare; B) İzole edilmiş beyin; C) İzole edilmiş hipokampus dokuları

### 3.3.4. Kimyasal Ayrıştırma

Sinir sistemi ile hazırlanmış hücre kültüründe, enzimler yardımıyla hücreleri bir arada tutan yapılar parçalanır (bağ doku, bazal lamina, hücreler arası bağlantılar). Papain, merkezi sinir sisteminde, hücreler arası bağlantıları koparmak için kullanılır. Dokular +4°'de L15 içerisinde 40 dakika papain eklenerek inkübasyona bırakıldı.

### **3.3.5. Mekanik Ayırıştırma**

Enzimatik olarak gevşemiş hücrelerin ayrışması tiritürasyon ile sağlandı. Bunun için cam Pasteur pipet ucundan dokular nazikçe geçirildi. Mekanik ayırıştırma yapılmadan önce, daha iyi ayırıştırılabilmesi için hücre süspansiyonuna %1 oranında DNase eklendi. Süspansiyon sonrasında 15 dakika oda sıcaklığında ajitatörde inkübe edildi.

### **3.3.6. Hücre Ekimi**

Fetal dana serumu (Sigma, F9665) ile papainin etkisi durdurulduktan sonra hücre süspansiyonu santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellet , Neurobasal-A (NBA, Gibco, A 12475) besiyerinde çözüldü. NBA'da çözülmüş olan hücreler, 35 mm çapında cam petrilere ekildi. İki hipokampus dokusundan elde edilen hücreler toplam 4 petriye ekildi. Ekim sonrası hücrelerin petri tabanına yapışması için inkübatörde 2 saat beklendikten sonra besiyeri 1,5 ml'ye tamamlandı. Kültürler %5 CO<sub>2</sub> ayarlı 37<sup>0</sup>C'lik etüvde inkübasyona alındı. Normal fizyolojiyi sağlayabilmesi için, nöronlar ve glial hücreler bir arada ekildi. Deneyler sırasındaki değerlendimelerde konfokal mikroskop ile hem propidium iyodür (PI) hem de bright field (BF) görüntüler alınarak nöron veya glia ayırımı, morfolojilerine bakılarak yapıldı.

### **3.4. Kültürlerde %50 Mortalite Sağlayan Bilirubin Dozunun Bulunması**

Yapılan in-vitro çalışmalarda farklı düzeylerde bilirubin konsantrasyonları ile nöron hücre kültürlerinde toksisite oluşturulmuştur [105-107]. Çalışmalarda farklı tip hücre kültürleri, kültür yapım şekilleri ve bilirubin:albumin oranları kullanılmış olduğundan çalışmamızda öncelikle, yapılan kültürlerde normotermik ortamda 24 saatlik bilirubin inkübasyonundan sonra yaklaşık %50 mortaliteye neden olacak bilirubin dozunu hesaplamayı hedefledik. Uygulanacak dozlar için bilirubin nörotoksitesisi ile ilgili yapılmış farklı in vitro çalışmalarda toksisitesi kanıtlanmış dozları baz aldık[106-108].

Deneyde 4 grup oluşturuldu: Sham grubu, 25 mikromol/L bilirubin eklenmiş grup, 50 mikromol/L bilirubin eklenmiş grup, 75 mikromol/L bilirubin eklenmiş

grup. Sham grubuna, bilirubin eklenirken koyulan kimyasallar (albumin, NaOH) eklendi.

Hazırlanmış olan kültürlerin DIV3'te önce görüntülemeleri alındı, viabiliteye bakıldı ve sonrasında bilirubin eklenerek 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonrasında tekrar kültürlerin görüntülemeleri alınarak mortalite oranları hesaplandı. Deneyler 3 kez tekrarlandı.

### **3.5. Bilirubin Uygulanmış Kültürlerin Soğutulması**

Soğutma deneylerinde her sıcaklık grubunda 4 adet petri kullanıldı; kontrol grubu, sham grubu, bilirubin eklenen gruplar. Bilirubin eklenen petrilere biri Propidium İyodür (PI) görüntülemesi için, diğeri de JC-1 görüntülemesi için kullanıldı.

Hipokampus kültürlerine inkübasyonun in vitro 3. Gününde, bilirubin öncesi görüntülemeleri yapıldıktan sonra saptanmış olan bilirubin dozu eklendi. Bilirubin eklenmesinin 72. saatte olma sebebi bu süreç içerisinde nöronların ve glial hücrelerin rejenerasyonlarının sağlanması ve tıpkı normal fizyolojide olduğu gibi gözlenmesine olanak verilmesinin istenmesidir. Bilirubin nörotoksitesi ile ilgili birçok çalışmada bilirubin uygulanması için bu nedenle in vitro 3. gün tercih edilmektedir [57, 109]. Petrilere 4 ayrı deney grubu halinde; normotermik (37°C), hafif hipotermik (34°C), orta hipotermik (32°C) ve ağır hipotermik (29°C) derecede inkübatörlere alınarak 24 saat bekletildi. Hipotermi dereceleri saptanırken, pratikte yenidoğan bebeklerde, prelinik ve klinik çalışmalarda yine yenidoğan farelerde kullanılmakta olan hipotermi dereceleri kullanıldı [87, 110, 111].

Her sıcaklık derecesindeki inkübatörde, hem bilirubin uygulanmış hem de uygulanmamış kontrol kültürler bulunması sayesinde hipoterminin kendi neden olabileceği hücre ölümü de göz önünde bulundurulmuş oldu.

Yirmi dört saat soğutma sonrasında normotermik ve hipotermik hücre kültürleri hücre sağ kalımı ve apoptoz oranları açısından konfokal mikroskop aracılığı ile karşılaştırıldı. Hipoterminin uzun süreçteki etkilerini görmek amacıyla 24 saat soğutma sonrasında bilirubin kültürlerden uzaklaştırıldı ve kültürler normotermik ortama alındıktan sonra bilirubin maruziyetinin 72. saatinde, bir diğ

deyişle in-vitro 7. günde, soğutma yapılmamış olan kültürler ile hücre sağ kalımı açısından karşılaştırıldı. Tüm soğutma deney şeması Şekil 10'da verilmiştir.

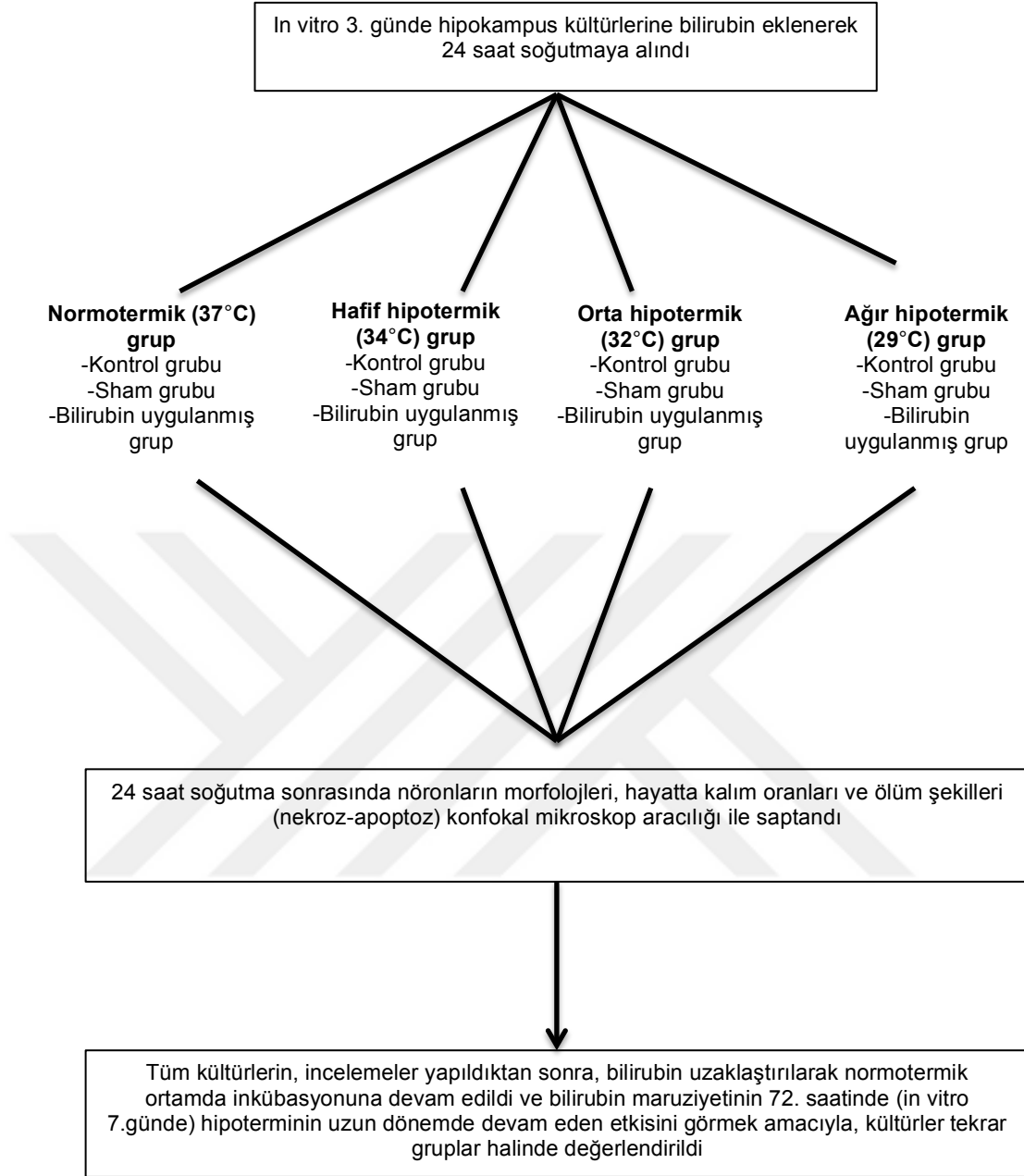
### **3.6. Kültürlerin Görüntülemeleri**

Görüntülemeler için tüm deney gruplarındaki petrilerin görüntüsü lazer taramalı konfokal mikroskop (LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile tarandı. Nöron ve glial hücreler morfolojilerine bakılarak ayırt edildi. Konfokal mikroskopta yer alan Zeiss Black yazılımı petrilerin merkezinden tüm petriyi kapsayacak şekilde görüntü alınmasına ve sayım yapılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca yazılımın sağladığı diğer bir imkan ile aynı anda hem Bright Field (BF) hem PI görüntülerini alarak ve bunların birleştirilmiş görüntüsünü vererek deneyin daha iyi analiz edilmesi sağlanmaktadır. Petriler görüntüleme öncesi işaretlenerek ve mikroskoba aynı konumda yerleştirilerek, bilirubin sonrası görüntülemelerde aynı alanın bulunabilmesi kolaylaştırıldı. X20 büyütmede 25 mikroskop alanı tarandı ve 9'u rastgele olarak sayıldı. Her petride minimum 3000 hücre sayıldı. Mortalite hesaplamalarında her petri öncelikle kendi içerisinde değerlendirildi. Bilirubin sonrasındaki görüntülemelerdeki PI pozitif hücre sayıları, petrideki toplam hücre sayısına bölünerek mortalite hesaplandı.

#### **3.6.1. PI görüntülemeleri**

Propidium iyodür (PI) ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşarak floresan görüntü alınmasını sağlar (eksitasyon 535 nm maximum emisyon 617 nm).

Bilirubin ile muamele edilen kültürlerin bilirubin maruziyeti öncesi ve sonrası PI ve BF görüntüleri alındı (Şekil 11). Ölen nöron ve glial hücrelerin oranı bu yol ile tespit edildi. Tüm petrinin taranarak görüntüsünün alınması en fazla 5 dakika sürdü ve bu nedenle örnekler arasında bekleme kaynaklı bir fark olmadı. Bu süreçte bilirubinin ışıktan olumlu veya olumsuz etkilenmesi söz konusu değildi.

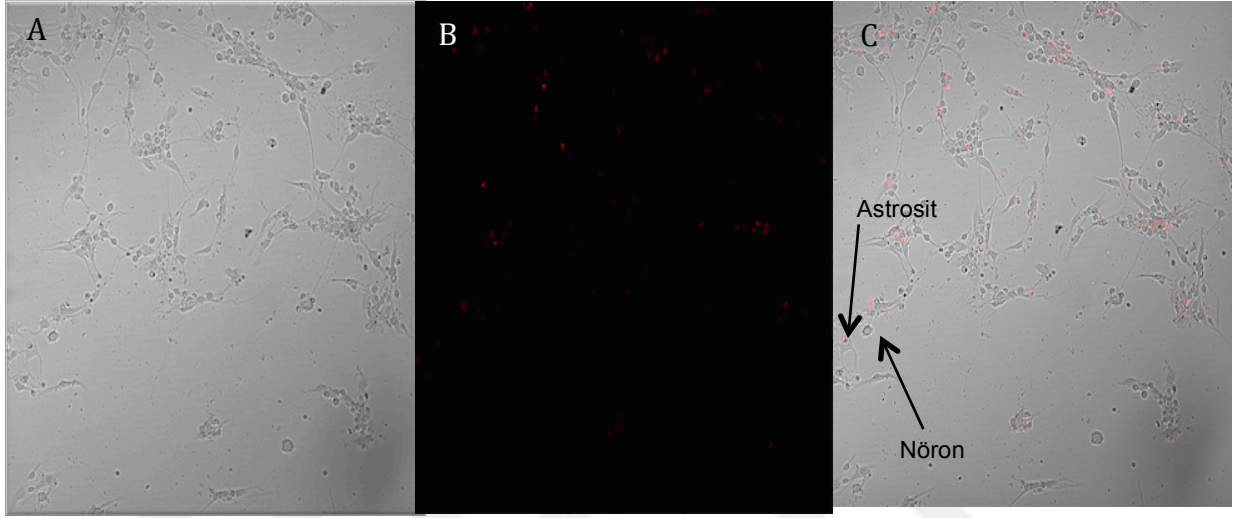


**Şekil 10. Kültürlere Bilirubin Uygulanması ve Sonraki Değerlendirmelerin Deney Planı**

### 3.6.2. JC-1 Görüntülemeleri

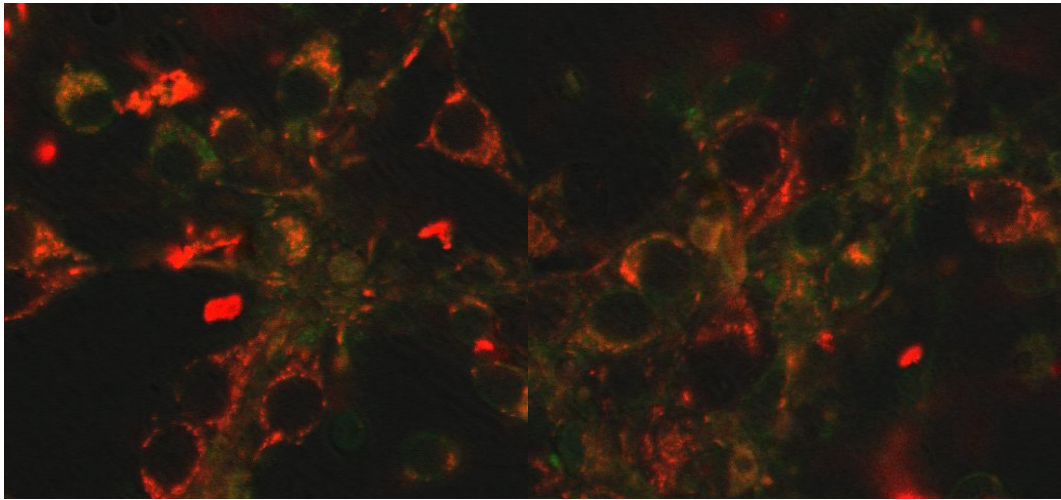
Mitokondrial membran potansiyelindeki değişiklikler hücrenin fonksiyonları ve sağlığı açısından bir belirteç olarak kullanılabilir. JC-1 boyası (5,5',6,6'-

tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimi-dazolikarbosiyanin iyodid) erken dönemde apoptozun göstergesidir. Hücre kültürlerine eklenen JC-1 ile meydana gelen floresan değişiklikler hücrelerin ölüm süreçleri konusunda bilgi vermektedir. 488 nm ile eksitasyonu, 590 nm ile emisyonu gerçekleşmektedir. Hayatta olan hücreler kırmızı, ölenler ise yeşil olmaktadır. Kültürlere apoptoz oranlarının saptanması için JC-1 uygulandı. JC-1 toksik bir boya olduğundan görüntülemeler sadece bilirubin



**Şekil 11. A, Hipokampus kültürü, BF ile görüntüleme; B, Hipokampus kültürü, PI ile görüntüleme; C, Hipokampus kültürü, PI ve BF ile görüntüleme**

maruziyetinin 24. saatinde alındı, hipotermiminin geç etkilerine bakılırken apoptoz oranlarına ayrıca bakılmadı (Şekil 12).



**Şekil 12. Bilirubin maruziyeti sonrası apoptoz, JC-1 ile görüntüleme**

### 3.7. İstatistiksel Analizler

Sonuçlar IBM SPSS Statistics V21.0 programı kullanılarak analiz edildi. Analizlerde tek yönlü ANOVA ve sonrasında Bonferroni post-hoc düzeltmesi yapıldı. Ortalama değerler istatistiksel olarak  $p < 0,05$  olduğunda anlamlı kabul edildi.



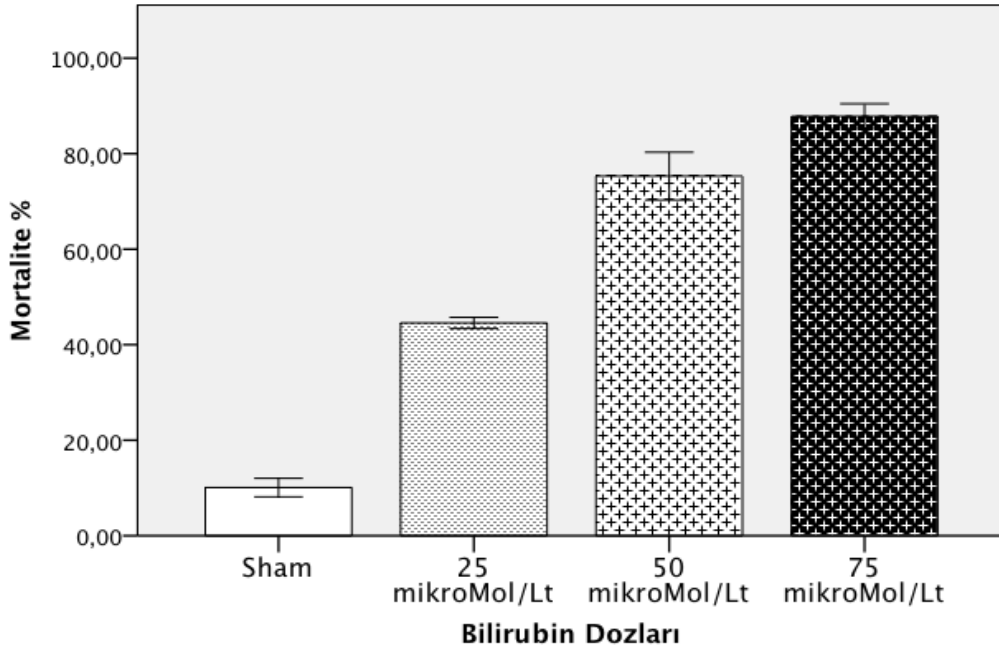
## 4. BULGULAR

### 4.1. Bilirubin Dozlarına Göre Hücre Ölüm Oranları

Farklı ve artan dozlarda bilirubin eklenen ve 24 saat normotermik ortamda inkübasyon sonrası mortalite açısından değerlendirilen kültürlerde, %50'ye yakın mortalitenin 25 mikroMol/Lt konsantrasyon ile sağlandığı saptandı (Tablo 5) (Şekil 13). Sonraki tüm soğtuma deneylerinde 25 mikroMol/Lt bilirubin kullanıldı (Bilirubin:Albumin 1:1).

**Tablo 5. Normotermik Ortamda 24 Saat Bilirubin ile İnkübasyon Sonrası Mortalite Oranları**

	Bilirubin Sonrası 24. Saatte Mortalite	
	Ort±SEM (%)	%95CI
<b>Sham</b>	10,1±0,97	5,90-14,3
<b>25 µM Bilirubin</b>	44,6±0,59	42,0-47,1
<b>50 µM Bilirubin</b>	75,3±2,50	64,5-86,1
<b>75 µM Bilirubin</b>	87,8±1,31	82,2-93,5



**Şekil 13. Normotermik Ortamda Bilirubin Dozlarına Göre Mortalite**

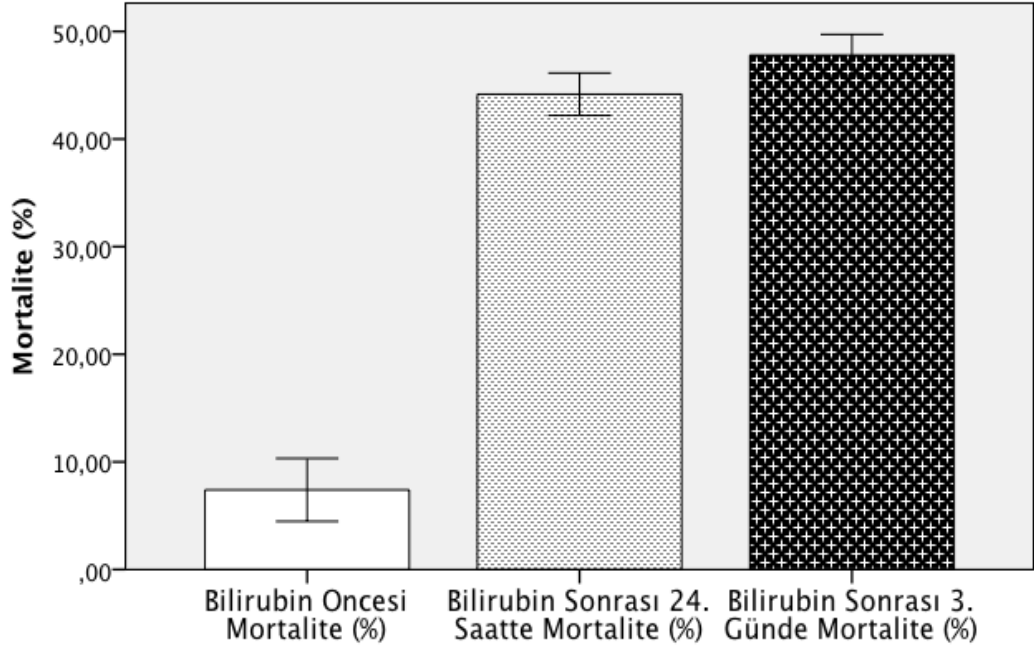
## 4.2. Soğutma Derecelerine Göre Mortalite

### 4.2.1. Normotermik (37°C) Grupta Mortalite

Normotermik grubun kendi içindeki analizlerinde bilirubin eklenmeden önce petrillerdeki spontan hücre ölümü oranı  $7,76 \pm 0,62$  (CI 4,80-10,5) idi. Kontrol ve sham grupları arasında hücre sağ kalımları açısından anlamlı fark yok idi. Bilirubin eklenen grup ile sham ve kontrol grupları arasında hem 24. saatte hem de 3. günde anlamlı fark mevcuttu ( $p < 0,001$ ) (Tablo 6) (Şekil 14).

**Tablo 6. Normotermik Grupta Mortalite Oranları**

		<b>Mortalite (Ortalama) (%)</b>	<b>SEM (%)</b>	<b>%95 CI</b>
<b>Bilirubin Öncesi</b>	Bilirubin Eklenecek Olan	7,40	$\pm 1,46$	1,10-13,7
	Sham	8,26	$\pm 1,36$	2,39-14,1
	Kontrol	7,63	$\pm 0,65$	4,80-10,5
<b>Bilirubin Sonrası 24. saat</b>	Bilirubin Eklenen	44,2	$\pm 0,98$	39,9-48,4
	Sham	14,6	$\pm 3,25$	0,58-28,6
	Kontrol	12,9	$\pm 2,45$	2,32-23,5
<b>Bilirubin Sonrası 3. gün</b>	Bilirubin Eklenen	47,8	$\pm 0,96$	43,7-51,9
	Sham	20,9	$\pm 1,99$	12,3-29,4
	Kontrol	18,6	$\pm 1,92$	10,3-26,9



**Şekil 14. Normotermik Grupta Bilirubin Eklenen Petrilerde Mortalite Oranları**

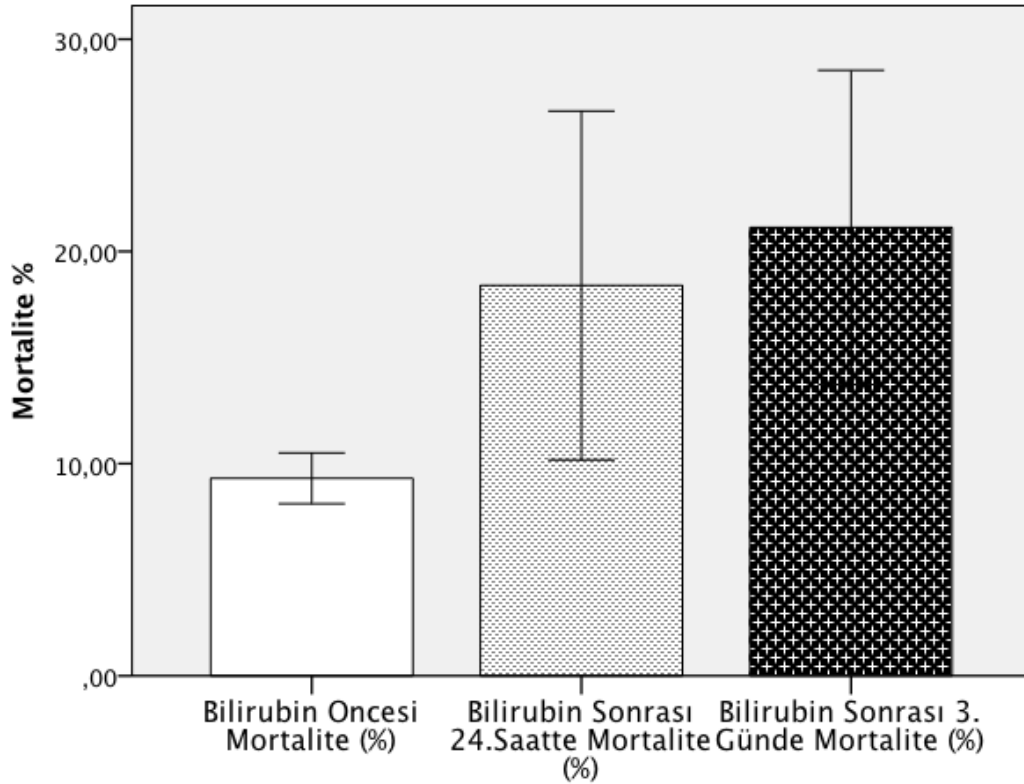
#### 4.2.2. Hafif Hipotermik (34°C) Grupta Mortalite

Hafif hipotermi uygulanan grubun analizlerinde, bilirubin eklenmeden önce petrilerdeki spontan hücre ölüm oranı  $9,31 \pm 1,80$  (CI 7,90-10,7) idi.

Sham ve kontrol grupları arasında mortalite oranlarında anlamlı fark yoktu. Bilirubin eklenen grup ile sham ve kontrol grupları arasında bilirubin maruziyeti sonrası hücre sağ kalımı açısından 24. saatte ( $p=0,005$ ) ve 3. günde ( $p=0,012$ ) anlamlı fark saptandı (Tablo 7) (Şekil 15).

**Tablo 7. Hafif Hipotermik Grupta Mortalite Oranları**

		<b>Mortalite (Ortalama) (%)</b>	<b>SEM (%)</b>	<b>%95 CI</b>
<b>Bilirubin Öncesi</b>	Bilirubin Ekleneyecek Olan	10,3	±0,66	7,47-13,1
	Sham	9,42	±1,47	3,09-15,8
	Kontrol	8,21	±0,77	4,88-11,5
<b>Bilirubin Sonrası 24. saat</b>	Bilirubin Eklenen	33,4	±5,26	9,18-57,5
	Sham	11,0	±1,66	3,83-18,1
	Kontrol	11,0	±0,80	7,43-14,3
<b>Bilirubin Sonrası 3. gün</b>	Bilirubin Eklenen	34,1	±5,40	10,9-57,4
	Sham	15,0	±1,68	7,8-22,3
	Kontrol	14,2	±2,30	4,32-24,1



**Şekil 15. Hafif Hipotermik Grupta Bilirubin Eklenen Petrilere Mortalite Oranları**

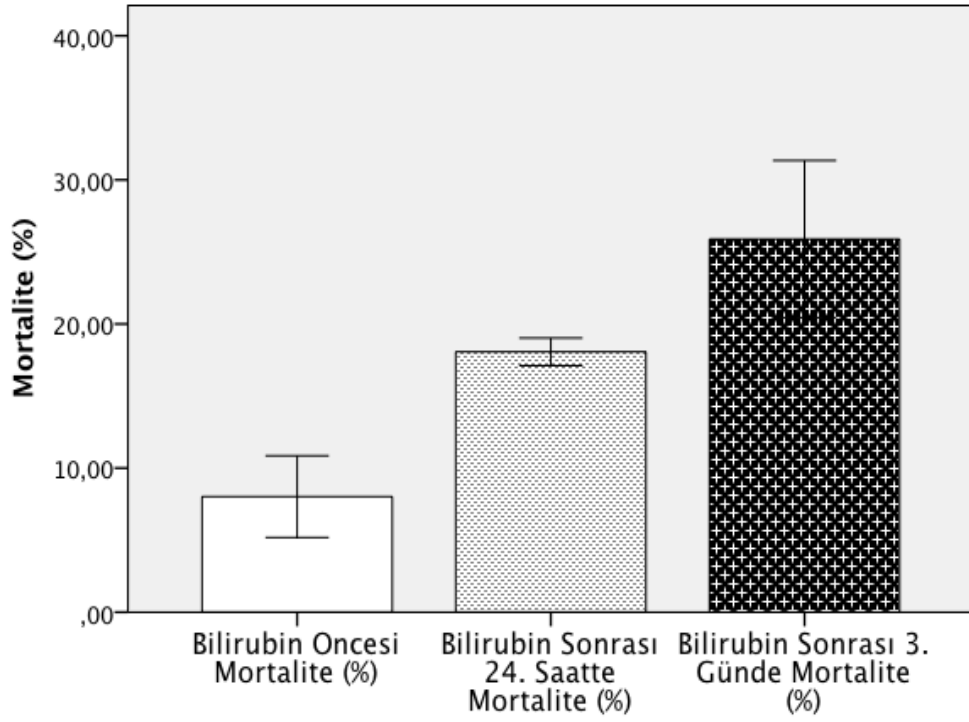
#### 4.2.3. Orta Hipotermik (32°C) Grupta Mortalite

Orta hipotermi uygulanan grubun analizlerinde bilirubin eklenmeden önce petrillerdeki spontan hücre ölüm oranı %7,64±0,52 (CI 6,44-8,84) idi.

Sham ve kontrol grupları arasında mortalite oranlarında anlamlı fark yoktu. Bilirubin eklenen grup ile sham ve kontrol grupları arasında bilirubin maruziyeti sonrası hücre sağ kalımı açısından 24. saatte ( $p<0,001$ ) ve 3. günde ( $p=0,006$ ) anlamlı fark saptandı (Tablo 8) (Şekil 16).

**Tablo 8. Orta Hipotermik Grupta Mortalite Oranları**

		<b>Mortalite (Ortalama) (%)</b>	<b>SEM (%)</b>	<b>%95 CI</b>
<b>Bilirubin Öncesi</b>	Bilirubin Eklenecek Olan	8,02	±1,41	1,92-14,1
	Sham	7,62	±0,99	3,39-11,9
	Kontrol	7,28	±0,40	5,57-8,98
<b>Bilirubin Sonrası 24. saat</b>	Bilirubin Eklenen	18,06	±0,48	16,0-20,1
	Sham	9,24	±0,86	5,54-12,9
	Kontrol	9,18	±0,66	6,33-12,0
<b>Bilirubin Sonrası 3. gün</b>	Bilirubin Eklenen	25,9	±2,72	14,2-37,6
	Sham	11,6	±2,12	2,51-20,7
	Kontrol	12,9	±1,24	7,57-18,2



**Şekil 16. Orta Hipotermik Grupta bilirubin Eklenen Petrilere Mortalite Oranları**

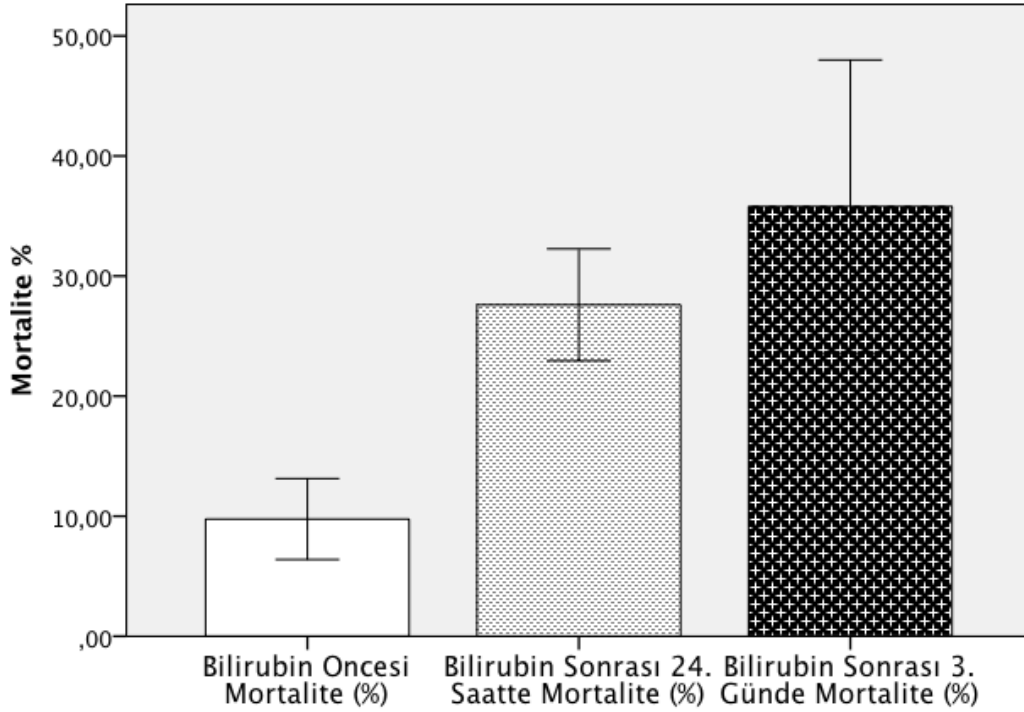
#### 4.2.4. Ağır Hipotermik (29°C) Grupta Mortalite

Ağır hipotermi uygulanan grubun analizlerinde bilirubin eklenmeden önce petrilereki spontan hücre ölüm oranı  $8,73 \pm 0,72$  (CI 7,07-10,4) idi.

Sham ve kontrol grupları arasında mortalite oranlarında anlamlı fark yoktu. Bilirubin eklenen grup ile sham ve kontrol grupları arasında bilirubin maruziyeti sonrası hücre sağ kalımı açısından 24. saatte anlamlı fark ( $p=0,002$ ) mevcut iken, 3. günde ( $p=0,139$ ) anlamlı fark bulunmadı (Tablo 9) (Şekil 17).

**Tablo 9. Ağır Hipotermik Grupta Mortalite Oranları**

		<b>Mortalite (Ortalama) (%)</b>	<b>SEM (%)</b>	<b>%95 CI</b>
<b>Bilirubin Öncesi</b>	Bilirubin Eklenecek Olan	9,76	±1,69	2,51-17,0
	Sham	8,29	±0,76	5,03-11,5
	Kontrol	8,14	±1,42	2,03-14,3
<b>Bilirubin Sonrası 24. saat</b>	Bilirubin Eklenen	27,6	±2,33	17,6-37,6
	Sham	11,7	±1,99	3,11-20,2
	Kontrol	11,2	±1,82	3,34-19,04
<b>Bilirubin Sonrası 3. gün</b>	Bilirubin Eklenen	35,8	±6,10	9,55-62,1
	Sham	22,2	±3,64	6,49-37,8
	Kontrol	22,9	±3,59	7,44-38,3



**Şekil 17. Ağır Hipotermik Grupta Bilirubin Eklenen Petrielerde Mortalite Oranları**

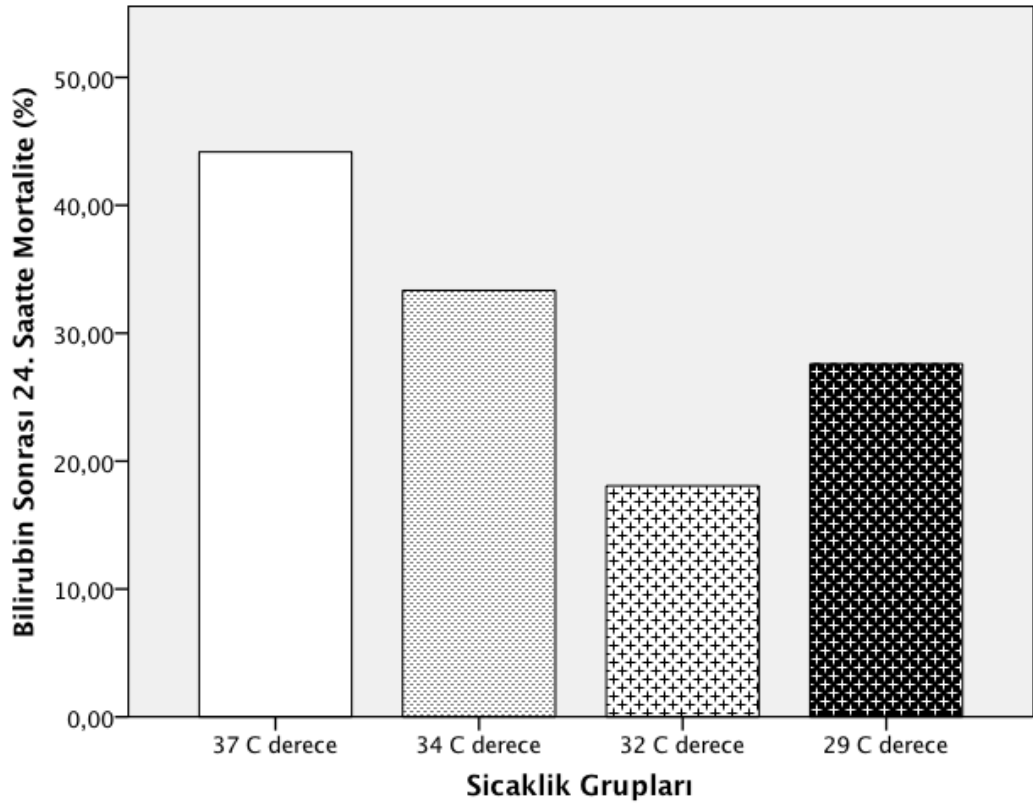
#### **4.2.5. Soğutma Derecelerine Göre Bilirubin Maruziyeti Sonrası Nöral Hücrelerde Hayatta Kalım**

Farklı soğutma derecelerinde bilirubin maruziyeti sonrası mortalite bakıldığında 24 saatlik inkübasyon sonrasında gruplar arasında anlamlı fark olduğu saptandı ( $p=0,002$ ). Grup içi analizlere bakıldığında normotermik grup ile orta hipotermi ( $32^{\circ}\text{C}$ ) grubu arasında ( $p=0,002$ ) ve ağır hipotermi ( $29^{\circ}\text{C}$ ) grubu arasında anlamlı ( $p=0,032$ ) ilişki saptandı. Normotermik grup ile hafif hipotermi ( $34^{\circ}\text{C}$ ) grubu karşılaştırıldığında, hipotermik grupta mortalitenin daha düşük olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı ( $p=0,23$ ). Hafif ve orta hipotermi karşılaştırıldığında erken mortalite oranlarında orta hipotermide hayatta kalımın daha iyi olması lehine anlamlı fark bulundu ( $p=0,049$ ) (Şekil 18, 21).

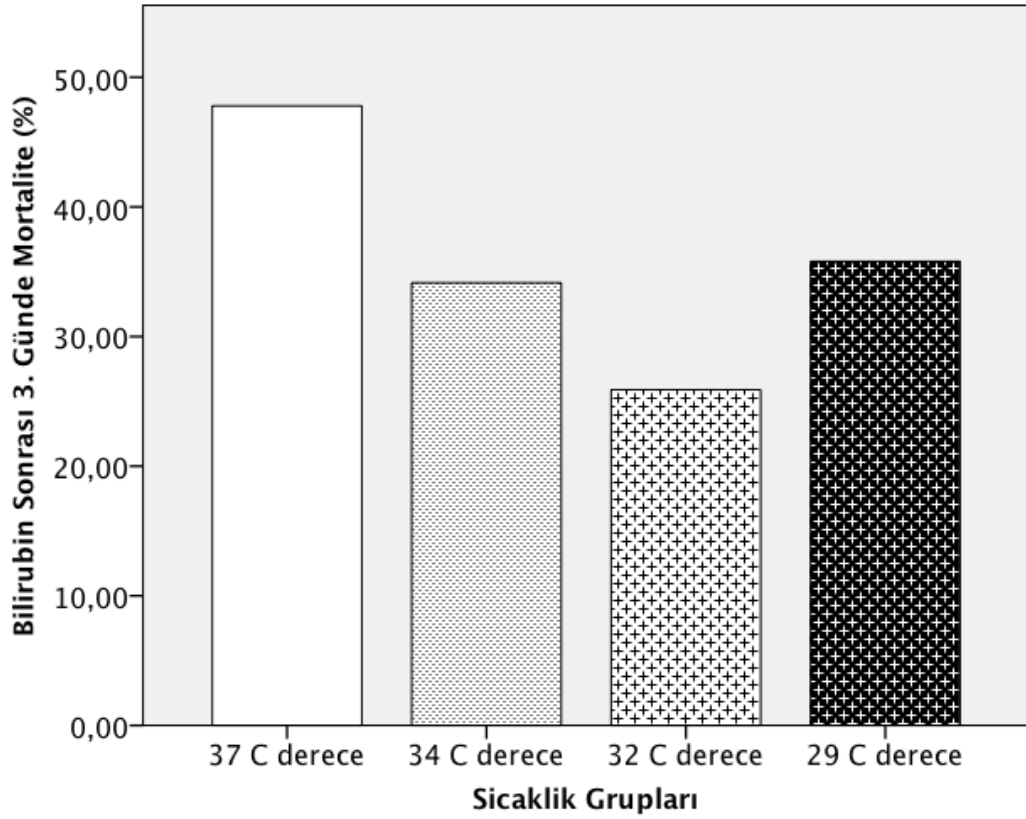
Bilirubin maruziyeti sonrası 3. gününde tespit edilen mortalite oranları karşılaştırıldığında sıcaklık grupları arasında anlamlı ilişki saptandı ( $p=0,042$ ). Alt grup analizlerine bakıldığında normotermik grup ile karşılaştırıldığında, orta hipotermi grubunun mortalitesinde anlamlı düşüklük saptandı ( $p=0,043$ ). Hafif hipotermi grubundaki hücre sağ kalımı normotermik gruba kıyasla daha iyi bulundu ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı ( $p=0,34$ ). Ağır hipotermi grubu ise geç mortalite açısından diğer hipotermi grupları ile karşılaştırıldığında hücresel sağ kalımın daha düşük olduğu fark edildi. Normotermik grup ile karşılaştırıldığında ise viabilitede bir fark saptanmadı ( $p=0,624$ ) (Tablo 10) (Şekil 19, 21).

**Tablo 10. Soğutma Derecelerine Göre Bilirubin Sonrası Mortalite Oranları**

	Bilirubin Öncesi Mortalite		Bilirubin Sonrası 24. Saatte Mortalite		Bilirubin Sonrası 3. Günde Mortalite	
	Ort±SEM (%)	%95CI	Ort±SEM (%)	%95CI	Ort±SEM (%)	%95CI
37°C	7,40±1,46	1,10-13,7	44,2±0,99	39,9-48,4	47,8±0,96	43,7-51,9
34°C	10,3±0,66	7,47-12,1	33,4±5,26	9,18-57,5	34,1±5,40	10,9-57,4
32°C	8,02±1,42	1,92-14,1	18,1±0,48	16,0-20,1	25,9±2,72	14,2-37,6
29°C	9,76±1,69	2,51-17,0	27,6±2,33	17,6-37,6	35,8±6,10	9,55-62,1



**Şekil 18. Sıcaklık Gruplarına Göre Bilirubinün 24. Saatinde Mortalite**



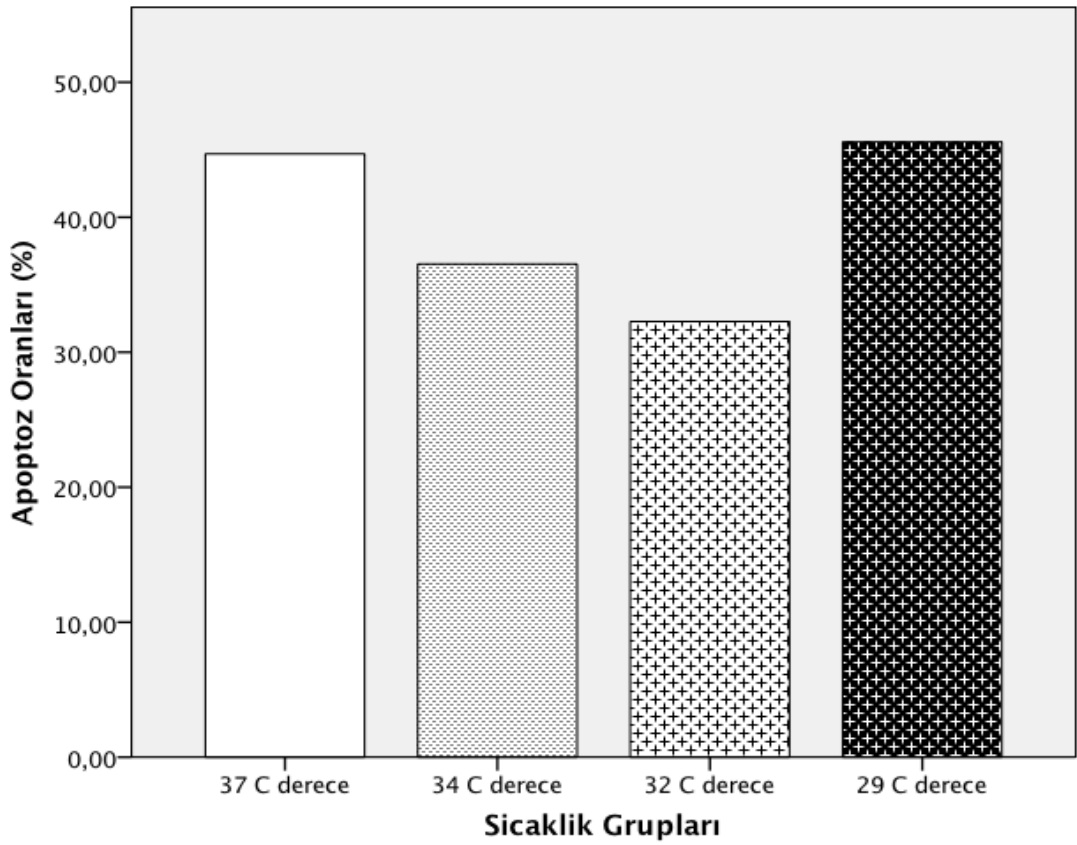
**Şekil 19. Sıcaklık Gruplarına Göre Bilirubin 3. Gününde Mortalite**

#### **4.3. Soğutma Derecelerine Göre Bilirubin Maruziyeti Sonrası Apoptoz Oranları**

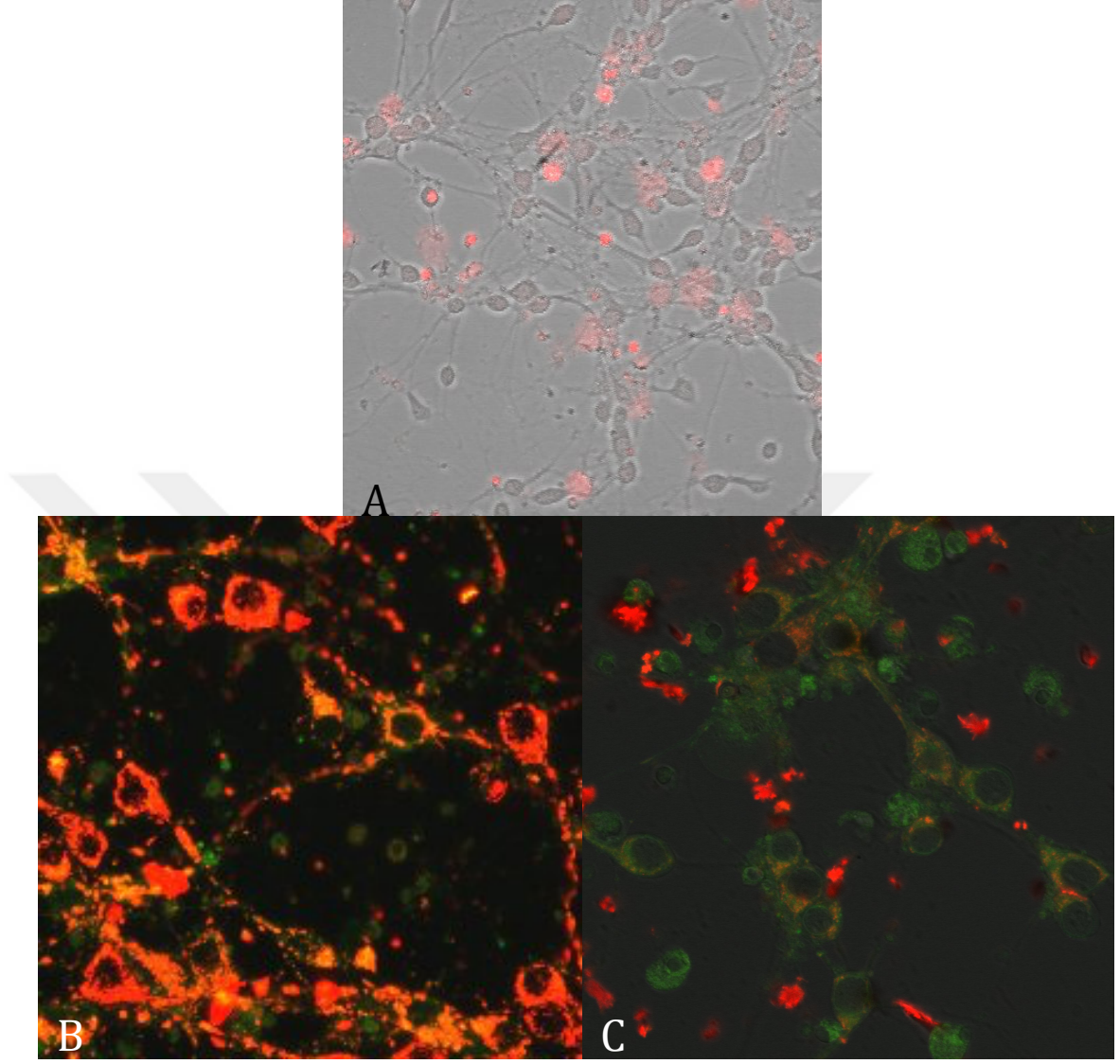
Bilirubin maruziyeti sonrası 24. saatte bakılan apoptoz oranları hipotermi derecelerine göre karşılaştırıldığında, fark anlamlı olarak sonuçlandı ( $p=0,021$ ). Apoptoz oranları hafif ve orta hipotermi gruplarında, normotermik gruba göre belirgin düşük idi ancak alt grup analizleri yapıldığında anlamlı sonuç bulunmadı ( $p=0,062$ ). Ağır hipotermi grubu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında apoptoz oranlarının normotermik gruptan düşük olmadığı ve orta hipotermi grubuna göre belirgin yüksek olduğu ve istatistiksel anlamlılığın buradan kaynaklandığı görüldü ( $p=0,045$ ). Hafif ve orta hipotermi gruplarının apoptoz oranları arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 11) (Şekil 20, 21).

**Tablo 11. Soğutma Derecelerine Göre Bilirubin Sonrası Apoptoz Oranları**

	Bilirubin Sonrası 24. Saatte Apoptoz	
	Ort±SEM (%)	%95CI
37°C	44,7±3,90	27,9-61,5
34°C	36,5±0,33	32,4-40,7
32°C	32,3±0,63	29,6-35,0
29°C	45,6±2,61	34,4-56,8



**Şekil 20. Bilirubin Maruziyeti Sonrası Hipotermi Derecelerine Göre Apoptoz Oranları**



**Şekil 21. A) Bilirubin sonrası PI; B) Bilirubin öncesi JC-1; C) Bilirubin sonrası JC-1**

## 5. TARTIŞMA

Yenidoğan sarılığı, mevcut tedavi yöntemleri ve uluslararası kabul görmüş yaklaşım rehberlerine rağmen günümüzde halen yadsınamaz öneme sahip bir sağlık sorunudur [6]. Kernikterus olgularının son yıllarda artış göstermesi bilirubin nörotoksitesini tekrar güncel bir konu haline getirmiştir [3, 112].

Ağır veya uzamış orta derecedeki indirekt hiperbilirubinemide, akut bilirubin ensefalopati kliniği tespit edilmemiş olsa dahi bu bebeklerin uzun dönem takiplerinde, bazı nörolojik problemlerin gelişebilme riskinin olduğuna çalışmalar bulunmaktadır. Soorani-Lunsing ve ark., orta derecede hiperbilirubinemisi olan sağlıklı term bebekleri 12. ayda değerlendirdiklerinde, yenidoğan döneminde maruz kaldıkları bilirubin seviyesi ile anlamlı ilişki gösteren minör nörolojik disfonksiyon (tonus, postür ve reflekslerde anormallikler) tespit etmiştir [113]. American Collaborative Perinatal Project verilerine göre orta derecede hiperbilirubinemiye maruz kalmış çocuklarda okul çağında minör motor bozukluklar görülebildiği saptanmıştır [114]. Minör nörolojik bozukluklar zor tanı alır ve yenidoğan döneminde hiperbilirubinemi olgularının bildirimindeki sıkıntılar da göz önüne alındığında, sarılığın uzun dönemdeki etkileri ile ilgili farkındalık yaratılması ve ileri klinik çalışmalar yapılması gerekmektedir [115].

Kernikterus tablosu, indirekt hiperbilirubineminin uzun dönemdeki etki spektrumuna bakıldığında buz dağıının sadece görünür kısmıdır. Bu nedenle bilirubin nörotoksitesi mekanizmalarının anlaşılması ve bu toksisiteyi önleyebilecek veya modifiye edebilecek tedavi yöntemlerinin araştırılması, son derece önem kazanmaktadır.

Konjuge edilmemiş bilirubin, birçok yolak üzerinden farklı mekanizmalar ile nöronal hasar oluşturabilmektedir [2]. Henüz hücre içine diffüzyon yolu ile geçerken karbon moleküllerinin polaritesi ve akışkanlığını değiştirerek nöron ve astrosit hücre zarlarına ve sonrasında mitokondrial zarlara hasar verdiği gösterilmiştir [39]. Çalışmalarda aynı zamanda hücre zarlarındaki akışkanlık artışının hücreyi fagositoza daha açık hale getirdiği ve iyon transport mekanizmalarını da etkileyerek hücre içi kalsiyum artışına neden olarak hücrenin ölümüne sebebiyet verdiği gösterilmiştir

[116, 117]. Mitokondrial zardaki hasarlanma da transmembran potansiyeli etkileyerek sitokrom c artışına ve sonrasında kaspaz aktivasyonu yolu ile apoptoza neden olmaktadır [44].

Konjuge edilmemiş bilirubinin hücre zarındaki kalsiyum kanallarını açması ile oluşan hücre içi kalsiyum artışının “cAMP response element binding” (CREB) ailesi transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu yoluyla NO artışına sebep olduğu gösterilmiştir [118, 119]. Bilirubinin mitokondri üzerinden diğer hasar mekanizmalarının içinde Bax translokasyonu, depolarizasyon, poly(ADP)riboz polimerazlarının yıkımı mevcuttur. Tüm bu süreçlerin bilirubin kaynaklı apoptoz nedenleri arasında olduğu düşünülmektedir [44].

Bilirubinin bir diğer hasar mekanizması, sinapslar üzerinde yarattığı etkiler aracılığı ile meydana gelir. Yapılan çalışmalarda inhibitör sinaptik iletimi artırdığı, sinaps yapımında ve nörotransmitter salınımında rolü olan sinaptofizin ve SNAP-25 proteinlerinin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [57, 120, 121]. Yine ratlar ile yapılmış bir çalışmada presinaptik dejenerasyona neden olduğu tespit edilmiştir [48].

Hücre içi kalsiyumun artarak birçok hücre yıkımına ilerleyen kaskadı başlatmasını sağlayan nedenlerin biri de bilirubinin N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini aktive etmesidir [46]. Yine NMDA reseptörleri ile ilişkili olarak eksitotoksik etkileri olan glutamat ekstrasellüler alanda artmaktadır [32]. Bilirubin kaynaklı apoptoz mekanizmasında atlanmaması gereken bir başka yolak ise serbest oksijen radikalleri, azalmış glutatyon ve NADPH düzeylerine bağlı oksidatif krizdir [35].

Son dönemde bilirubin nörotoksitesinde üzerinde durulan başka bir konuda pro-inflamatuar sitokinlerdir. Vaz ve ark., TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'nin bilirubin kaynaklı oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümünü mitokondri bağımlı ve bağımsız yollar üzerinden artırdığını göstermiştir [109].

Terapötik hipotermi yıllardır kardiyak cerrahide kullanılan bir yöntemdir [122, 123]. Yenidoğan döneminde tedavi protokollerine girişi nispeten yeni olup hipoksik iskemik ensefalopatide nöroprotektif amaçlı kullanılmaktadır[11]. Nöron koruyucu etkilerinin tam mekanizmaları bilinmemekle birlikte, nörolojik prognozdaki ümit verici etkisi nedeniyle, günümüzde birçok farklı alanda klinik kullanımı ile ilgili

çalışmalar yapılmaktadır [90, 101].

Yenidoğanlarda hipoksik iskemik hasar öncelikle hüresel düzeyde anoksi sonucunda direkt hücre ölümüne yol açar. Nöronun kullanabileceği yüksek enerji metabolitlerinin tükenmesi ile enerji bağımlı intrasellüler homeostaz bozulur. Sodyum-potasyum iyon kanallarının disfonksiyonu ile hücre içine sodyum ve su girişi başlar ve bu durum hücre şişmesi ve sonrasında lizis ile sonuçlanır [124]. Sonraki süreçte voltaj bağımlı ve nörotransmitter aracılı iyon kanallarının aktive olması ile kalsiyum birikimi meydana gelir [125, 126]. Hücre dışında glutamat birikimi ise hem hücre içine sodyum ve su girişini artırır hem de NMDA kanalları üzerinden hücre içi kalsiyum düzeylerinin daha da artmasına neden olur [126, 127]. Artmış kalsiyum hücre ölümüne giden yolları aktive eder. Reperfüzyon fazında ise oksijen radikallerine bağlı membran hasarı meydana gelir. Tüm bu süreç gecikmiş hücre ölümü fazı olarak adlandırılır. Bu faz aynı zamanda aktive mikroglianin sitotoksik etkileri, NO sentezi ve eksitotoksinler ile de ilişkilendirilir [79]. Hipoterminin gecikmiş hücre ölüm fazında nöron koruyucu etkileri gösterilmiştir. Soğutma tedavisi günümüzde, HİE’de nörolojik prognoza olumlu katkısı bulunduğu kanıtlanmış olan ve uzun dönemde majör yan etkileri görülmeyen bir tedavi yöntemidir [11].

Hipoterminin ağır hipoksik iskemide beyni, öncelikle serebral metabolizma hızını düşürerek ve böylece anoksik hücre depolarizasyonunu geciktirerek koruduğu düşünülmektedir [128]. Ayrıca çalışmalarda hipoterminin ekstrasellüler eksitator amino asit birikimini ve aynı zamanda da NO ve oksijen radikallerinin üretimini azalttığı gösterilmiştir [129, 130].

İn vitro yapılmış çalışmalarda hafif hipoterminin kaspaz yollarının aktivasyonunu baskılayarak ve sitokrom c translokasyonunu engellereyerek apoptozu hem intrinsik hem ekstrinsik yollar üzerinden baskıladığı saptanmıştır [131]. İn-vivo hayvan çalışmalarında ise iskemi sonrası uygulanan hipoterminin kaspaz-3 aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir [132]. Yine erişkin ratlarda yapılmış çalışmalarda, kaspaz-3 baskılanması dışında anti-apoptotik bcl-2 proteinini up-regüle ettiği ve pro-apoptotik p53 proteinin ekspresyonunu azalttığı kanıtlanmıştır [133].

Hipoterminin beyin hasarında oluşan inflamatuvar yanıtı baskılayıcı etkisi de

in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Schmitt ve ark. [134] hipoterminin, aktive olmuş mikrogliyalarda ERK sinyal yolağı üzerinden inflamasyonu baskıladığını gösterirken; Yenari ve Han [135], inflamatuvar yolakta önemli basamaklardan biri olan nükleer faktör kappa B'yi etkileyerek de etki gösterdiğini saptamıştır.

Çalışmamız, bu anlatılmış olan hipoksik beyin hasarı ile bilirubin kaynaklı beyin hasarı oluşma mekanizmalarının örtüşüyor olması ve hipoterminin bilirubin nörotoksisitesinde de nöron koruyucu olabileceği hipotezi üzerine kuruldu. Daha önce bilirubin kaynaklı beyin hasarında hipoterminin etkileri üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Kernikterus nedeniyle kaybedilen infantlarda bilirubin birikiminin özellikle hipokampus, korpus striatum ve serebellumda olduğu görülmüştür [136]. Vaz ve ark., konjuge edilmemiş bilirubinun farklı beyin bölgelerine olan etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, hipokampusun, korteks ve serebelluma nazaran bilirubin nörotoksisitesine daha hassas olduğunu göstermiştir [47]. Bu nedenle çalışmamızda nöron hücre kültürleri için hipokampus dokusu tercih edildi. Brites ve ekibi [2] bilirubinun nöron hasarı oluşturma mekanizmalarında astrositlerin ve mikrogliaların nöronlarla olan iletişiminin önemini, in-vitro çalışmalarında göstermişlerdir. Hipoterminin koruyucu mekanizmalarının bazılarının ise mikroglialar üzerinden gerçekleştiği bilinmektedir [134]. Normal bilirubin patofizyolojisine daha yakın olabilmesi amacıyla çalışmamızda, hipokampus dokusundan mikst nöral hücre kültürleri yapıldı ve böylece nöronlar, astrositler ve mikroglialar birlikte değerlendirildi.

Hücre kültürlerine bilirubin uygulanması in-vitro 3. günde yapıldı. Hücrelerin ekilmesinden sonra, nöral iletişim ağının kurulmasına zaman tanınabilmesi için 3 gün inkübasyonları beklendi. Bilirubinun in-vitro etkilerinin çalışıldığı birçok çalışmada da DIV3 kültürler kullanılmaktadır [57, 109].

İn vitro bilirubin nörotoksisitesinin konjuge edilmemiş bilirubin konsantrasyonları ile ilişkisini irdeleyen meta-analizde, yapılan hücre kültürünün tipinin, kullanılan bilirubin:albumin oranının, kullanılan bilirubinun saflığının ve bilirubin maruziyet süresinin nörotoksisiteyi etkileyebildiği saptanmıştır [108]. Günümüzde ticari olarak satılan toz konjuge edilmemiş bilirubin preparatları farklı

izomerler içerdiğinden, bilirubin kültürlerine uygulanmadan saflaştırılarak sarılıkta toksisite oluşturan asıl bilirubin IXa izomeri elde edildi. Çalışmamızda ağır bilirubin toksisitesi oluşturmayı amaçladığımızdan bilirubin:albumin oranı 1:1 olarak kullanıldı [105, 106]. Hafif yenidoğan sarılığında bilirubin:albumin oranları daha düşük kabul edilmekte, albumin düzeyindeki artışın bilirubine bağlanarak serbest indirekt bilirubinin toksisitesini azalttığı bilinmektedir [7]. Deneylerimizde bilirubin maruziyeti ve hipotermi süresi 24 saat olarak planlandıktan sonra, bilirubin:albumin oranı 1:1 şekilde, 24 saat normotermik ortamda (37C derecede, %5 CO<sub>2</sub> ile humidifiye) inkübasyon sonrası yaklaşık %50 mortaliteye neden olan bilirubin konsantrasyonu, 25µM olarak saptandı ve sonraki deneylerde bu konsantrasyonda bilirubin kullanıldı

Literatürde çoğu in-vitro bilirubin toksisite çalışmasında, bilirubin eklenen deney grupları, mortalite açısından maruziyet sonrası sham grupları ile karşılaştırılmıştır [105, 107]. Ancak nöral hücre kültürlerinde spontan hücre ölümü belli bir orana kadar beklenen bir durumdur ve hücre ölümlerinin bilirubinden kaynaklı olduğunun değerlendirmesinin daha sağlıklı yapılabilmesi amacıyla, çalışmamızda her deney, sham ve kontrol grubu DIV3'te deney gruplarına bilirubin eklenmeden önce görüntülenerek spontan ölüm oranları saptandı. Böylece gruplar arasında mortalite karşılaştırması yapılırken mortalitenin ne kadarının spontan hücre ölümü kaynaklı olduğu görülebildi. Grupların arasında spontan ölüm oranlarında istatistiksel bir fark olmadığı gösterildi. Hücre ölümü değerlendirmeleri için hücrelere toksik olmayan PI boyaması kullanıldı. Böylece gruplar, hem bilirubin öncesi hem 24 saat hem de 3 gün sonra hipoterminin akut ve geç etkileri açısından incelenebildi.

Tüm farklı sıcaklık gruplarında kontrol ve sham grupları arasında hücre sağ kalımı açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Bilirubin eklenmesi sırasında kullanılan kimyasallar ve insan serum albumininden kaynaklı hücre ölümü görülmediği gösterildi.

Bilirubin maruziyetinden 24 saat sonra deney grupları incelendiğinde, tüm hipotermi gruplarında normotermik gruba göre hücre sağ kalımının daha iyi olduğu görüldü. Ancak erken dönem mortalitede istatistiksel olarak anlamlı düşüklük orta ve

ağır hipotermi gruplarında görüldü. Günümüzde yenidoğan pratiğinde HİE'de baş soğutma ve tüm vücut soğutmada farklı dereceler uygulanmakla birlikte yan etkiler açasından daha güvenilir olduğundan genellikle rektal sıcaklık 33,5-35°C olacak şekilde hafif ve orta soğutma yapılmaktadır [137, 138]. Ancak son dönemde orta derecede hipotermi (33-34,5°C) uygulanan vaka serilerinde majör yan etki çok sık görülmemesi ve nörolojik sonuçların yüz güldürücü olması sebebi ile yenidoğan pratiğinde daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır [139].

Bilirubin sonrası 3. günde deney grupları incelendiğinde normotermik gruba göre orta hipotermi grubunda mortalitenin anlamlı düşük olduğu görüldü. Hafif hipotermi grubunda normotermik gruba göre istatistiksel anlamlılık saptanmasa da viabilitenin daha iyi olduğu görüldü. Ancak ağır hipotermi grubunda hücre sağ kalımının geç dönemde, diğer hipotermi gruplarına göre daha kötü olduğu ve normotermik gruba göre neredeyse hiç fark olmadığı görüldü. Bilirubin sonrası 24. saatte bakılan apoptoz oranlarında da ağır hipotermi grubunda, apoptoza giden hücre oranının diğer hipotermi gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü. Yine ağır hipotermi grubunda sham ve kontrol gruplarındaki mortalite oranlarının diğer hipotermi gruplarına göre daha yüksek olduğu görüldü. Bu sonuçlardan yola çıkarak bilirubin toksisitesinde, nöron koruyucu etki amacıyla ağır hipotermi tedavisinin optimal bir yaklaşım olmadığı düşünöldü. Asfikside derin hipotermi denenmiş olan hayvan çalışmalarında da nöroprotektif etkinin azaldığı ve kardiyak ciddi komplikasyonların olduğu görölmüştür [140]. HİE'de klinik uygulamada derin hipotermi kabul edilmiş olan 32°C soğutmanın denendiği geniş çaplı bir çalışma ise hastaların güvenliği açasından tamamlanmadan sonlandırılmak zorunda kalınmıştır. Çalışmada derin ve uzun soğutmada, hafif ve orta dereceli hipotermiye uygulamasına göre yenidoğanlarda daha sık ve ağır komplikasyonlar olduğu görölmüştür [89]. Bu konudaki ileri çalışmalar, hasarın ağırlığına göre farklı soğutma derecelerinin etkinliğini de araştırmalıdır.

Çalışmamızda mortalite ve apoptoz oranlarının sadece konfokal mikroskop aracılığı ile boyama yapılarak tespit edilmesi kısıtlayıcı bir faktördür. Apoptotik gen ekspresyonları saptanarak elde edilen verilerin doğruluğunun kanıtlanması çalışmanın gücünü artıracaktır.

Sonuç olarak bu çalışma bilirubin nrotoksisitesinde hipoterminin nöron koruyucu etkisinin olduğunu gösteren ilk ve tek çalışmadır. Soğutmanın bilirubin kaynaklı beyin hasarındaki etkinliğinin daha ileri in vitro ve in vivo çalışmalar ile de kanıtlanması halinde hipotermi, yenidoğan sarılığında kolayca kullanılabilir olan ve nörolojik sekeli azaltabilen bir tedavi yöntemi olarak yerini alabilecektir.



## 6. SONUÇLAR

1. Normotermik ortamda 24 saat inkübasyon sonrası %50 mortaliteyi sağlayan bilirubin dozu 25 mikroMol/Lt olarak saptandı.
2. Tüm sıcaklık gruplarında yapılmış olan hücre kültürlerinde DIV3'te bakılan spontan hücre ölüm oranları arasında anlamlı fark saptanmadı.
3. Tüm deney gruplarında, aynı sıcaklıkta inkübe edilmiş olan kontrol ve sham grupları arasında mortalite açısından anlamlı fark saptanmadı.
4. Normotermik grupta (37°C) bilirubin maruziyeti sonrası 24. saatte mortalite oranı ortalama %44,2±0,98 olarak bulundu.
5. Normotermik grupta, bilirubin eklenen grup ile sham ve kontrol grupları arasında mortalite oranlarında hem 24. saatte hem de 3. günde anlamlı fark mevcuttu ( $p<0,001$ ).
6. Hafif hipotermik grupta (34°C) bilirubin maruziyeti sonrası 24. saatte mortalite oranı ortalama %33,4±0,98 olarak bulundu.
7. Hafif hipotermi grubunda bilirubin eklenen grup ile sham ve kontrol grupları arasında mortalite oranlarında hem 24. saatte ( $p=0,005$ ) hem de 3. günde ( $p=0,012$ ) anlamlı fark mevcuttu.
8. Orta hipotermik grupta (32°C) bilirubin maruziyeti sonrası 24. saatte mortalite oranı ortalama %18,1±0,48 olarak bulundu.
9. Orta hipotermi grubunda bilirubin eklenen grup ile sham ve kontrol grupları arasında mortalite oranlarında hem 24. saatte ( $p<0,001$ ) hem de 3. günde ( $p=0,006$ ) anlamlı fark mevcuttu.
10. Ağır hipotermik grupta (29°C) bilirubin maruziyeti sonrası 24. saatte mortalite oranı ortalama %27,6±2,33 olarak bulundu.
11. Ağır hipotermi grubunda bilirubin eklenen grup ile sham ve kontrol grupları arasında mortalite oranlarında 24. saatte ( $p=0,002$ ) anlamlı fark saptanırken, 3. günde ( $p=0,139$ ) anlamlı fark bulunmadı.

12. Farklı soğutma derecelerine göre mortalite değerlendirildiğinde bilirubin ile 24 saat inkübasyon sonrası gruplar arasında anlamlı fark saptandı ( $p=0,002$ ).
13. Bilirubin maruziyetinden 24 saat sonra mortalite hesaplamalarına göre normotermik grup ile orta hipotermik grup ( $p=0,002$ ) arasında ve ağır hipotermik grup ( $p=0,032$ ) arasında anlamlı fark saptandı.
14. Bilirubin maruziyetinden 24 saat sonra mortalite hesaplamalarına göre hafif hipotermik grubun hücre sağ kalımı normotermik gruba göre daha iyi olmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,230$ ).
15. Hafif ve orta hipotermi karşılaştırıldığında erken mortalite oranlarında orta hipotermide hayatta kalımın daha iyi olması lehine anlamlı fark bulundu ( $p=0,049$ ).
16. Bilirubin maruziyeti sonrası 3. gününde tespit edilen mortalite oranları karşılaştırıldığında sıcaklık grupları arasında anlamlı ilişki saptandı ( $p=0,042$ ).
17. Bilirubin maruziyeti sonrası 3. günde, normotermik grup ile karşılaştırıldığında, orta hipotermi grubunun mortalitesinde anlamlı düşüklük saptandı ( $p=0,043$ ).
18. Bilirubin maruziyeti sonrası 3. günde, hafif hipotermi grubundaki hücre sağ kalımı normotermik gruba kıyasla daha iyi bulundu ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı ( $p=0,34$ ).
19. Bilirubin maruziyeti sonrası 3. günde ağır hipotermi grubu normotermik grup ile karşılaştırıldığında viabilitede bir fark saptanmadı ( $p=0,624$ ).
20. Bilirubin maruziyeti sonrası 24. saatte bakılan apoptoz oranları hipotermi derecelerine göre karşılaştırıldığında, fark anlamlı olarak sonuçlandı ( $p=0,021$ ).
21. Bilirubin maruziyeti sonrası 24. saatte hafif ve orta hipotermik gruplarda apoptoz oranları, normotermik gruba göre daha düşük saptandı ancak istatistiksel anlamlılık bulunmadı ( $p=0,062$ ).
22. Bilirubin maruziyeti sonrası 24. saatte ağır hipotermi grubu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında apoptoz oranlarının normotermik gruptan düşük olmadığı; orta hipotermi grubuna göre belirgin yüksek olduğu ve istatistiksel anlamlılığın buradan kaynaklandığı görüldü ( $p=0,045$ ).

23. Hafif ve orta hipotermi gruplarının apoptoz oranları arasında anlamlı fark bulunmadı.



1. Ambalavanan, N.C., W.A., *Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn*, in *Nelson Textbook of Pediatrics*, S.B.F. Kliegman R.M., St Geme J.W., Schor N.F., Editor. 2016, Elsevier. p. 871-875.
2. Brites, D., *The evolving landscape of neurotoxicity by unconjugated bilirubin: role of glial cells and inflammation*. *Front Pharmacol*, 2012. **3**: p. 88.
3. Watchko, J.F., *Kernicterus and the Molecular Mechanisms of Bilirubin-Induced CNS Injury in Newborns*. *NeuroMolecular Medicine*, 2006. **8**(4): p. 513-530.
4. Kaplan, M., R. Bromiker, and C. Hammerman, *Severe neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus: are these still problems in the third millennium?* *Neonatology*, 2011. **100**(4): p. 354-62.
5. Bortolussi, G., et al., *Age-dependent pattern of cerebellar susceptibility to bilirubin neurotoxicity in vivo in mice*. *Dis Model Mech*, 2014. **7**(9): p. 1057-68.
6. Bhutani, V.K. and L. Johnson, *Kernicterus in the 21st century: frequently asked questions*. *J Perinatol*, 2009. **29 Suppl 1**: p. S20-4.
7. Brito, M.A., et al., *Bilirubin injury to neurons: contribution of oxidative stress and rescue by glycoconjugate deoxycholic acid*. *Neurotoxicology*, 2008. **29**(2): p. 259-69.
8. Falcao, A.S., et al., *Cross-talk between neurons and astrocytes in response to bilirubin: adverse secondary impacts*. *Neurotox Res*, 2014. **26**(1): p. 1-15.
9. Hansen, T.W., *Mechanisms of bilirubin toxicity: clinical implications*. *Clin Perinatol*, 2002. **29**(4): p. 765-778.
10. Pediatrics, A.A.o., *Management of Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More Weeks of Gestation*. *Pediatrics*, 2004. **114**: p. 297-316.
11. Jacobs, S., et al., *Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(4): p. CD003311.
12. Globus, M.Y.T.A., O.; Dietrich, W.D.; Busto, R.; Ginsberg, M.D., *Glutamate Release and Free Radical Production Following Brain Injury: Effects of Posttraumatic Hypothermia*. *Journal of Neurochemistry*, 1995. **65**(4): p. 1704-1711.
13. Edwards, A.D.Y., X.; Squier, M.V.; Thoresen, M.; Cady, E.B.; Penrice, J.; Cooper, C.E.; Wyatt, J.S.; Reynolds, E.O.R.; Mehmet, H., *Specific Inhibition of Apoptosis After Cerebral Hypoxia-Ischemia By Moderate Post-Insult Hypothermia* *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **217**(3): p. 1193-1199.
14. Olusanya, B.O., T.A. Ogunlesi, and T.M. Slusher, *Why is kernicterus still a major cause of death and disability in low-income and middle-income countries?* *Arch Dis Child*, 2014. **99**(12): p. 1117-21.
15. *Clinical signs that predict severe illness in children under age 2 months: a multicentre study*. *The Lancet*, 2008. **371**(9607): p. 135-142.
16. Çoban, A., *Kernikterus (Bilirubin Ensefalopatisi)*, in *Pediyatri*, E.T. Neyzi O., Editor. 2002. p. 402-420.
17. Shapiro, S.M., *Bilirubin Toxicity in the Developing Nervous System*. *Pediatr Neurol*, 2003. **29**(5): p. 410-421.

18. Hansen, T.W.R., *Fetal and neonatal bilirubin metabolism*, in *Neonatal Jaundice*, W.J.F. Maisels M.J., Editor. 2000, Harwood Academic Publishers: Amsterdam. p. 3-20.
19. Maisels, M.J., *Neonatal Jaundice*. *Pediatr Rev*, 2006. **27**(12): p. 443-454.
20. Bhutani, V.K.J., L.; Sivieri, E.M., *Predictive ability of a predischage hour-specific serum bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in healthy term and near-term newborns*. *PEDIATRICS*, 1999. **103**: p. 6-14.
21. Maisels, M.J., et al., *Hyperbilirubinemia in the newborn infant > or =35 weeks' gestation: an update with clarifications*. *Pediatrics*, 2009. **124**(4): p. 1193-8.
22. Çoban, A.T., M.; Gürsoy, T., *Yenidoğan Sarılıklarında Yaklaşım, İzlem ve Tedavi Rehberi*. Türk Neonatoloji Derneği Rehberleri, 2014: p. 5-11.
23. Brodersen, R., *Bilirubin. Solubility and Interaction With Albumin and Phospholipid*. *J. Biol. Chem.*, 1979. **254**: p. 2364-2369.
24. Cardoso, F.L., D. Brites, and M.A. Brito, *Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches*. *Brain Res Rev*, 2010. **64**(2): p. 328-63.
25. Hansen, T.W.O.S.S., T.; Bratlid, D., *Effects of sulfisoxazole, hypercarbia, and hyperosmolality on entry of bilirubin and albumin into young rat brain regions*. *Biol Neonate*, 1989. **56**: p. 22-30.
26. Wennberg, R.P. and A.J. Hance, *Experimental bilirubin encephalopathy: importance of total bilirubin, protein binding, and blood-brain barrier*. *Pediatr Res*, 1986. **20**(8): p. 789-92.
27. Hansen, T.W., *Bilirubin entry into and clearance from rat brain during hypercarbia and hyperosmolality*. *Pediatr Res*, 1996. **39**(1): p. 72-6.
28. Gazzin, S., et al., *Modulation of Mrp1 (ABCC1) and Pgp (ABCB1) by bilirubin at the blood-CSF and blood-brain barriers in the Gunn rat*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16165.
29. Palmela, I., et al., *Elevated Levels of Bilirubin and Long-Term Exposure Impair Human Brain Microvascular Endothelial Cell Integrity*. *Current Neurovascular Research*, 2011. **8**(2): p. 153-169.
30. Kim, J. and Y. Jung, *Different expressions of AQP1, AQP4, eNOS, and VEGF proteins in ischemic versus non-ischemic cerebropathy in rats: potential roles of AQP1 and eNOS in hydrocephalic and vasogenic edema formation*. *Anat Cell Biol*, 2011. **44**(4): p. 295-303.
31. Hirrlinger, J., et al., *The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress*. *Journal of Neurochemistry*, 2001. **76**(2): p. 627-636.
32. Falcao, A.S., et al., *Bilirubin-induced immunostimulant effects and toxicity vary with neural cell type and maturation state*. *Acta Neuropathol*, 2006. **112**(1): p. 95-105.
33. Conlee, J.W.S., S.M., *Development of cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: a quantitative light microscopic analysis*. *Acta Neuropathol*, 1997. **93**(5): p. 450-460.
34. Shapiro, S.M., *Chronic bilirubin encephalopathy: diagnosis and outcome*. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2010. **15**(3): p. 157-63.

35. Brito, M.A., et al., *Unconjugated bilirubin differentially affects the redox status of neuronal and astroglial cells*. Neurobiol Dis, 2008. **29**(1): p. 30-40.
36. Dringen, R., *Metabolism and functions of glutathione in brain*. Progress in Neurobiology, 2000. **62**(6): p. 649-671.
37. Muramatsu, R., M. Ueno, and T. Yamashita, *Intrinsic regenerative mechanisms of central nervous system neurons*. Biosci Trends, 2009. **3**(5): p. 179-83.
38. Conforti, L., R. Adalbert, and M.P. Coleman, *Neuronal death: where does the end begin?* Trends Neurosci, 2007. **30**(4): p. 159-66.
39. Rodrigues, C.M.S., S.; Castro, R. E.; Lares, P. A.; Brites, D.; and Moura, J. J., *Perturbation of membrane dynamics in nerve cells as an early event during bilirubin-induced apoptosis*. J Lipid Res, 2002. **43**: p. 885-894.
40. Rodrigues, C.M.S., S.; Brito, M.A.; Brites, D.; Moura, J.J., *Bilirubin directly disrupts membrane lipid polarity and fluidity, protein order, and redox status in rat mitochondria*. J Hepatol, 2002. **36**: p. 335-341.
41. Brito, M.A.B., C.D.; Moura, J.J.; Brites, D., *Effects of molecular species on membrane dynamic properties of human erythrocyte membranes: a spin label electron paramagnetic resonance spectroscopy study*. Arch Biochem Biophys, 2001. **387**: p. 57-65.
42. Falcao, A.S., et al., *Apoptosis and impairment of neurite network by short exposure of immature rat cortical neurons to unconjugated bilirubin increase with cell differentiation and are additionally enhanced by an inflammatory stimulus*. J Neurosci Res, 2007. **85**(6): p. 1229-39.
43. Wang, J.Z. and F. Liu, *Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons*. Prog Neurobiol, 2008. **85**(2): p. 148-75.
44. Rodrigues, C.M., S. Sola, and D. Brites, *Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons*. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1186-95.
45. Vaz, A.R., et al., *Bilirubin selectively inhibits cytochrome c oxidase activity and induces apoptosis in immature cortical neurons: assessment of the protective effects of glycochenodeoxycholic acid*. J Neurochem, 2010. **112**(1): p. 56-65.
46. Bellefontaine, N., et al., *Nitric oxide as key mediator of neuron-to-neuron and endothelia-to-glia communication involved in the neuroendocrine control of reproduction*. Neuroendocrinology, 2011. **93**(2): p. 74-89.
47. Vaz, A.R., et al., *Selective vulnerability of rat brain regions to unconjugated bilirubin*. Mol Cell Neurosci, 2011. **48**(1): p. 82-93.
48. Hausteil, M.D., et al., *Acute hyperbilirubinaemia induces presynaptic neurodegeneration at a central glutamatergic synapse*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 23): p. 4683-93.
49. Liu, W., Y. Tang, and J. Feng, *Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system*. Life Sci, 2011. **89**(5-6): p. 141-6.

50. Allaman, I., M. Belanger, and P.J. Magistretti, *Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse*. Trends Neurosci, 2011. **34**(2): p. 76-87.
51. Amit, Y. and T. Brenner, *Age-dependent sensitivity of cultured rat glial cells to bilirubin toxicity*. Exp Neurol, 1993. **121**(2): p. 248-55.
52. Falcao, A.S., et al., *Influence of hypoxia and ischemia preconditioning on bilirubin damage to astrocytes*. Brain Res, 2007. **1149**: p. 191-9.
53. Silva, S.L., et al., *Features of bilirubin-induced reactive microglia: from phagocytosis to inflammation*. Neurobiol Dis, 2010. **40**(3): p. 663-75.
54. Graeber, M.B., *Changing face of microglia*. Science, 2010. **330**(6005): p. 783-8.
55. Fernandes, A., et al., *Inflammatory signalling pathways involved in astroglial activation by unconjugated bilirubin*. J Neurochem, 2006. **96**(6): p. 1667-79.
56. Brites, D., et al., *Biological risks for neurological abnormalities associated with hyperbilirubinemia*. J Perinatol, 2009. **29 Suppl 1**: p. S8-13.
57. Silva, S.L., et al., *Neuritic growth impairment and cell death by unconjugated bilirubin is mediated by NO and glutamate, modulated by microglia, and prevented by glyoursodeoxycholic acid and interleukin-10*. Neuropharmacology, 2012. **62**(7): p. 2398-408.
58. Genc, S., et al., *Bilirubin is cytotoxic to rat oligodendrocytes in vitro*. Brain Research, 2003. **985**(2): p. 135-141.
59. Nave, K.A., *Oligodendrocytes and the "micro brake" of progenitor cell proliferation*. Neuron, 2010. **65**(5): p. 577-9.
60. Christensen, R.D., et al., *Neonatal death suspected to be from sepsis was found to be kernicterus with G6PD deficiency*. Pediatrics, 2013. **132**(6): p. e1694-8.
61. Dennery, P.A., D.S. Seidman, and D.K. Stevenson, *Neonatal hyperbilirubinemia*. N Engl J Med, 2001. **344**(8): p. 581-90.
62. Gamaleldin, R., et al., *Risk factors for neurotoxicity in newborns with severe neonatal hyperbilirubinemia*. Pediatrics, 2011. **128**(4): p. e925-31.
63. Johnson, L.B., A.K.; Bhutani, V.K., *BIND: a clinical score for bilirubin induced dysfunction in newborns* Pediatr Suppl, 1999. **104**: p. 746.
64. Harris, M.C., et al., *Developmental Follow-Up of Breastfed Term and Near-Term Infants With Marked Hyperbilirubinemia*. Pediatrics, 2001. **107**(5): p. 1075-1080.
65. McDonagh, A.F., *Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium*. J Perinatol, 2001. **21 Suppl 1**: p. S7-S12.
66. Maisels, M.J., *Why use homeopathic phototherapy?* Pediatrics, 1996. **98**(2): p. 283-287.
67. Watchko, J.F., *Exchange transfusion in the management of neonatal hyperbilirubinemia*, in *Neonatal Jaundice Monographs in Clinical Pediatrics*, W.J.F. Maisels M.J., Editor. 2000, Harward Academic Publishers: Singapore. p. 169-176.
68. Özmert, E., et al., *Long-term follow-up of indirect hyperbilirubinemia in full-term Turkish infants*. Acta Paediatrica, 1996. **85**(12): p. 1440-1444.

69. Watchko, J.F.C., D., *Kernicterus in premature infants: current prevalence and relationship to NICHD Phototherapy Study exchange criteria*. Pediatrics, 1994. **93**: p. 996-999.
70. Watchko, J.F.O., F.A., *Kernicterus in preterm newborns: past, present, and future*. Pediatrics, 1992. **90**: p. 707-715.
71. Alcock, G.S. and H. Liley, *Immunoglobulin infusion for isoimmune haemolytic jaundice in neonates*. Cochrane Database Syst Rev, 2002(3): p. CD003313.
72. Urbaniak, S.J., *ADCC (K-Cell) Lysis of Human Erythrocytes Sensitized with Rhesus Alloantibodies*. British Journal of Haematology, 1979. **42**(2): p. 315-328.
73. Gottstein, R., *Systematic review of intravenous immunoglobulin in haemolytic disease of the newborn*. Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition, 2003. **88**(1): p. 6F-10.
74. Dağoğlu, T.O., F., *İndirekt Hiperbilirubinemi*, in *Neonatoloji*. 2000. p. 443-460.
75. Kappas, A.D., G.S.; Henschke, C.; Vales, T., *Direct comparison of Sn-mesoporphyrin, an inhibitor of bilirubin production, and phototherapy in controlling hyperbilirubinemia in term and near-term newborns*. Pediatrics, 1995. **95**(4): p. 468-474.
76. Suresh, G.K., C.L. Martin, and R.F. Soll, *Metalloporphyrins for treatment of unconjugated hyperbilirubinemia in neonates*. Cochrane Database Syst Rev, 2003(2): p. CD004207.
77. Levene, M.I., et al., *Comparison of Two Methods of Predicting Outcome in Perinatal Asphyxia*. The Lancet, 1986. **327**(8472): p. 67-69.
78. Vanucci, R.C., *Current and potentially new management strategies for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy*. Pediatrics, 1990. **85**: p. 961-968.
79. Inder, T.E. and J.J. Volpe, *Mechanisms of perinatal brain injury*. Semin Neonatol, 2000. **5**(1): p. 3-16.
80. Williams, C.E.G., A.; Gluckman, P.D., *Time course of intracellular edema and epileptiform activity following prenatal cerebral ischemia in sheep*. Stroke, 1991. **22**: p. 516-521.
81. Akisu, M., et al., *Selective head cooling with hypothermia suppresses the generation of platelet-activating factor in cerebrospinal fluid of newborn infants with perinatal asphyxia*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2003. **69**(1): p. 45-50.
82. Eicher, D.J., et al., *Moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: safety outcomes*. Pediatr Neurol, 2005. **32**(1): p. 18-24.
83. Gluckman, P.D., et al., *Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial*. The Lancet, 2005. **365**(9460): p. 663-670.
84. Battin, M.R., et al., *Treatment of Term Infants With Head Cooling and Mild Systemic Hypothermia (35.0 C and 34.5 C) After Perinatal Asphyxia*. Pediatrics, 2003. **111**(2): p. 244-251.

85. Inder, T.E., et al., *Randomized trial of systemic hypothermia selectively protects the cortex on MRI in term hypoxic-ischemic encephalopathy*. J Pediatr, 2004. **145**(6): p. 835-7.
86. Lin, Z.L., et al., *Mild hypothermia via selective head cooling as neuroprotective therapy in term neonates with perinatal asphyxia: an experience from a single neonatal intensive care unit*. J Perinatol, 2006. **26**(3): p. 180-4.
87. Shankaran, S.L., A.; Wright, L.L.; Ehrenkranz, R.A.; Donovan, E.F.; Fanaroff, A.A.; Stark, A.R.; Tyson, J.E.; Poole, K.; Carlo, W.A.; Lemons, J.A.; Oh, W.; Stoll, B.J.; Papile, L.A.; Bauer, C.R.; Stevenson, D.K.; Korones, S.B.; McDonald, S., *Whole-body hypothermia for neonatal encephalopathy: animal observations as a basis for a randomized, controlled pilot study in term infants*. Pediatrics, 2002. **110**: p. 377-385.
88. Shankaran, S., et al., *Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy*. N Engl J Med, 2005. **353**(15): p. 1574-84.
89. Shankaran, S., et al., *Effect of depth and duration of cooling on deaths in the NICU among neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial*. JAMA, 2014. **312**(24): p. 2629-39.
90. Tang, X.N. and M.A. Yenari, *Hypothermia as a cytoprotective strategy in ischemic tissue injury*. Ageing Res Rev, 2010. **9**(1): p. 61-8.
91. Wan, Y.H., et al., *Therapeutic hypothermia (different depths, durations, and rewarming speeds) for acute ischemic stroke: a meta-analysis*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014. **23**(10): p. 2736-47.
92. Gancia, P. and G. Pomero, *Brain cooling and eligible newborns: should we extend the indications?* J Matern Fetal Neonatal Med, 2011. **24 Suppl 1**: p. 53-5.
93. Gancia, P. and G. Pomero, *Therapeutic hypothermia in the prevention of hypoxic-ischaemic encephalopathy: new categories to be enrolled*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012. **25 Suppl 4**: p. 94-6.
94. Wu, Y.W., et al., *Neuroimaging abnormalities in infants with congenital hemiparesis*. Pediatr Neurol, 2006. **35**(3): p. 191-6.
95. van der Worp, H.B., et al., *Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis*. Brain, 2007. **130**(Pt 12): p. 3063-74.
96. Harbert, M.J., et al., *Hypothermia is correlated with seizure absence in perinatal stroke*. J Child Neurol, 2011. **26**(9): p. 1126-30.
97. Hypothermia after Cardiac Arrest Study, G., *Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest*. N Engl J Med, 2002. **346**(8): p. 549-56.
98. Moler, F.W., et al., *Rationale, timeline, study design, and protocol overview of the therapeutic hypothermia after pediatric cardiac arrest trials*. Pediatr Crit Care Med, 2013. **14**(7): p. e304-15.
99. Vejchapipat, P., et al., *Intestinal energy metabolism after ischemia-reperfusion: Effects of moderate hypothermia and perfluorocarbons*. J Pediatr Surg, 2002. **37**(5): p. 786-90.
100. Hall, N.J., et al., *Mild controlled hypothermia in preterm neonates with advanced necrotizing enterocolitis*. Pediatrics, 2010. **125**(2): p. e300-8.

101. Drury, P.P., et al., *Mechanisms of hypothermic neuroprotection*. Clin Perinatol, 2014. **41**(1): p. 161-75.
102. Cechmanek, B.K., et al., *Very Mild Hypothermia (35 degrees C) Postischemia Reduces Infarct Volume and Blood/Brain Barrier Breakdown Following tPA Treatment in the Mouse*. Ther Hypothermia Temp Manag, 2015. **5**(4): p. 203-8.
103. Xiong, M., et al., *Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain*. Neurochem Int, 2011. **58**(6): p. 625-33.
104. McDonagh, A.F.A., F., *The ready isomerization of bilirubin IX- in aqueous solution*. Biochem 1972. **129**: p. 797-800.
105. Falcao, A.S., et al., *Bilirubin-induced inflammatory response, glutamate release, and cell death in rat cortical astrocytes are enhanced in younger cells*. Neurobiol Dis, 2005. **20**(2): p. 199-206.
106. Hanko, E., et al., *Recovery after short-term bilirubin exposure in human NT2-N neurons*. Brain Res, 2006. **1103**(1): p. 56-64.
107. Zhang, B., X. Yang, and X. Gao, *Taurine protects against bilirubin-induced neurotoxicity in vitro*. Brain Res, 2010. **1320**: p. 159-67.
108. Ostrow, J.D., L. Pascolo, and C. Tiribelli, *Reassessment of the unbound concentrations of unconjugated bilirubin in relation to neurotoxicity in vitro*. Pediatr Res, 2003. **54**(1): p. 98-104.
109. Vaz, A.R., et al., *Pro-inflammatory cytokines intensify the activation of NO/NOS, JNK1/2 and caspase cascades in immature neurons exposed to elevated levels of unconjugated bilirubin*. Exp Neurol, 2011. **229**(2): p. 381-90.
110. Alkan, T., et al., *Neuroprotective effects of MK 801 and hypothermia used alone and in combination in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats*. Arch Physiol Biochem, 2001. **109**(2): p. 135-44.
111. Chip, S., et al., *The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection*. Neurobiol Dis, 2011. **43**(2): p. 388-96.
112. Penn, A.A.E., D.R.; Hahn, J.S.; Stevenson, D.K., *Kernicterus in a full term infant*. Pediatrics, 1994. **93**: p. 1003-1006.
113. Soorani-Lunsing, I., H.A. Woltil, and M. Hadders-Algra, *Are moderate degrees of hyperbilirubinemia in healthy term neonates really safe for the brain?* Pediatr Res, 2001. **50**(6): p. 701-5.
114. Newman, T.B., Klebanoff, M.A., *Neonatal hyperbilirubinemia and long-term outcome: another look at the collaborative perinatal project*. Pediatrics, 1993. **92**: p. 651-657.
115. Bhutani, V.K., *Neonatal hyperbilirubinemia and the potential risk of subtle neurological dysfunction*. Pediatr Res, 2001. **50**(6): p. 679-80.
116. Khan, N.M. and T.B. Poduval, *Immunomodulatory and immunotoxic effects of bilirubin: molecular mechanisms*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(5): p. 997-1015.
117. Brito, M.A., D. Brites, and D.A. Butterfield, *A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes*. Brain Res, 2004. **1026**(1): p. 33-43.

118. Sasaki, M.G.-Z., M.; Huang, H.; Herring, W.J.; Ahn, S.; Ginty, D.D.; Dawson, V.E.; Dawson, T.M., *Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(15): p. 8617-8622.
119. Mancuso, C., et al., *Bilirubin as an endogenous modulator of neurotrophin redox signaling*. J Neurosci Res, 2008. **86**(10): p. 2235-49.
120. Wang, Y. and B.L. Tang, *SNAREs in neurons--beyond synaptic vesicle exocytosis (Review)*. Mol Membr Biol, 2006. **23**(5): p. 377-84.
121. Shi, H.B., et al., *Bilirubin potentiates inhibitory synaptic transmission in lateral superior olive neurons of the rat*. Neurosci Res, 2006. **55**(2): p. 161-70.
122. Parham, W., et al., *Therapeutic hypothermia for acute myocardial infarction: past, present, and future*. Crit Care Med, 2009. **37**(7 Suppl): p. S234-7.
123. Grocott, H.P. and K. Yoshitani, *Neuroprotection during cardiac surgery*. J Anesth, 2007. **21**(3): p. 367-77.
124. Williams, C.E.M., C.; Tan, W.; Gluckman, P.D., *Pathophysiology of perinatal asphyxia*. Clin Perinatol, 1993. **20**(2): p. 305-325.
125. Orrenius, S.B., M.J.; Kass, G.E.; Dypbukt, J.M.; Nicotera, P., *Calcium ions and oxidative cell injury*. Ann Neurol, 1992. **32**(Suppl.): p. s33-s42.
126. Choi, D.W., *Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death*. Trends Neurosci, 1995. **18**(2): p. 58-60.
127. Johnston, M.V., *Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain*. Brain Dev, 1995. **17**(5): p. 301-306.
128. Laptook, A.R., et al., *Quantitative relationship between brain temperature and energy utilization rate measured in vivo using 31P and 1H magnetic resonance spectroscopy*. Pediatr Res, 1995. **38**(6): p. 919-25.
129. McManus, T., et al., *Intraischemic hypothermia reduces free radical production and protects against ischaemic insults in cultured hippocampal slices*. J Neurochem, 2004. **91**(2): p. 327-36.
130. Nakashima, K.T., M.M., *Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization*. Stroke, 1996. **27**(5): p. 913-918.
131. Xu, L., et al., *Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade*. J Cereb Blood Flow Metab, 2002. **22**(1): p. 21-8.
132. Roelfsema, V., et al., *Window of opportunity of cerebral hypothermia for postischemic white matter injury in the near-term fetal sheep*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. **24**(8): p. 877-86.
133. Zhang, H., et al., *Mild hypothermia reduces ischemic neuron death via altering the expression of p53 and bcl-2*. Neurol Res, 2010. **32**(4): p. 384-9.
134. Schmitt, K.R., et al., *Hypothermia suppresses inflammation via ERK signaling pathway in stimulated microglial cells*. J Neuroimmunol, 2007. **189**(1-2): p. 7-16.

135. Yenari, M.A. and H.S. Han, *Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NFkappaB)*. *Neurochem Int*, 2006. **49**(2): p. 164-9.
136. Hansen, T.W., *Pioneers in the Scientific Study of Neonatal Jaundice and Kernicterus*. *Pediatrics*, 2000. **106**(2): p. E15.
137. Jacobs, S.E., et al., *Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(1): p. CD003311.
138. PI, S.S.M., et al., *OPTIMIZING COOLING STRATEGIES AT< 6 HOURS OF AGE FOR NEONATAL HYPOXIC-ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY (HIE)*.
139. Edwards, A.D., et al., *Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data*. *BMJ*, 2010. **340**: p. c363.
140. Davidson, J.O., et al., *Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy - Where to from Here?* *Front Neurol*, 2015. **6**: p. 198.



