



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI

ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA HEMOLİZE BAĞLI HİPERBİLİRÜBİNEMİ
MODELİNDE BİLİRÜBİN NÖROTOKSİSİTESİ VE
MELATONİNİN NÖRON KORUYUCU ETKİSİ**

DR. ASILAY PAZAR

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL, 2015



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI

ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA HEMOLİZE BAĞLI HİPERBİLİRÜBİNEMİ
MODELİNDE BİLİRÜBİN NÖROTOKSİSİTESİ VE
MELATONİNİN NÖRON KORUYUCU ETKİSİ**

DR. ASILAY PAZAR

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Eren ÖZEK

Prof. Dr. Berrak YEĞEN

İSTANBUL, 2015

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamada etik dışı davranışta bulunmadığımı, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar dahilinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Asilay PAZAR

09.03.2015

ÖNSÖZ

Pediyatriye başladığımda en büyük hayalimdi minik yüreklere dokunabilmek, acılarını dindirip masum gözlerindeki sevgiyi görebilmek... Bugün öyle başka bir heyecan var ki içimde, hayalimi gerçekleştirmenin mutluluğu artan sorumlulukların endişesiyle birleşiyor ve bu ufaklıklarla yolumuzun çok uzun olduğunu hissediyorum.

Onlar olmasaydı başaramazdım! Hayatımdaki o en özel insanlara teşekkür etmek istiyorum. Sadece tez döneminde değil tüm asistanlık eğitimim boyunca desteğini benden esirgemedi, bazen beni karşısına alıp kendi meslek hayatından örnekler vererek bu işin zorluğunu ve bir o kadar da keyifli olduğunu anlattı, bazen bu kadar farklı konularda bunca şeyi nasıl biliyor diye şaşkınlıktan kendimi alamadığım sonsuz bilgisiyle beni aydınlattı ve bazen de sürprizlerle motivasyonumu artırdı. Ama o hep çok mütevazı ve hoşgörülüydü, tanıdıkça kendisine sevgim ve saygım giderek derinleşti ve bir gün bana 'tez öğrencisi evlat gibi oluyor' dediğinde asistanlığım bitse de hep yanımda olacağını anladım. Sayın Prof. Dr. Eren Özek şimdiye kadar yaptıklarınıza ve bundan sonra yapacaklarınıza minnettarım.

Yüzünü hep gülerken gördüm, hastalara yaklaşımına ve bilgisine olduğu kadar yaşam enerjisine de hayranlık duydum, çok geniş pediyatri ailesinin her üyesiyle ayrı ayrı ilgilendi ve bunu severek yaptığını hepimize hissettirdi. Anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Gülnur Tokuç sonsuz teşekkürler.

'Hayvan deneyi nasıl bir şeymiş yapabilir miyim' diye düşünürken beni tüm zerafetiyle karşıladı, bilgisi ve tecrübesiyle çalışmama değer kattı Sayın Prof. Dr. Berrak Yeğen bana yepyeni hiç bilmediğim bir dünyanın kapılarını açtınız çok teşekkür ediyorum.

Bu tezin taşlı yollarında onlarla beraber yürüdüm, bitmek bilmeyen ricalarıma her seferinde sevgiyle ve sabırla cevap verdiler, ablalarım Yrd. Doç. Dr. Aslı Çınar Memişoğlu, Elif Bahadır, ağabeyim Dr. Akan Yaman ve çalışmamın her aşamasında alinteri olan ablam Meltem Kolgazi sizlere çok şey borçluyum.

Asistanlığımın en tatlı anılarını onlarla paylaştım, gece yarısı çiğ köfte yediğimizde oldu, yorgunluktan otururken uyuyakaldığımızda, yeri geldi aynı yastığı paylaştık, yeri geldi aynı çocuk için tek yürek olup uykusuz geceleri sabah ettik ve ölümde de düğünde de birlikteydik. Tüm yoldaşlarım aynı kaderi paylaştığım asistan arkadaşlarım hepinizin yolu açık olsun! Ve

başımın sıkıştığı her an komşu servisten koşup gelen arkadaş kelimesinin yetersiz kaldığı benim için kardeş kelimesine anlam kazandıran Dr. Ceren Özcan seninle hayat bir başka güzel!

Minicik bir bebekken bana gösterdiğin ilgi, sevgi ve şevkati bunca yıl sonra bu yaşımda beni kollarına aldığın her an aynı sıcaklığıyla hissediyorum. Bugün gelebildiğim yerde başardıklarım hayatımda güzel olan herşey senin eserin, en büyük şansım canım annem hep yanımda ol. Maneviyatıyla bana huzur veren çocukluğumdan beri başardığım her işte en büyük paya sahip biricik anneannem yüreğimde sadece senin için ayrılmış yerdesin. Ve bütün işleri benim adıma hallettiği halde bir kez bile şikayet ettiğini duymadığım, küçük kardeş şımarıklıklarımı hep aynı sevgi ve sabırla karşılayan ağabeyim iyi ki varsın!

Tezimi uzman doktor olduğumu hissettiğine emin olduğum ve varlığını hep canımda hissettiğim biricik babama ithaf ediyorum.

Dr. Asilay PAZAR

Mart 2015

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Bilirubin Metabolizması.....	3
2.1.1. Bilirubin Kimyasal Yapısı.....	3
2.1.2. Yenidoğanda Bilirubin Metabolizmasının Spesifik Özellikleri	4
2.2.Yenidoğan Bebeklerde İndirekt Hiperbilirubinemi.....	6
2.2.1.Yenidoğan Bebeklerde İndirekt Hiperbilirubinemi Nedenleri	6
2.2.2.Yenidoğan Bebeklerde İndirekt Hiperbilirubinemi Risk Faktörleri.....	8
2.3. Patolojik Hiperbilirubinemi Tanımı ve Nedenleri	10
2.4. Bilirubin Ensefalopatisi	12
2.4.1. Bilirubin Ensefalopatisinin Patofizyolojisi	13
2.4.1.1. Beyin Bilirubin Girişini ve Yükünü Belirleyen Faktörler	13
2.4.1.2. Bilirubin Nöronlarda Hücre Düzeyindeki Etkileri	15
2.4.1.3. AKB Nedeniyle Meydana Gelen Glial Reaktivite ve Disfonksiyon	17
2.4.1.4. Bilirubin Ensefalopatisinde Nöroinflamasyonun Rolü	19
2.4.1.5. Bilirubin Ensefalopatisinde Klinik Bulgular	21
2.5. Yenidoğanda İndirekt Hiperbilirubinemi Tedavisi	23
2.5.1. Fototerapi	23
2.5.2. Kan Değişimi.....	25
2.5.3. Farmakolojik Tedavi	27
2.5.3.1. İntravenöz İmmunglobulin	27
2.5.3.2. Fenobarbital.....	27
2.5.3.4. Metalloporfirinler	28
2.6. Hiperbilirubinemide Prognoz	28

2.7. Melatonin	32
2.7.1. Melatonin Tarihçesi ve Genel Bilgiler	32
2.7.2. Melatonin Üretim Yolağı	33
2.7.3. Melatonin Biyosentezi.....	36
2.7.4. Melatoninin Hücre Düzeyinde Etki Mekanizması ve Metabolizması.....	37
2.7.5. Melatoninin Vücut Üzerindeki Etkileri.....	40
2.7.5.1. Melatoninin Uyku ve Psikiyatrik Hastalıklar Üzerine Etkisi.....	40
2.7.5.2. Melatoninin Kemik Kütlesi Üzerine Etkisi.....	42
2.7.5.3. Melatoninin Migrene Bağlı Baş ağrısında Etkisi	42
2.7.5.4. Melatoninin Kontrasepsiyonda Etkisi	42
2.7.5.5. Melatoninin Yaşlanma Üzerine Etkisi	43
2.7.5.6. Melatoninin Termoregülasyon ve Biyolojik Saat Üzerine Etkisi	44
2.7.5.7. Melatoninin Kanserdeki Etkisi.....	44
2.7.5.8. Melatoninin Kalp Hastalıklarında Etkisi.....	45
2.7.6. Melatoninin Nöroprotektif Etki Mekanizmaları.....	45
2.7.6.1. Melatoninin Antioksidan Etkisi	45
2.7.6.2. Melatoninin İmmunomodülatuar Etkisi	50
2.7.6.3. Melatoninin Anti-İnflamatuar Etkisi.....	51
2.7.6.4. Melatoninin Anti Apoptotik Etkisi.....	53
2.7.7. Yenidoğan Hastalıklarında Melatonin	55
2.7.8. Melatonin ve Perinatal Beyin Hasarı	56
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	59
3.1. Deney düzeneğı.....	59
3.1.1. Hemoliz Modeli.....	59
3.1.2. Melatonin Dozu.....	60
3.2. Deney Grupları.....	60
3.2.1. Fenilhidrazin (FH) Grubu (n=24).....	60
3.2.2. Kontrol Grubu (n=24)	60
3.2.3. Fenildidrazin (FH) + Melatonin Tedavi Grubu (n=24).....	60
3.3. Deney protokolü.....	60
3.3.1. Doku Myeloperoksidaz Aktivitesi (MPO) Ölçümü	61
3.3.2. Dokuda Lipid Peroksidasyon ve Glutasyon (GSH) Tayini	61
3.3.3. Serumda TNF-alfa, IL-1beta, IL-10, BDNF Düzeyi Ölçümleri	62
3.3.4. Serum Bilirubin, Hemoglobin ve Hematokrit Düzeyi Ölçümleri	62
3.4. İstatistiksel Analiz	62
4. BULGULAR.....	63
4.1. Serumda TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve BDNF Düzeyleri.....	63

4.1.1. SerumTNF- α Düzeyi	63
4.1.2. SerumIL-1 β Düzeyi	64
4.1.3. SerumIL-10 Düzeyi	64
4.1.4. Serum BDNF Düzeyi	65
4.2. Beyin Lipid Peroksidasyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	66
4.3. Beyin Glutasyon İçeriğinin Değerlendirilmesi	67
4.4. Beyin Myeloperoksidaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	68
5. TARTIŞMA	70
KAYNAKLAR.....	83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1:	Bilirubin metabolizması	5
Şekil 2:	Kramer'in dermal zonlarına göre yaklaşık bilirubin değerleri	8
Şekil 3:	≥ 35 haftalık yenidoğanlarda postnatal yaş ve bilirubin seviyelerine göre risk nomogramı (23)	10
Şekil 4 A,B:	Kan beyin bariyeri ve astrositlerde AKB önlem mekanizmaları	14
Şekil 5 A,B:	Nöronal plazma membranı ile AKB'nin etkileşme modeli (A), AKB'nin nöronal fonksiyonları etkileme yolları (B)	16
Şekil 6:	Gestasyon yaşı 35 hafta ve üstü olan yenidoğanlarda fototerapi kılavuzu	24
Şekil 7:	Gestasyon yaşı 35 hafta ve üstü olan yenidoğanlarda kan değişimi kılavuzu	26
Şekil 8:	Memelilerde Melatonin Üretim Yolu	34
Şekil 9:	Melatonin sentezinde noradrenalinin rolü ve melatoninin kapiller dolaşıma salınımı	35
Şekil 10:	Melatonin Biyosentezi	37
Şekil 11:	MT 1 ve MT 2 Reseptör Aktivitesi	39
Şekil 12:	O ₂ Molekülünden Serbest Radikal Oluşumu	47
Şekil 13:	Melatoninin Antioksidan Fonksiyonu	49
Şekil 14:	Doku Hasarına Yol Açan İnflamatuar Yolda Melatoninin Etkileri	52
Şekil 15:	Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarında serumTNF- α düzeyleri	63
Şekil 16:	Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarında serum IL-1 β düzeyleri	64
Şekil 17:	Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarında serum IL-10 düzeyleri	65
Şekil 18:	Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarında serum BDNF düzeyleri	66
Şekil 19:	Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarına ait beyin MDA düzeyleri	67
Şekil 20:	Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarına ait beyin glutatyon (GSH) düzeyleri	68
Şekil 21:	Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarına ait MPOdüzeyleri	69

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Patolojik indirekt hiperbilirübinemi nedenleri	11
Tablo 2: Bilirubinin nöroinflamasyondaki rolü üzerine yapılan çalışmalar	20
Tablo 3: Bilirübine bağlı nörolojik disfonksiyonun skörlama sistemi	21
Tablo 4: Bilirübin ensefalopatisininakut ve kronik formda klinik bulguları.....	22

KISALTMALAR ve SİMGELER

AAP	: Amerikan Pediyatri Akademisi
AKB	: Ankonjuge bilirubin
BDNF	: Brain derived neurotrophic factor
BERA	: Beyin sapı işitsel potansiyelleri
Bf	: Serbest bilirubin
BIND	: Bilirubinün indüklediği nörolojik disfonksiyon
c AMP	: Siklik adenosin monofosfat
CREB	: c AMP responsive element binding
FH	: Fenilhidrazin
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GH	: Gestasyon haftası
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorür asit
IL-10	: Interlökin-10
IL-1β	: Interlökin-1 beta
İP	: İntraperitoneal
KBB	: Kan beyin bariyeri
MAPK	: Mitojen aktivatör protein kinaz

MDA	: Malondialdehid
MPO	: Myeloperoksidaz
MRP 1	: Multidrug resistance-associated protein 1
MT	: Melatonin reseptörü
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa beta
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOS	: Reaktif nitrojen ürünleri
O2-	: Süperoksit anyonu
OH	: Hidroksil radikali
ONOO-	: Peroksit nitrit
Pgp	: P-glycoprotein
RES	: Retiküloendoteliyal sistem
RHT	: Retinohipotalamik traktus
RO	: Alkoksil radikali
ROO	: Peroksil radikali
ROS	: Serbest oksijen radikalleri
SCG	: Superior cervical ganglion
SCN	: Suprachiasmatic nucleus
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSS	: Santral sinir sistemi
TNF-α	: Tümör necrosis factor-alfa

ÖZET

AMAÇ: Hemolizle oluşturulmuş deneysel hiperbilirubinemi sıçan modelinde nörotoksik hasarda melatoninin koruyucu etkisini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Deneyin başlangıcında, her biri 24 yenidoğan Sprague Dawley sıçandan meydana gelen 3 grup oluşturuldu. Grup 1 hemoliz -hiperbilirubinemi-nörotoksisite, Grup 2 kontrol ve Grup 3 melatonin tedavi grubu olarak belirlendi.

Grup 1' deki sıçanlara deneyin 0. ve 24. saatlerinde fenilhidrazin (75 mg/kg) intraperitoneal (İP) verilerek hemolize ikincil hiperbilirubinemi modeli oluşturuldu. Bu gruptaki sıçanlara 48. saatte melatoninle aynı volümde serum fizyolojik ile sulandırılmış etanol İP uygulandı.

Grup 3' teki sıçanlara deneyin 0. ve 24. saatlerinde etanol le çözdürülmüş melatonin (10 mg/kg) İP verildikten 30' ar dakika sonra fenilhidrazin (75 mg/kg) İP verildi. Deneyin 48. saatinde ise bu sıçanlara sadece melatonin (10 mg/kg) İP verildi.

Grup 2' ye 0., 24. ve 48. saatlerde melatoninle aynı volümde serum fizyolojik ile sulandırılmış etanol İP uygulandı.

Deneyin 54. saatinde tüm gruplar anestezi altında dekapite edilerek kan ve beyin dokusu örnekleri alındı. Kan örneklerinde TNF-alfa (TNF- α), IL-1beta (IL-1 β), IL-10, "brain derived neurotrophic factor (BDNF)" düzeyleri; beyin dokusu örneklerinde ise malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH) ve myeloperoksidaz (MPO) düzeyleri değerlendirildi.

BULGULAR: Grup 1' de ortalama hemoglobin ve hematokrit düzeyleri, Grup 2' ye kıyasla anlamlı şekilde düşük saptanırken, Grup 1' in serum total bilirubin ve direkt bilirubin düzeyleri Grup 2' ye göre anlamlı şekilde yüksek bulundu.

Grup 1' de proinflatuar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β düzeyleri, Grup 2' ye kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulundu. Grup 3' te TNF- α ve IL-1 β düzeyleri, Grup 1' e göre anlamlı derecede düşük idi. Grup 2' de IL-10 Grup 1' e göre anlamlı şekilde yüksek iken, Grup 3' te de IL-10 Grup 1' e göre anlamlı şekilde yüksek bulundu.

Grup 1' de BDNF, Grup 2' ye göre anlamlı derecede düşük bulunmuş olup; Grup 3' te ise BDNF düzeyi Grup 1' den anlamlı olarak daha yüksek idi.

Grup 1' de beyin dokusu örneklerinde MDA düzeyi ve MPO aktivitesi, Grup 2'ye kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulundu. MDA ve MPO düzeylerindeki artış, Grup 3' te gerilemişti. Beyin dokusunda antioksidan GSH miktarları değerlendirildiğinde, Grup 1' de GSH düzeyinin Grup 2' ye kıyasla anlamlı şekilde düştüğü ve Grup 3' de bu düşüşün anlamlı şekilde engellendiği gözlemlendi.

SONUÇ: Bu çalışma, melatoninin hemoliz-hiperbilirubinemi modelinde nöroprotektif etkisinin olabileceğini göstermektedir.

ABSTRACT

AIM: To investigate the neuroprotective effect of melatonin in an experimental hemolysis-hyperbilirubinemia model in rat brain.

MATERIAL AND METHOD: We used Sprague Dawley rats for the experiment. The study consisted of 3 groups. Twentyfour newborn rats were assigned to each group. Group-1 was hemolysis-hyperbilirubinemia-neurotoxicity group, Group-2 control group, and Group-3 melatonin intervention group.

In Grup-1 rats, hyperbilirubinemia model secondary to hemolysis was generated by administration of intraperitoneal (IP) phenylhydrazine hydrochloride (75 mg/kg) at 0th and 24th hours of the experiment. In this group, the same volume of diluted ethanol by 0.09% saline solution was given at 48th hours.

In Group-2 rats, IP diluted ethanol by saline was given in the same volume at 0th, 24th and 48th hours.

In Group-3 rats, melatonin (10 mg/kg) was administered intraperitoneally at 0th and 24th hours, and 30 minutes after each melatonin administration, IP phenylhydrazine hydrochloride (75 mg/kg) was given. At 48 hours of the experiment, these rats received solely intraperitoneally melatonin (10 mg/kg).

At the 54th hours of the experiment, all groups were sacrificed by decapitation under general anesthesia, and then blood samples and brain tissues were obtained.

In the blood samples, TNF-alpha (TNF- α), IL-1beta (IL-1 β), IL-10, "brain derived neurotrophic factor (BDNF)" levels were assessed. In the samples of brain tissues, malondialdehyde (MDA), glutatyon (GSH) ve myeloperoxydase (MPO) levels were measured.

RESULTS: The levels of the mean hemoglobin and hematocrit in Group-1 were found to be significantly lower compared to Group-2, whereas the total and direct bilirubin levels of Group-1 were significantly higher than those of Group-2.

Significantly increased TNF- α and IL-1 β levels were found in Group-1 compared to Group-2. In Group-3 , TNF- α and IL-1 β levels were significantly lower than those in Group-1. While IL-10

level in Group-2 was significantly higher compared to Group-1, the IL-10 levels of Group-3 were found to be significantly higher than those of Group-1.

In Group-1, BDNF levels were detected to be significantly lower compared to Group-2. BDNF levels in Group-3 were significantly higher than those of Group-1.

In the samples of brain tissues of Group-1 rats, MDA and MPO activities were found to be significantly higher compared to Group-2 rats. This increment of MDA and MPO levels were significantly regressed in Group-3. Considering antioxidant GSH amounts in brain tissue, GSH levels in Group-1 were significantly lower compared to Group-2 and this decline was significantly hindered in Group-3 by melatonin.

CONCLUSION: This study showed that melatonin might have a neuroprotective effect in a hemolysis-hyperbilirubinemia model in newborn rats.

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Yenidoğan döneminde indirekt hiperbilirübinemi birçok ülkede halen önemli bir halk sağlığı sorunudur (1). Sağlıklı term bebeklerin % 65-70'inde indirekt hiperbilirübinemi görülürken, bu oran preterm bebeklerde % 80'lere çıkmaktadır (2).

Doğum sonrası bilirübinin fizyolojik yükselişi, ekstrauterin hayata adaptasyonun sonucudur çünkü bilirübin güçlü bir antioksidandır (3). Buna karşın; risk grubundaki yenidoğan bebeklerde yüksek indirekt hiperbilirübinemi, uygun yaklaşım yapılmadığı takdirde, akut ve kronik bilirübin ensefalopatisine, minimal nörolojik disfonksiyondan, işitme kaybı, koreatetoid serebral palsi ve mental retardasyona kadar varan kalıcı nörolojik sekellere sebep olabilmektedir (2).

Nöronal hasar oluşumunun fizyopatolojisinde anlaşılamayan noktalar olmakla beraber; bilirübin düzeyi, bilirübine maruziyet süresi, hemolizin varlığı ve prematürelilik gibi birçok faktör nörotoksisitede önemli rol oynamaktadır (4). Klinikte bilirübine bağlı nörotoksisite, çoğunlukla hemoliz sonrasında görülmektedir. Yenidoğanın hemolitik hastalığında görülen nörotoksisite, konjuge olmayan bilirübinin santral sinir sisteminin (SSS) belli bölgelerinde birikimi ve toksik etkisi ile açıklanmaktadır (5). Hemoliz nedeni ile oluşan hiperbilirübineminin nörotoksik etkisi tartışılmaz olmakla birlikte, hemoliz sonucu oluşan diğer metabolitlerinde bu etkide rolü olması olasıdır. Bu nedenle hemoliz-hiperbilirübinemi modeli ile oluşturulacak nörotoksisitenin kliniğe daha gerçekçi bir ışık tutacağı düşünülmüştür.

Hiperbilirübineminin erken tanı ve uygun tedavisi ile ağır morbiditenin önüne geçilebilirse de, minimal nörolojik disfonksiyonu önlemek her zaman mümkün olamamaktadır ve bu nedenle indirekt hiperbilirübinemi, günümüz yenidoğan acil pratiğinde önemini korumaktadır (2,6).

Melatonin hormonu son yıllarda tüm dünyada artan bir ilgiyle araştırılmaktadır. Ana görevi vücudun biyolojik saatini koruyup ritmini ayarlamak olan melatonin, vücudun birçok biyolojik ve fizyolojik süreçlerinde yer alır. In vitro çalışmalarda iskemik ve hipoksik beyin hasarında melatoninin nöron koruyucu etkisi gösterilmiştir (7).

Bilirübine sekonder nörotoksisitede melatoninin yeri henüz araştırılmamıştır. Melatoninin; antioksidan, antiapoptotik, sitoprotektif, immünmodülatuar, antiinflamatuvar etkileriyle bilirubin nörotoksisitesinin önlenmesi ve tedavisinde rolü olabilir ve araştırmaya değer görünmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız hemoliz ile hiperbilirubinemi oluşturulan sıçan modelinde gelişen nörotoksisitede melatoninin koruyucu etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Sarılık, hiperbilirubineminin gözle görülen bulgusudur ve yenidoğan döneminin en sık karşılaşılan sorunlarından birisidir (1). Genellikle geçici bir durum olmakla birlikte; yenidoğan sarılığının, doğum sonrası ilk hafta içinde hastaneye yatışların en sık nedenlerinden birisi olduğu bilinmektedir (9).

Yenidoğan sarılıklarının büyük bir kısmı selim seyirli olup sekelsiz iyileşir. Ancak, yüksek indirekt bilirubin seviyesi nörotoksik etkisiyle yenidoğanda değişen spektrumda nörolojik hasara neden olabilmektedir (10).

2.1. Bilirubin Metabolizması

Bilirubin %75'i yaşlanmış eritrositlerin retikuloendotelial sistem (RES)'de lizisi sonucu meydana gelir. Bilirubin geri kalan bölümü (%25) ise miyogloblin, sitokrom, katalaz, siklooksijenaz, guanil siklaz, nitrik oksit sentetaz ve peroksidaz gibi hemoproteinlerin yıkımı ile oluşur (11) (Şekil 1).

Hemoglobin, önce ATP tarafından katalizlenen ve mikrozomal bir enzim olan hem oksijenaz enzimi ile biliverdine döner. Oluşan her molekül biliverdin için bir molekül karbonmonoksit (CO) oluşur. Karboksihemoglobin veya ekspirasyondaki CO ölçümü bilirubin üretimini gösteren bir indikatördür. Biliverdin, daha sonra sitozolik bir enzim olan biliverdin redüktaz ile bilirubine dönüştürülür (11) (Şekil 1).

2.1.1. Bilirubin Kimyasal Yapısı

Bilirubin, üç tek karbon köprüsüyle birbirine bağlanmış dört pirol halkasından oluşur. Ortadaki karbon köprüsü, orta 2 pirol halkasına tek olarak bağlanır, yanlardaki 2 karbon köprüsü ise diğer iki pirol halkasına çift bağla bağlanır. Bu çift bağlarda 2 farklı konfigürasyon olabilir. Bunlardan birine Z (Almanca zusammen = beraber), diğerine E (Almanca entgegen=karşılıklı) denir. Ana molekül olan hemde bu çift bağlar Z konumunda olduğu için bilirubin de 4Z, 15Z bilirubin IX α adını alır. Bu molekülün üç boyutlu yapısında, bütün polar gruplar molekül içinde bulunduğundan hidrofobik ve lipofilik bir özellik kazanır. Membranlardan geçişi kolaylaştıran bu lipofilik özellik, intramoleküler hidrojen bağları sayesinde ortaya çıkar. Lipofilik özellik intrauterin dönemde plasenta yoluyla temizlenmeyi

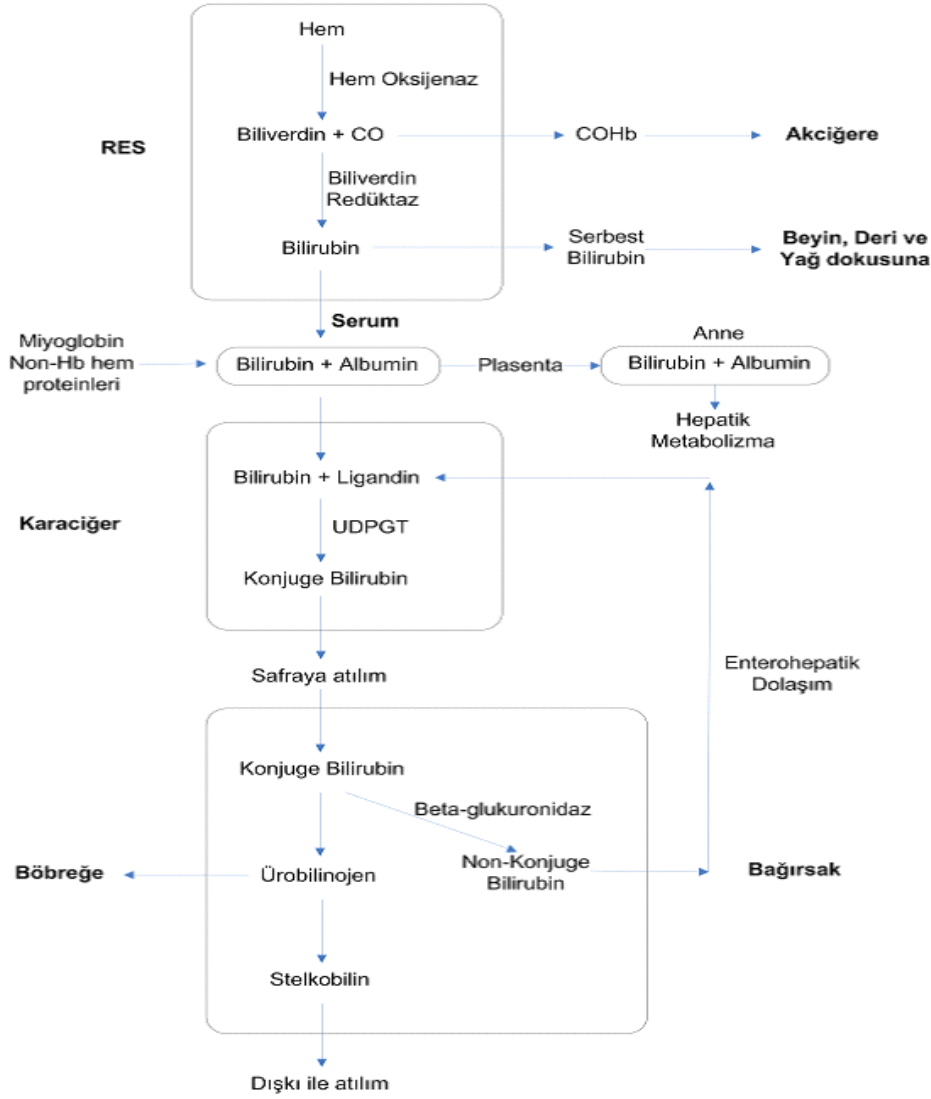
sağlarken, postnatal dönemde bilirübinin kan-beyin bariyerini (KBB) kolayca geçebilmesine ve zararlı etkilerinin ortaya çıkmasına neden olur (12).

RES'den dolaşıma salınan bilirübine, bilirübin ölçümü için kullanılan diazo yöntemiyle indirekt reaksiyon verdiği için indirekt bilirübin veya konjuge olmamış bilirübin (ankonjuge bilirübin=AKB) denir ve pH 7,4'te suda çözünmez (11). AKB serum albüminine bağlanarak karaciğere taşınır, çok az kısmı ise serbest halde (serbest AKB) bulunur. Albümin üzerinde biri yüksek, diğeri daha düşük afiniteli iki bağlama bölgesi vardır ve 1 gr albümin teorik olarak 8,5 mg bilirübin bağlar. Albümine bağlı olarak karaciğere gelen AKB, bir taşıyıcı aracılığı ile hepatosit zarından hücre içine taşınır. Burada öncelikle Y-proteinine (ligandin), daha düşük afinite ile de Z-proteinine bağlanır. Daha sonra endoplazmik retikuluma taşınan bilirübin, üridin difosfat glukuronozil transferaz enziminin katalizör etkisi ile konjuge edilerek UDP-glukuronik asit ve bu asitin tuzlarına dönüştürülür (12) (Şekil 1).

Yenidoğanda ilk 48 saatte yalnızca monoglukuronidler, daha sonra ise diglukuronidler oluşmaktadır. Konjuge bilirübin diazo yöntemi ile direkt reaksiyon verdiği için direkt bilirübin olarak da adlandırılır. Konjuge olan ve suda çözünür hale gelen bilirübin aktif transportla safraya atılır. Daha sonra bağırsak ve az miktarda da böbrek yoluyla vücudu terk eder (11,13).

2.1.2. Yenidoğanda Bilirübin Metabolizmasının Spesifik Özellikleri

Bilirübinin bağırsaklar tarafından uzaklaştırılması sırasında, safra yoluyla bağırsağa atılan bir miktar konjuge bilirübin, yenidoğan bebeğin bağırsağında bulunan β -glukuronidaz enzimi ile AKB'e dönüştürülür ve tekrar dolaşıma geçerek bilirübin yükünü artırabilir. Bu yola enterohepatik dolaşım denir ve yenidoğanın gelişimsel hiperbilirübinemisinde önemli rol oynar (13). Bağırsağa geçen bilirübinin yaklaşık %25'inin geri emildiği düşünülmektedir. Yenidoğanda enterohepatik dolaşımı artıran faktörler; bağırsak motilitesinin az olması, mekonyum pasajının gecikmesi ve konjuge bilirübini AKB'e çeviren β -glukuronidaz enzim aktivitesinin yüksek olmasıdır (1).



Şekil 1: Bilirubin metabolizması

Yenidoğanlarda β -glukuronidaz enziminin yüksek konsantrasyonda olması nedeniyle enterohepatik dolaşım önemlidir ve gelişimsel hiperbilirubinemiye katkıda bulunur. Bağırsağa geçen bilirubin en çok duodenum ve kolondan emilir. Yenidoğanda bağırsak florasının henüz gelişmemiş olması, bilirubinün ürobilinojene dönüşümünü azalttığı için bağırsaktaki bilirubin yükü artar (14). Erişkinlerde ise bağırsağa gelen bilirubinün çoğu, bakteriler tarafından bilirubinoidlere (sterkobilin, ürobilinojen) dönüştürülür. Sterkobilin feçesle, ürobilinojen idrarla atılır. Çok az bir bölüm ise hidrolize olarak indirekt bilirubine dönüştürülür ve enterohepatik dolaşım ile karaciğere geri döner (15).

Fetal bilirubinün başlıca atılım yolu ise plasentadır. Fetal plazma bilirubinünün neredeyse tümü indirekt bilirubin olduğundan, plasentadan anne dolaşımına geçmekte ve sonra da maternal karaciğer tarafından atılmaktadır. Bu nedenle yenidoğanlar ağır hemolitik hastalık dışında

nadiren sarılık ile doğarlar. Direkt bilirubin ise plasentayı geçemez ve fetal plazma ve diğer dokularda birikebilir (16).

2.2.Yenidoğan Bebeklerde İndirekt Hiperbilirubinemi

2.2.1.Yenidoğan Bebeklerde İndirekt Hiperbilirubinemi Nedenleri

İndirekt hiperbilirubinemi ve buna bağlı olarak gelişen sarılık, yenidoğan bebeklerde sıklıkla görülen ve çoğunlukla selim seyir gösteren bir problemdir. Doğumu takiben yenidoğan bebeğin bilirubin metabolizması, esas olarak yağda çözünen bilirubinın plasenta aracılığıyla kandan temizlendiği fetal evreden, bilirubinın karaciğerde konjuge edilerek suda çözünür hale getirildiği ve safra yolları aracılığıyla gastrointestinal sisteme aktarıldığı erişkin evreye geçer (17).

Gelişimsel hiperbilirubinemi birçok yenidoğan bebeğin postnatal dönemde yaşadığı bir olgu olup; ligandinlerin yetersizliği, üridin-difosfat-glukuronoziltransferaz enzim aktivitesinin düşüklüğü, enterohepatik dolaşım ve yenidoğanda eritrosit kitlesinin yüksek ancak ömrünün kısa olması ile açıklanmaktadır (15,17).

Yenidoğanda indirekt hiperbilirubinemi birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkabilir. Hemolitik anemiler, polisitemi, immatürite, transfüzyona bağlı olarak eritrositlerin ömrünün kısa olması, artmış enterohepatik dolaşım ve enfeksiyon, karaciğerin metabolize etmesi gereken bilirubin yükünü artırarak; genetik yetersizlikler, hipoksi, enfeksiyon, hipotermi ve tiroid bezi yetersizliği transferaz enzimlerinin aktivitesini düşürerek; çeşitli ilaçlar (vitamin K3, novobiosin) ve diğer bazı maddeler glukuronik asit konjugasyonu için bilirubinle yarışarak veya konjugasyonu durdurarak; bazı genetik defektler, düşük doğum ağırlığı ve prematürite, konjugasyon için gerekli enzimlerin yetersiz çalışmasına veya hiç çalışmamasına neden olarak yenidoğanda indirekt hiperbilirubinemiye yol açabilirler (18). Erkek cinsiyet, yüksek rakım, polisitemi, sefal hematoma, yetersiz kalori alımı, dehidratasyon ve mekonyum çıkışının gecikmesi de bilirubin düzeyinin artmasında etkilidir (19). Annede diyabet varlığı, anne yaşının ileri olması, annenin sigara kullanıyor olması, annede oksitosin indüksiyonu yapılması ve doğum şekli (vaginal yolla doğan bebeklerde sezaryen ile doğan bebeklere göre daha yüksek bilirubin değerleri görülür) farklı mekanizmalar ile bilirubin düzeylerinin yükselmesine katkıda bulunur (19). Anne sütü ile beslenen bebeklerde indirekt

hiperbilirubinemi formül süt ile beslenen bebeklere göre daha sık görülür (20,21). İndirekt hiperbilirubinemi riski bazı ırklarda (Çinli, Japon, Koreli ve Amerika yerlileri) daha yüksektir. Bu durum ırklara bağlı olarak konjugasyon yeteneğindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Aile bireylerinde ciddi hiperbilirubinemi saptanmış olması da yenidoğanda indirekt hiperbilirubinemi için risk faktörüdür (1,20).

Sarılık, nedene bağlı olarak, doğum anından itibaren tüm yenidoğan dönemi boyunca herhangi bir anda ortaya çıkabilir. Genellikle önce yüzde fark edilir, bilirubin serum seviyesi arttıkça karın cildi ve bacaklarda da gözlemlenir (17) (Şekil 2).



Dermal zon	ortalama $\pm$ SD (mg/dl)	ortalama $\pm$ SD (μ mol/l)
1	5.9 $\pm$ 0.3	101 $\pm$ 5
2	8.9 $\pm$ 1.7	152 $\pm$ 29
3	11.8 $\pm$ 1.8	201 $\pm$ 31
4	15.0 $\pm$ 1.7	257 $\pm$ 29
5	>15.0	>257

Şekil 2: Kramer'in dermal zonlarına göre yaklaşık bilirubin değerleri (2).

2.2.2.Yenidoğan Bebeklerde İndirekt Hiperbilirubinemi Risk Faktörleri

Amerikan Pediatri Akademisinin (AAP) 2004 yılında yayınladığı klinik uygulama kılavuzuna göre gestasyon haftası ≥ 35 hafta olan yenidoğanlarda hiperbilirubinemi gelişimi açısından risk faktörleri tanımlanmıştır. Major, minör ve düşük risk grubu olarak tanımlanan faktörler şunlardır (22):

Major Risk Faktörleri:

- Hastaneden taburcu edilmeden önceki total serum bilirubini veya transkutanöz bilirubin düzeyinin, bilirubin risk zonlarını belirleyen eğrilerde yüksek riskli zonda olması (Şekil 3).
- Sarılığın ilk 24 saatte görülmesi.
- İzomün hemolitik hastalık, kan grubu uyumsuzluğu bulunması, eritrosit enzim veya membran defektleri, kanıtlanmış hemoliz olması.
- Gestasyonel yaşı 35-36 hafta arası olması.
- Daha öncesinde başka kardeşin fototerapi almış olması.

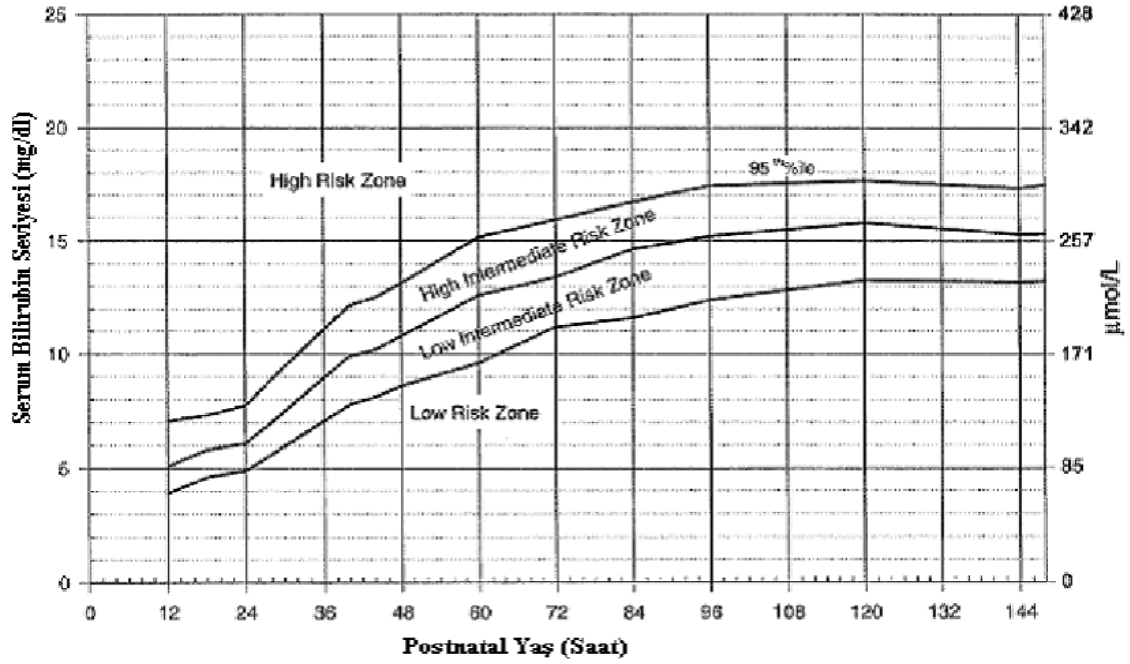
- Sefal hematoma veya yaygın ekimozun bulunması.
- Sadece anne sütü ile beslenme (özellikle emzirme iyi gitmiyor ve aşırı tartı kaybı varsa).
- Doğu Asya ırkı.

Minör Risk Faktörleri:

- Hastaneden taburcu edilmeden önceki total serum bilirübin veya transkutanöz bilirübin düzeyinin yüksek-orta riskli zonda olması.
- Gestasyonel yaşın 37-38 hafta arası olması.
- Hastaneden taburcu edilmeden önce sarılık gözlemlenmesi.
- Daha önceki kardeşlerde sarılık öyküsü olması.
- Diyabetik annenin makrozomik çocuğu.
- Anne yaşının ≥ 25 yaş olması.
- Erkek cinsiyet.
- Polistemi.

Düşük Risk Grubu:

- Total serum bilirübin veya transkutanöz bilirübin düzeyinin düşük riskli zonda olması.
- Gestasyonel yaşın ≥ 41 hafta olması.
- Sadece formül süt ile beslenme.
- Siyah ırk.
- Hastaneden taburculuğun doğum sonrası 72. saatten sonra yapılmasıdır.



Şekil 3: ≥ 35 haftalık yenidoğanlarda postnatal yaş ve bilirubin seviyelerine göre risk nomogramı (23)

2.3. Patolojik Hiperbilirubinemi Tanımı ve Nedenleri

- İndirekt hiperbilirubinemi ilk 24-36. saatten önce başlamışsa,
- Total serum bilirubin seviyesinin artış hızı 5 mg/dL/gün'den fazla ise,
- Saatlik bilirubin yükselme hızı >0.2 mg/dl/saatten fazla ise,
- Total serum bilirubin değeri >95 persentilin üstünde ise veya persentil atlıyorsa,
- Serum direkt bilirubin seviyesi total serum bilirubin <5 mg/dl olduğu durumda, >1 mg/dl veya total serum bilirubin seviyesi >5 mg/dl olduğunda $>20\%$ ise,
- Sarılık term bebeklerde 2 haftadan, prematüre bebeklerde 3 haftadan fazla sürüyorsa patolojik hiperbilirubinemi düşünülmelidir.

Bu bulguların dışında ailede hemolitik hastalık hikayesi varlığı, yenidoğanda solukluk, anemi, hepatomegali, splenomegali, kusma, letarji, beslenme problemleri, aşırı tartı kaybı, apne, bradikardi, vital bulgulara bozukluk, açık renkli dışkılama, kernikterus bulguları ve idrarda bilirubin varlığında patolojik yenidoğan sarılığı düşünülmelidir. Fototerapiye rağmen bilirubin

seviyesinin yetersiz düşüşü veya yükselmesi de yine patolojik sarılığı düşündürmelidir ve etiyoloji açısından araştırılmalıdır (24) (Tablo 1).

❖ Bilirubin yapımında artış
➤ Hematolojik hastalık
• immün mekanizmalar
○ Rh alloimmunizasyonu
○ ABO ve diğer kan grubu uyumsuzlukları
➤ Kalıtsal
• Eritrosit membran defektleri (sferositoz, eliptositoz, stomasitoz, piknositoz)
• Eritrosit enzim defektleri (glukoz_6_fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği)
➤ Hemoglobinoopatiler (alfa talasemi, beta talasemi)
➤ Bilirubin yapımının artışı ile ilgili diğer nedenler
• Sepsis
• Polisitemi
• Dissemine intravasküler koagülopati
• Ekstravazasyon (hematom, pulmoner, serebral kanama)
• Diyabetik annenin makrozomik bebeği
➤ Bilirubin enterohepatik dolaşımının artması ya da ileus (anne süt sarılığı, pilör stenozu, ince/kalın barsak obstruksiyonu)
❖ Bilirubin klirensinde azalma
• Prematürite
• Glukoz_6_fosfat dehidrogenaz eksikliği
• Metabolik
○ Galaktozemi, hipermetiyoninemi, tirozinemi vb.
○ Crigler Najar sendromu
○ Hipotiroidizm
○ Hipopituitarizm

Tablo 1: Patolojik indirekt hiperbilirübinemi nedenleri

2.4. Bilirubin Ensefalopatisi

‘Kernikterus’ Almanca bir kelime olup, ileri düzey sarılık sonucu ölen bebeklerin bazal ganglialarının sarı renge boyanmasının tesbiti nedeniyle ilk kez 1903 yılında Christian Schmorl tarafından kullanılmıştır (25). Bilirubin ensefalopatisi ise, bilirubin toksisitesinin neden olduğu SSS bulgularını tarif eder. AAP’nin hiperbilirübinemi alt komitesi; ilk bir haftada görülen bilirubin toksisitesi bulguları için “akut bilirubin ensefalopatisi” terimini, kronik ve kalıcı sekel için ise “kernikterus” terimini kullanmayı önermektedir (25).

Kernikteruslu infantların otopsilerinde AKB, makroskopik olarak globus pallidus, hipokampus, lateral ventrikül duvarları, serebellum ve subtalamik çekirdeklerde görülür. Bu bölgeler AKB'nin spesifik beyin alanlarında depolanmasını yansıtır.

Bilirübinin indüklediği nörolojik disfonksiyon (BIND) insidansını düşürmek amacıyla önerilen rehber ve normogramlar özellikle küçük pretermli söz konusu olduğunda, nörogelişimsel matürite farkı ve prediktif değerlerin olmaması nedeniyle yetersiz kalmaktadır (26,27).

SSS'nin AKB toksisitesine hassasiyeti için bir pencere döneminden bahsedilmiş ve nörogelişimsel yaştan selektif nöropatolojik hasarın lokalizasyonunu etkileği öne sürülmüştür (28). İşitsel baskın kernikterus subtipi daha erken gestasyon haftasında (GH) doğan ve yüksek AKB'e maruz kalan infantlarda görülürken, motor kernikterus subtipi 34 GH'dan daha büyük infantlarda sık görülmektedir (29).

Hayvan çalışmalarında, yaşamın ilk haftasında hiperbilirubinemi geliştiğinde, yaşamın ikinci haftasında hiperbilirubinemi gelişenlere göre mortalite daha yüksek saptanmış olup bu durum postnatal yaş ile gelen edinsel bir dirençle ilişkilendirilmektedir (30,31).

Yenidoğan sarılığı ağır veya uzun süreli olduğunda öğrenme ve hafızayı etkileyebilir, hatta orta düzey AKB düzeyleri bile gelişim geriliği, dikkat eksikliği, otizm ve izole sinirsel işitme kaybı ile sonuçlanabilir (4,29).

Hiperbilirubineminin nörolojik mi ya da gelişimsel bir problem mi oluşturacağı halen açık olmayıp, AKB'in beyindeki etkisinin potansiyel moleküler mekanizmalarının aydınlatılması için halen çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

2.4.1. Bilirubin Ensefalopatisinin Patofizyolojisi

2.4.1.1. Beyin Bilirubin Girişini ve Yükünü Belirleyen Faktörler

Postnatal hayatın ilk bir haftasında, albuminin AKB bağlayıcı kapasitesini aşır serbest AKB fraksiyonunu artıracak birçok faktör ortaya çıkabilir. Beyne AKB girişi, KBB'i (Şekil 4A) oluşturan ve birbirlerine bağlantı kompleksleri ile sıkıca yapışmış endotelial hücreler tarafından engellenmeye çalışılsa da serbest bilirubin (Bf) beyne difüzyonla geçer (32).

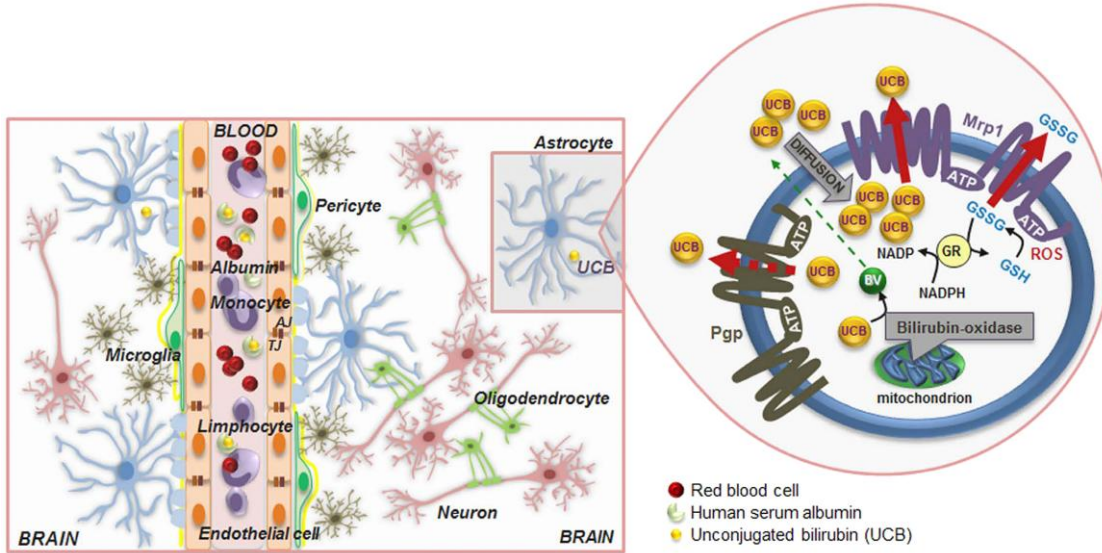
SSS'deki bilirubin birikimi sistemik dolaşımdaki toplam Bf miktarına, KBB'deki taşıyıcıların etkinliğine, Bf'nin beyin parankimine bağlanmasına ve kernikterus riskini artıran asidoz gibi faktörlere bağlıdır (33).

Bf, KBB ve serebrospinal sıvıda yüksek konsantrasyonda eksprese olan P-glycoprotein (Pgp) ve multidrug resistance-associated protein 1 (MRP 1) tarafından ATP bağımlı bir mekanizma ile hücre dışına transfer edilir ve bu yolla KBB'den geçişi ve hücre içinde birikimi sınırlanır (8,34,35).

Hayatın erken döneminde Pgp'nin düşük ekspresyonu veya gunn sıçanlarında gözleendiği gibi uzun süre yüksek AKB konsantrasyonuna bağılı MRP1 down regülasyonu nörotoksisite ile sonuçlanır (8,34). AKB KBB bütünlüğünü; glutatyon homeostazını bozarak, endotelial nitrik oksit sentaz (NOS) ekspresyonunu artırıp NO oluşumuna ve sitokin salınımına yol açarak da bozabilir ve uzamış hiperbilirubinemde beyne geçişi kolaylaştırabilir (36).

NO mikrovasküler geçirgenliği artırarak SSS'e AKB geçişini kolaylaştırmaktadır (37).

AKB SSS'e girdikten sonra öncelikli birikimi ve nörotoksisitesi, hücreye özgü duyarlılık ve bölgesel SSS hassasiyetine bağılıdır (38). MRP1'in astrositlerde ve Pgp'nin KBB ile ilişkili hücrelerdeki lokasyonu, hafif hiperbilirubinemde KBB'nin özelliklerini korumasına ve KBB'ye yakın hücrelerde AKB hasarının sınırlanmasına yardımcı olur (36). Rigato ve arkadaşları, MRP 1'in astrositlerde AKB'in hücre dışına ATP bağımlı atılımını kontrol ettiğini göstermişlerdir (39) (Şekil 4B).



Şekil 4 A,B: Kan beyin bariyeri ve astrositlerde AKB önlem mekanizmaları (80)

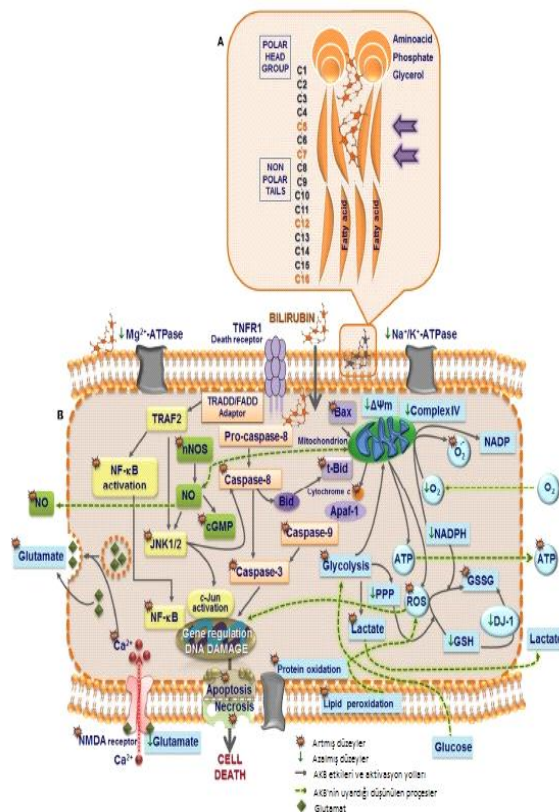
İndirgenmiş glutatyon (GSH), serbest oksijen radikalleri (ROS) ile direkt reaksiyona girerek ve peroksitleri redükte edip okside glutatyon (GSSG) oluşturarak astrositleri korur (40). MRP1 oksidatif stres altında düşük tiol redüksiyon potansiyelini koruma amacı ile astrositlerde GSSG salınımını düzenler (41). MRP1 ekspresyonu astrositlerin yanı sıra nöronlarda da gösterilmiştir (42). Ayrıca immatür nöron ve astrositlerde Pgp miktarının matür hücrelere göre daha az olması nedeniyle, AKB bu hücreler üzerine daha fazla nörotoksisite göstermektedir. Benzer şekilde, RNA interferon teknolojisi kullanılarak MRP 1 ekspresyonu inhibe edildiğinde, nöron ve astrositlerde AKB toksisitesinde artış olduğu gözlenmiştir (42,43).

Başka bir korunma mekanizması da beyin mitokondriyal membranlarının AKB'i okside edebilme kapasitesinde yatmaktadır (13,44) (Şekil 4B).

2.4.1.2. Bilirübinin Nöronlarda Hücre Düzeyindeki Etkileri

Nöronlar daha düşük düzeyde GSH içerdiğinden, astrositlere göre AKB toksisitesine daha hassasdırlar (45). AKB toksisitesine maruz kaldıklarında daha fazla ROS, protein oksidasyonu ve lipit peroksidasyonu gösterirler (46). AKB toksisitesi hücreden hücreye zaman, şiddet ve bölgesel değişkenlik gösterdiğinden hasarın en erken basamağını tanımlamak oldukça güçtür.

AKB; hücre içine Ca girişi, nekroz ve apoptoz ile hücre ölümüne neden olur (42,48) (Şekil 5A,B).



AKB, özellikle gelişmekte olan nöronlarda nörojenizde bozukluk, nöronal atrofiye yol açmakta, nöronal dallanma ve sinapslarda sayıca azalmaya neden olmaktadır. AKB'in nöronal dallanmada azalmayı, mikrotübül ilişkili protein ailesinden microtubule associated protein 2 (MAP2)'nin aksonal tarafa girişine, nöronlarda Tau 1 ekspresyonuna ve eksprese olan Tau1'in mikrotübüllere bağlanıp sitoplazmaya salınmasına neden olarak sağladığı

düşünülmektedir. Tau1, hücre hasarı sırasında dendritik uzantılara doğru yer değiştirerek nöronal hasar sırasında ekstrasellüler alana, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve plazmaya geçer. Tau 1'in plazmaya geçişi bilirubin nörotoksitesinde bir indikatör olarak kullanılmasına neden olmuştur (52,53).

Bu mekanizmalara ek olarak AKB'nin sinaps oluşumunda ve nörotransmitter salınımında görev alan sinaptofizin ve SNAP 25 proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak da sinaptotoksositeye neden olduğu gösterilmiştir (54-56).

AKB'nin mitokondrilerin şişmesi, Bax translokasyonu, mitokondriyal depolarizasyon, sitokrom c salınımı, kaspaz-3 aktivasyonu ve poli-ADP-riboz-polimeraz yıkımına yol açarak nöronal apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (57,58) (Şekil 5B).

AKB, fare beyinlerinden izole edilmiş immatür kortikal nöronların mitokondrilerinde sitokrom c oksidaz inhibisyonu yaparak, mitokondriyal aktivitede azalmaya sebep olmaktadır (59,60). Ayrıca düşük ve orta düzeydeki AKB konsantrasyonları insan NT2-N nöron kültürlerinde gecikmiş apoptoza yol açarken, yüksek düzeydeki AKB konsantrasyonlarının erken dönemde nekrozu tetiklediği gösterilmiştir (61).

NMDA reseptör aracılı mekanizmada ise AKB; hücre içi Ca^{+2} artışını sağlayarak, ekstrasellüler glutamat konsantrasyonunu artırarak ve NMDA reseptörlerinin aşırı stimülasyonuna yol açarak etki eder (54,62,63). Uzamış AKB yüksekliği, presinaptik transmitter salınımına yol açarken aynı zamanda postsinaptik NMDA reseptör fonksiyonunu bozmaktadır. AKB; oksidatif stres, ROS üretimi, okside glutatyonla karşı koruyucu etkisi olan DJ-1 protein miktarını azaltarak ve ekstrasellüler glutamat artışı yaparak nöronlarda dağılım bozukluğuna da yol açar (55,64,65).

2.4.1.3. AKB Nedeniyle Meydana Gelen Glial Reaktivite ve Disfonksiyon

Nöronların işlevleri büyük ölçüde glial hücrelerin sayısına bağlıdır (66). Beyin hasarlarında oligodendrositler (OLG) ve astrositler kadar mikrogial hücrelerinde immün yanıt oluşumunda önemli yerleri vardır. Mikroglia ve astrositler organize bir şekilde hasar onarımında etkili olurlar. Mikrogliaların astrositlerden önce organize olarak onları aktive ettiği düşünülmektedir (67).

Astrositler en çok bulunan glial hücre tipi olup, nöronların 5 katı yoğunluktadırlar ve birçok homeostatik rol üstlenirler (68). Mikroglia gibi astrositlerin de nöroprotektif ve nörotoksik rolü vardır. Aynı anda hem proinflamatuvar sitokinler salarak hem de serbest radikaller açığa çıkararak nöronların yaşam süresini kısaltırlar (69).

AKB, ilk olarak astrositlere absorpsiyon daha sonra ise presinaptik nöronlara difüzyon şeklinde geçerek nöron hasarı gerçekleştirir.

Fetal sıçan glial hücre kültürlerinde AKB'nin, hücre morfolojisine, yaşamsal fonksiyonlara ve mitokondri fonksiyonlarına eş zamanlı etkileri görülmüştür. Astrositler de nöronlar gibi AKB'nin toksik etkilerine hassastırlar. İmmatür astrositler daha differansiye hücrelere dönüştükçe MRP1 ve Pgp ekspresyonu azalır (43). AKB'ne bağlı astrositlerdeki hücre ölümü, nöronlardan daha fazladır. Ek olarak hem hipoksi hem de kombine oksijen-glukoz yoksunluğu, AKB hasarındaki astrositlerin bilirübine hassasiyetini artırır (40).

Nöronlarda olduğu gibi astrositlerde de AKB, ekstrasellüler matriksteki glutamatin hızlı artışına neden olup, hücre içi Ca düzeyini artırarak DNA ve mitokondri hasarını tetikler (40).

AKB toksisitesine bağlı olarak astrositler, TNF-alfa (TNF- α) düzeyini TNF-alfa dönüştürücü enzim (TACE) ve reseptörü (TNFR1) aktive ederek, IL-1 beta (IL-1 β) düzeyini de aynı şekilde IL-1 beta dönüştürücü enzim (ICE) ve reseptörünü aktive ederek artırır. Reseptörlerin aktivasyonu ile reseptör moleküler adaptör olan TRAF 2 ve TRAF 6 devreye girer, nükleer faktör-kappa beta (NF- κ B) ve mitojen aktivatör protein kinaz (MAPK) aktive olarak apoptozis ve nekroz meydana gelir (70-72).

Doku homeostazında önemli görevleri olan mikroglialar, AKB hasarı sırasında doku hasarını sınırlandırmak amacıyla fagositozu artırır. Ancak mikrogliaların aşırı aktivasyonu nörotoksik olabilir (73). AKB tarafından mikroglialar elonge formdan ameboid forma dönüştürülerek aktive olurlar ve bu sürece, kaspaz-8 (ekstrinsik), kaspaz-9 (intrinsik) ve kaspaz-3 seviyelerinin en yüksek olduğu 6. saatte ulaşılır (74,75). AKB, astrositlerdekine benzer şekilde mikroglialarda da MAPK ve NF- κ B'yi aktive eder ve erken dönemde proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açarak, TNF- α 'nın 4 ile 24 saat arasında, IL-1 β 'nin 12 saatte maksimum seviyeye ulaşmasına neden olur. TNF- α bu hasarda, nöronal hücre

ölümüne yol açan kaskadı başlatarak, glutamat nörotoksitesini ve IL-1 β , IL-6 gibi sitotoksik sitokinlerin üretimini artırarak kritik rol oynar (76,77).

2.4.1.4. Bilirubin Ensefalopatisinde Nöroinflamasyonun Rolü

AKB nöronal hücreler üzerinde intrinsik ve ekstrinsik yolları, MAPK'yı aktive ederek, GSH'da azalma ve astrositler üzerinde oksidatif strese yol açarak etki eder. Sistemik pro-inflamatuarların üretilmesi mikrogliaları aktive eder, KBB'de bozulma ve nöroinflamasyona yol açar (78,79). Bu durum ise nöro-glial interaktif bileşenler arasındaki hassas dengeyi etkileyerek; nöron liflerinin arasındaki dallanmaları, sinaptik iletimi, nörogenezisi bozar (80,81) (Tablo 2).

AKB, sıçanlarda kortikal astrositlerde ve mikroglialarda reaktiviteye yol açarak inflamasyonu şiddetlendirir, endotelial hücreler ve bağlantılarını etkileyerek KBB'ni bozar (82). AKB'ne maruz kalan mikroglia ve astrositlerden TNF- α salınımı aynı miktarda olmasına rağmen, IL-1 β ve IL-6 salınımı mikroglialarda daha erken ve daha fazla olmaktadır. Bu durum mikrogliaların astrosit yanıtını düzenlediğini göstermektedir (77).

AKB, pro-inflamatuar sitokinler, serbest oksijen radikalleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (NOS) salınımını artırarak sinir sonlanmalarında sinaps kayıpları ve disfonksiyonuna yol açar. NF-kB, glialardaki inflamatuvar gen ekspresyonunun ve sitokin sentezinin en önemli belirleyicisidir. AKB hem astrositlerde hemde mikroglialarda NF-kB sinyal transdüksiyonunu aktive eder (70-72). NF-kB astrosit ve mikroglialardaki kadar olmasa da AKB'ye maruz kalan immatür nöronlarda da görülür (71). NF-kB aktivasyonu akson gelişiminde görev alır, sinapta nöral gelişmeyi regüle ederek plastisite ve nörogenezisi sağlar (83,84). Bu nedenle, NF-kB nöronlarda fonksiyonel bağlantıların kurulduğu ve dendritik dikenlerin oluştuğu dönemde ana büyüme düzenleyicisi olarak görev alır (83).

Model	Hücre	Etki	Referans
AKB	Polimorfonükleer lökosit	Bakterisidal aktivite ↓	Thong ve Rencis,1977
AKB	Polimorfonükleer lökosit	Mikrobisidal fonksiyon ↓	Thong ve Rencis,1977
AKB	Polimorfonükleer lökosit	Fungisidal aktivite ↓	Thong ve ark.,1979
AKB	SitotoksikT lenfosit	Aktivite ↓	Haga ve ark.,1996
AKB	Lenfosit	MHC sitotoksitesisi ↓	Haga ve ark.,1996
AKB	Astrosit	IL-1 β , IL-6, TNF α ↑	Fernandez ve ark.,2004

AKB	Astrofit	NF-kB ve MAPK aktivasyonu↑	Fernandez ve ark.,2006,2007
AKB	Mikroglia	IL-1 β , IL-6, TNF α ↑	Gordo ve ark.,2006
AKB	Mikroglia	NFkB, MAPK, Metalloproteinaz 2 ve 9, COX2 aktivasyonu ↑	Silva ve ark.,2010
AKB+TNF- α	Nöronlar	Apopitoz ↑	Falcao ve ark.,2007
AKB+TNF- α +IL-1 β	Nöronlar	nNOS, NO, Apopitoz ve P-JNK1/2 ↑	Falcao ve ark.,2007
AKB	Kemik iliği hücre süspansiyonu	Apopitoz ve nekroz ↑	Vaz ve ark.,2011

Tablo 2: Bilirubinin nöroinflamasyondaki rolü üzerine yapılan çalışmalar

Bilirubin nörotoksisitesinin altında yatan hücresele ve moleküler mekanizmalar, yıllardır süren araştırmalara rağmen hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzdeki bilgiler ışığında, hücre zarının yapısında bozulma ve fosfolipid simetri kaybı gibi morfolojik değişiklikler (85), mitokondri zarı ve sinir hücrelerinde lipid akıcılığının, protein sıralamasının ve redoks (indirgenme/yükseltgenme) dengesinin bozulması ile mitokondriyal şişme ve geçirgenlik artışı (86,87), hücre enerji metabolizmasında bozulma (88,89), Na-K ATP az gibi hücre zarı taşıma sistemlerinin bozulması (88,90), glutamat salınım ve geri alımının bozulmasına bağlı eksitotoksisite (88) ve artmış oksidatif stres (88) nedeniyle hücrenin nekroz veya apopitoz ile ölüme gitmesi (10,88,91) olarak özetlenebilir.

2.4.1.5. Bilirubin Ensefalopatisinde Klinik Bulgular

Bilirubin nörotoksisitesinde belirti ve bulgular teorik olarak term bebekte doğumdan 2-5 gün sonra, prematüre bebeklerde ise 7. günden sonra ortaya çıksa da, hiperbilirubinemi yenidoğan döneminde herhangi bir zaman klinik belirtiler gösterebilir.

Erken dönemdeki bulgular asfiksi, hipoglisemi, sepsis, intrakraniyal kanama ya da diğer sistemik hastalık bulgularından ayırt edilemeyebilir. Akut bilirubin ensefalopatisinin klinik bulguları sinsi olup hızla progresyon gösterebilir. Bu amaçla “bilirubinin neden olduğu nörolojik disfonksiyon” (BIND) skorlama sistemi geliştirilmiştir. Bu skorlamanın bulguları, davranışsal-mental, kas tonusu ve ağlama paterninin anormalliklerini içerir (92,93) (Tablo 3).

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

Tablo 3: Bilirübine bağlı nörolojik disfonksiyonun skorum sistemi

1-3 puan= minimal ensefalopati belirtileri

4-6 puan= progresif fakat reversibl ensefalopati belirtileri

7-9 puan= ileri, çoğunlukla irreversibl ensefalopati belirtileri

Erken fazda, ağır sarılığı olan bebeklerin emmeleri bozulur, letarjik ve hipotonik hale gelirler. Orta fazda stupor, özellikle ekstensör kas gruplarını ilgilendiren hipertoni ve iritabilite gözlenir, ateş olabilir. Bunu uyuklama ve hipotoni takip edebilir (6). Hipertoni, retrokollis (boynun arkaya yaylanması) ve opistotonus (gövdenin arkaya yaylanması) şeklinde ortaya çıkabilir. Tonus artışı kortikospinal değil ekstrapiramidal kökenli olduğundan bu durum spastisite değildir (92). Bu evrede acil kan değişimi, bazı vakalarda SSS değişikliklerini geri döndürebilir. Ancak SSS hasarının irreversibl olduğu faz, belirgin retrokollis, opistotonus, tiz sesle ağlama, beslenememe, apne, ateş, derin stupor, konvulziyon ve koma ile karakterizedir (25).

Ağır belirtilerin ortaya çıktığı term bebeklerin çoğu kaybedilir, yaşayanların ise yaşamlarının ilk yılında derin tendon reflekslerinde artma, opistotonus, kas rijiditesi, anormal hareketler ve konvülziyonlar tekrarlama eğilimindedir. Sonraki yıllarda bilateral koreatetoz, ekstrapiramidal bulgular, konvülziyon, mental gerilik, dizartrik konuşma, yüksek frekanslı işitme kaybı, şaşılık, yukarıya bakış anomalisi ve diş enamel displazisinin eşlik edebildiği nörolojik sendrom tablosu oturur (94). Akut ve kronik kernikterusun klinik bulguları Tablo 4’de özetlenmiştir (6).

Akut Form	
Faz 1 (İlk 1-3 gün)	Zayıf emme, stupor, hipotoni, konvulziyon
Faz 2 (1 hafta ortası)	Ekstensör kaslarda hipertoni, opustotonus, ateş, retrokolis
Faz 3 (1 hafta sonrası)	Hipertoni
Kronik form	
Birinci yıl	Hipotoni, aktif derin tendon refleksi, tonik ense refleksi, motor becerilerin gecikmesi
Birinci yıl sonrası	Hareket bozuklukları (koreatetoz, hemiballismus, titreme). Yukarı bakış anomalisi, sensörinöral işitme kaybı

Tablo 4: Bilirubin ensefalopatisinin akut ve kronik formda klinik bulguları

2.5. Yenidoğanda İndirekt Hiperbilirubinemi Tedavisi

Bilirubin toksisitesinin geçici ve kalıcı etkilerinin ortadan kaldırılması için, hiperbilirubineminin zamanında tedavisi büyük önem taşır. Son yıllarda kernikterus olgularının prevalansının artması “vigintifobi” denen “20 korkusu”nun yeniden yerleşmesine yol açmıştır (95). Yine de sağlıklı term bebeklerde bu korkunun yersiz olduğu ve kernikterusun daha yüksek bilirubin düzeylerinde gelişebileceği düşünülmektedir (95).

Hiperbilirubinemi tedavisinde kullanılan başlıca yöntemler:

1-Fototerapi

2-Kan değişimi

3-Farmakolojik tedavi olarak gruplanabilir.

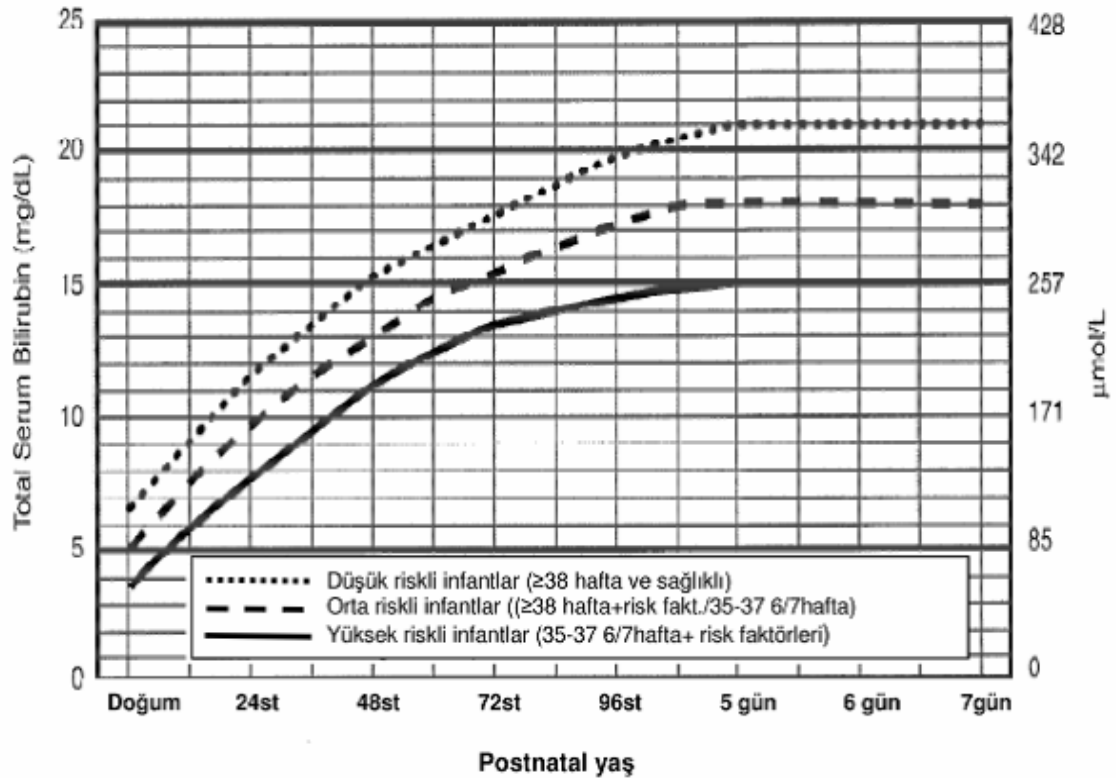
2.5.1. Fototerapi

Yaklaşık 50 yıl kadar önce, güneş ışınları alan sarılıklı bebeklerin deri renginde sarılığın azalması gözlemine dayanan ve günümüzde modern cihazlarla belli dalga boylarındaki ışık enerjisinin kullanılması esasına dayanan bir tedavi yöntemidir. Fototerapi, bilirubini daha az lipofilik olan foto-ürünlere çevirir. Bilirubin, ışığı adsorbe ederek foto-izomerlerine dönüşür.

Bu şekilde dönüşüme uğramış bilirubin karaciğerin konjugasyon sistemini atlar ve daha fazla metabolik olaylara gereksinim kalmadan ekskresyona uğrar (97).

Fototerapinin etkili olabilmesi için deriyi en çok geçebilen mavi-yeşil, 450-520 nm dalga boyundaki ışığa gereksinim vardır. İzomerlere dönüşüm üç yolla olur; foto-oksidasyon, konfigürasyonel izomerizasyon ve yapısal izomerizasyon. Foto-oksidasyon, in vitro ortamda oldukça etkili olmasına karşın, sağlıklı bir yenidoğanda etkisi sınırlıdır. Bilirubin eliminasyonu çoğunlukla konfigürasyonel izomerizasyon yolu ile olmasına rağmen, fototerapi etkinliği esas olarak lumirubin denen yapısal izomer yapımıyla yakından ilişkilidir. Lumirubin oluşum hızını da ışık spektrumu ve ışığın total dozu belirler (98). Yeşil ışık kullanıldığında lumirubin oluşumu daha çok olmaktadır. Fototerapi dozunu ve etkinliğini belirleyen diğer faktörler ışığın enerjisi, bebeğin fototerapi uygulanan vücut alanı, ışık kaynağının bebeğe yakınlığı, fototerapiye başlanan serum bilirubin değeri ve sarılığın sebebidir (25).

Hangi bilirubin düzeyinin patolojik olduğu ve hangi sınırlardan sonra tedavi edilmesi gerektiği konusunda, bugüne kadar yapılan çalışmalar ışığında bazı tablolar hazırlanmıştır (99). AAP'nin fototerapi için önerdiği bilirubin değerleri Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6: Gestasyon yaşı 35 hafta ve üstü olan yenidoğanlarda fototerapi kılavuzu

(Risk faktörleri: izoimmün hemolitik hastalık, G6PD eksikliği, asfiksi, belirgin letarji, ısı instabilitesi, sepsis, asidoz, albümin <3g/dl.)

Fototerapinin devamlı mı yoksa aralıklarla mı uygulanması gerektiği konusunda tam bir görüş birliği yoktur. Ancak genel eğilim yoğun ve devamlı fototerapinin total serum bilirübin düzeyinde etkili bir düşüş sağlanıncaya kadar devam etmesi yönündedir (25).

Gestasyon yaşı 35 haftanın üstünde olup, fototerapi için hastaneye yatırılan bebeklerde yoğun fototerapi ile ilk 24 saatte genelde %30-40 arasında bir düşüş görülür. En belirgin azalmanın ilk 4-6 saatte olduğu bu dönemde, en az 0.5-1 mg/dl/saat düşüş beklenir. Standart fototerapi sistemlerinde ilk 24 saatte %6-20 arasında bir düşüş görülür (99). Fototerapinin ne zaman sonlandırılacağı konusunda standart bir öneri yoktur, bebeğin yaşına ve sarılığın sebebine göre değişir. AAP'nin önerisine göre fototerapi için hastaneye yatırılan bebeklerde (≥ 17 mg/dl), fototerapi total serum bilirübini 13-14 mg/dl düzeyine gerilediğinde kesilmelidir. Hemolitik hastalığı olan bir bebekte, fototerapi 3-4 günlük olmadan kesilirse, ilk 24 saatte rebaund bilirübin düzeyi kontrol edilmelidir (97). Ancak rutin rebaund bilirübin bakılması konusunda da görüş birliği bulunmamaktadır.

Fototerapi yaklaşık 50 yıldan bu yana milyonlarca bebekte kullanılmakta olup güvenilir bir tedavi yöntemidir. Çok seyrek olarak kolestatik sarılığı olan bazı bebeklerde bronz bebek sendromu, eritemli maküler döküntü, purpura, büllöz erüpsiyonlar, deride yanıklar (kızarıklık, renk değişikliği), gözlerde hasarlanma, ishal, dehidratasyon, hipertermi ve patent duktus arteriozus gibi yan etkiler bildirilmiştir. Tek kontrendikasyonu porfiria varlığıdır (15,25).

2.5.2. Kan Değişimi

İlk kez Wallerstein tarafından ortaya konan ve 1951 yılında Diamond ve arkadaşları tarafından geliştirilen kan değişimi tekniği, Rh uygunsuzluğu nedeniyle meydana gelen hiperbilirubinemiye kontrol etmek ve kernikterustan korunmak için uygulanan ilk tedavi yöntemidir (100). Kan değişimi ile bilirübin düzeylerini düşürmenin yanı sıra, maternal antikorları uzaklaştırmak, hemolizin yol açtığı anemiyi düzeltmek, antikor bağlı eritrositleri ve diğer toksik maddeleri temizlemek de amaçlanır.

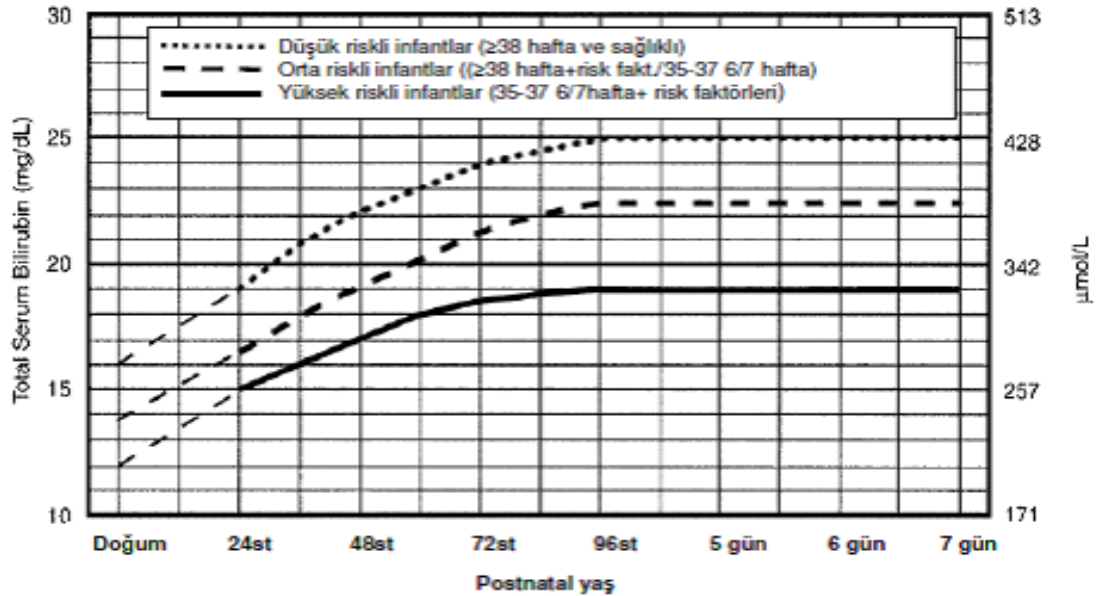
Kan değişimine bebeğin doğum ağırlığı, gebelik haftası, hemoglobin değeri, bilirübin düzeyi, bilirübünün yükselme hızı ve bilirübin/albumin oranı gibi faktörler dikkate alınarak karar

verilmelidir. AAP'nin kan değişimi sınırı için önerdiği bilirubin değerleri şekil 7'de verilmiştir (25).

Gestasyon yaşı 35 haftanın üstünde olan yenidoğanlarda, yoğun fototerapiye rağmen total serum bilirubini düşmüyor ya da yükseliyorsa, kernikterus riski işlemin riskinden daha yüksekse ya da kernikterus bulguları varsa kan değişimi yapılması önerilmektedir (15). Değişim, bebeğin kan hacminin yaklaşık iki katı (160-170 ml/kg) miktarında kan ile yapılır. Bu uygulama ile bebeğin sensitize olmuş eritrositlerinin %85'i değişmiş olur. Aynı zamanda serum bilirubin düzeyi başlangıçtaki düzeyin yaklaşık %50'sine iner (10).

Bilirubin damar dışı alanlarda da bulunması ve kan değişimi sırasında plazma ile bu alanlar arasında sürekli dengelenme süreci, kan değişimi tamamlandıktan 30-60 dakika sonra bilirubinde görülen yükselmenin nedenidir. Bu dengeleme ile bilirubin kan değişimi öncesi değerinin %60'ına erişir (100).

Kan değişimi ile ilişkili ölüm her 1000 işlemde 3 olarak rapor edilmişse de, sağlıklı 35 hafta ve üzerindeki bebeklerde çok daha nadirdir (99). Apne, bradikardi, siyanoz, vazospazm, tromboz ve nekrotizan enterokolit gibi anlamlı morbidite %5 oranında görülür. Ayrıca kan ürünü kullanımı ile ilişkili riskler her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Komplikasyonların görülme sıklığı ise, bir ünite de kan değişimi yapılma sıklığı, personelin becerisi gibi faktörlerle yakından ilişkilidir (25).



şekil 7: Gestasyon yaşı 35 hafta ve üstü olan yenidoğanlarda kan değişimi kılavuzu

(Risk faktörleri: izoimmün hemolitik hastalık, G6PD eksikliği, asfiksi, belirgin letarji, ısı

instabilitesi, sepsis, asidoz, albumin <3 g/dl.)

2.5.3. Farmakolojik Tedavi

Hiperbilirubinemi tedavisinde kullanılan farmakolojik ajanlar:

1. İntravenöz immunglobulin (IVIG)
2. Fenobarbital
3. Ursodeoksikolik asit
4. Metalloporfirinlerdir.

2.5.3.1. İntravenöz İmmunglobulin

Rh izoimmünizasyonu olan yenidoğanlarda doğumdan hemen sonra yüksek doz (0,5-1 g/kg) intravenöz immunglobulin (İVİG) kullanılması bilirubin yükselme hızını yavaşlattığı gibi maksimum bilirubin düzeylerini de düşürerek kan değişimi ihtiyacını azaltır (101). ABO uyuşmazlığı vakalarında da İVİG kullanımının yararlı olabileceği bildirilmiştir. İzoimmün hemolitik hastalığı olup yoğun fototerapiye rağmen total serum ya da plazma bilirubin değeri yüksek ise veya kan değişim sınırının 2-3 mg/dl (34-51 micromol/l) altında ise IVIG kullanımı önerilir, gerekirse doz 12 saat içinde tekrarlanabilir (25,102). IVIG'in hemolizi önleme mekanizması belirsiz olmakla birlikte, eritrositlerdeki antikor reseptörlerini bloke ederek gerçekleştiği düşünülmektedir. İVİG tedavisinin yan etkisi gözlenmemiştir ve kan değişimi gibi invaziv komplikasyonlara yol açabilecek bir uygulamayı, anlamlı şekilde azalttığı için Rh izoimmunizasyonu vakalarında tercih edilebilmektedir (101).

2.5.3.2. Fenobarbital

Fenobarbital, karaciğer mikrozomal enzim indüksiyonu yaparak, bilirubin konjugasyonunu artırmanın yanı sıra, bilirubin karaciğere alınmasını da kolaylaştırır ve safra atılımını artırır. Ancak fenobarbitalin olası yan etkileri nedeniyle rutin kullanımı önerilmez (101).

2.5.3.3. Ursodeoksikolik Asit

Safra akımını artırarak total serum bilirubin düzeyini düşürür. Kolestatik sarılığın tedavisinde de etkili olmaktadır (99).

2.5.3.4. Metalloporfirinler

Bazı metalloporfirinler, hem oksijenaz enzimini ve hem metabolizmasını kompetitif olarak inhibe ederek bilirubin yapımını azaltırlar. Ancak bu tedavinin güvenilirliği konusunda kısıtlı veri bulunduğundan rutin kullanımı söz konusu değildir. Bunlardan Kalay-mezoporfirinin (SnMP) özel mavi ışıklı fototerapiden daha etkili olduğu, hiperbilirubinemiye etkin bir şekilde önleyebileceği veya tedavi edebileceği gösterilmiştir (103). Bir çalışmada glukoz-6fosfat dehidrogenaz eksikliği olan yenidoğanlara yaşamın ortalama 27. saatinde SnMP verilmiş ve G6PD eksikliği olan ve olmayanlardan oluşan kontrol grubuna göre, serum bilirubinlerinin daha erken ve düşük düzeyde pik yaptığı görülmüştür. Tedavi alanların hiçbirinde fototerapi gereksinimi olmamakla birlikte kontrol grubunda G6PD eksikliği olanların %31'i, G6PD eksikliği olmayanların %15'i fototerapi almıştır (104).

Yüz yetmiş yenidoğanın katıldığı üç randomize kontrollü çalışmada metalloporfirinin fototerapi gereksinimini ve maksimum total serum bilirubin seviyesini düşürdüğü, hastanede kalım süresini kısalttığı gösterilmiştir. Çalışmaya katılan yenidoğanların hiçbirinde kan değişim gereksinimi olmamış ancak çalışmalarda kernikterus, ölüm ve uzun dönemli nörogelişimsel prognoz rapor edilmemiştir (103,105,106).

2.6. Hiperbilirubinemide Prognoz

Klinik bulguların geniş bir spektruma sahip olması sebebiyle kernikterusun gerçek insidansını tahmin etmek zordur.

Amerika Birleşik Devletlerinde 33272 canlı doğumu 8 yıl boyunca izleyen “Ulusal Perinatal İşbirliği Projesi”nde 20 mg/dl altında olan bilirubin düzeylerinin nörolojik, mental (IQ) ve işitsel gelişime olumsuz etkisinin olmadığı, daha yüksek bilirubin düzeylerinin ise minör motor bozuklukla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, serum bilirubin değeri 25 mg/dl üzerinde ve/veya direkt coombs testi pozitif olan gruplarda IQ skorlarının düşük olduğu tespit edilmiştir (107).

Hiperbilirubinemili yenidoğanları on yedi yıllık takip yapılan bir çalışmada 20 mg/dL ve üstündeki bilirubin düzeylerinin, erkek bebeklerde daha düşük IQ'ya sebep olduğu tespit edilmiştir (108). Erkek bebeklerin neonatal hiperbilirubineminin yan etkilerine daha hassas olduğu, 20 mg/dL altında bilirubin düzeyi bulunan 31759 tedavi görmemiş bebeğin kohort incelemesinde de gösterilmiştir (109).

Türkiye’de Özmert ve arkadaşlarının, 37 GH'dan büyük ve doğum ağırlığı 3000 gramın üzerinde olan 416 indirekt hiperbilirübinemili bebeği, 8-13 yaşlarına kadar izlemiş oldukları çalışmada, serum bilirubin değeri 342 mmol/l üzerinde olan tüm hastalarda anormal BAEP sonuçları saptanmıştır. Aynı çalışmada indirekt bilirubin seviyesi 6 saatten kısa süre 342 mmol/l üzerinde seyredenlerin %2.3’ünde ciddi nörolojik muayene bulguları saptanırken, bu zaman aralığı 6-11 saat olduğunda ciddi nörolojik anormallik oranı %18.7, 12 saat ve üzerinde olduğunda ise %26 olarak tespit edilmiştir. Sürecin uzaması anormal nörolojik muayene bulguları ile korele giderken IQ seviyeleri üzerine herhangi olumsuz bir sonuç tespit edilmemiştir (110).

Kronik bilirubin ensefalopatisinin çocukluk çağından sonraki en sık bulguları koreatetoz, oküler paralizi ve sekizinci sinir sağırlığıdır. Ciddi mental retardasyon ve spastik serebral palsy daha az sıklıkta görülür. Uzun dönem yaşayanlarda motor bulgular en belirgin anormalliklerdir (111,112). Özellikle ateatoz olmak üzere belirgin ekstrapiramidal bozukluklar 18 ay gibi erken dönemde gelişebilir ancak bazen 8-9 yaşına dek gecikebilir. Ciddi şekilde etkilenmiş çocuklarda ortaya çıkan ateatoz ekstremiteler kullanımı engelleyebilir ayrıca bu çocuklar dizatri, salya akıtma, çiğneme ve yutma güçlüğüne sahip olabilirler (113). Postiktirik serebral palsyde diğer serebral palsy tiplerine göre nöbet daha az sıklıkta görülür. Postiktirik serebral palsyde hayatın ilk 2-5 haftasında nöbeti taklit eden ekstensör spazmlar görülebilir ancak birinci aydan sonra kaybolurlar. Yaşamın ikinci yılından sonra tekrarlayan nöbetler serebral palsyinin spastik formu ile karşılaştırıldığında daha seyrek görülür (113).

Yüksek bilirubin düzeyinin işitme üzerine etkisini inceleyen birçok çalışma beyin sapı işitsel potansiyellerinin (BERA) etkilendiğini ancak tedaviyle bu bozuklukların gerilediğini bildirmiştir (114). 15-25 mg/dL seviyelerindeki total serum bilirubini ile beyin sapı uyarılmış potansiyelleri, davranış paterni ve ağlamadaki değişikliklerin ilişkisini gösteren çalışmalarda, serum bilirubin seviyesi normale geldiğinde, tespit edilen anormalliklerin kaybolduğu görülmüştür (25).

Yüksek bilirubin seviyelerinin, dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu, otizm spektrumu, santral işitsel sorunlar, öğrenme güçlüğü, progresif olmayan gelişimsel gecikmeye yol açabildiği bilinmektedir (115). Hayatın ilk üç ayında orta derecede bilirubin yüksekliği de; okul çağında dikkat problemleri, disfonksiyonel hareketler, agresif davranışlarla ilişkili bulunmuştur. Bilirubinun hafif yüksekliğinde kernikterus sendromu şeklinde olmamakla

birlikte nörogelişimsel problemler ortaya çıkabilmektedir (116,122). Uzun süreli hafif bilirubin yüksekliğinde kognitif, algısal, motor, işitsel problemler tanımlanmıştır (116).

Orta derecede hiperbilirubineminin nörotoksik etkisini araştıran bir çalışmada 20 hiperbilirubinemili bebek (>220 mmol/l) (10 tanesi fototerapi almış, 10 tanesi almamış), 20 sağlıklı term bebek (hiperbilirubinemisi olmayan aynı dönemde doğmuş, GH ve cinsiyet olarak benzer sayıda) ile karşılaştırılmıştır. Bebekler yenidoğan dönemi, 3. ve 12. ayda nörolojik olarak değerlendirildiğinde, yenidoğan dönemi ve 3. ayda nörolojik muayeneleri tamamen anormal olmamakla birlikte, minör nörolojik disfonksiyon hiperbilirubinemi grubunda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. 12. ayda yine nörolojik muayeneleri tamamen anormal olmamakla birlikte, nörolojik disfonksiyon çalışma grubunda daha yüksek saptanmıştır. Onikinci aydaki nörolojik prognoz, serum bilirubininin ulaştığı en yüksek değer ile bağlantılı bulunmuştur. Çalışmada nörolojik prognozun serum bilirubininin pik yaptığı değer ile ilişkili ancak bilirubin yüksek kaldığı süreden bağımsız olduğu saptanmıştır (116).

Literatürde yüksek bilirubin düzeyleri sonrası hastaların gelişimsel değerlendirmelerini inceleyen çalışmalar çelişkili sonuçlar bildirmektedir. Bazı çalışmalar bu çocuklarda ileri dönemde öğrenme güçlüğü olduğunu ortaya koyarken, bazı çalışmalarda bunun çocuğun ilerleyen dönemdeki entellektüel seviyesiyle ilgisiz olduğunu belirtmiştir (107,115,117).

Çalışmalarda genellikle pik serum bilirubin seviyesinin, serum bilirubin seviyesinin yüksek kaldığı süreye göre nörolojik prognozla daha yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir (116). Sarılığa maruz kalma süresi ise daha çok çocukluk ya da erken adolesan döneme kadar yavaş yavaş gelişen sensitif bilişsel fonksiyonların kaybında anlamlı bulunmuştur. Bilirubin indüklediği nörolojik disfonksiyonun klinik spektrumunu etkileyen preterm doğum, çok düşük doğum ağırlığı, sarılığa olası yatkınlık, bilirubin-albumin bağlanma oranı gibi pek çok değişkenin nörotoksisitede olası etkilerini de göz önüne almak gerekir (116).

Literatürde hiperbilirubinemiye hassas beyin bölgeleri tanımlanmıştır. Bu bölgelerin fonksiyon ve etkileşimlerini bilerek hiperbilirubineminin hangi davranışsal ve bilişsel problemlere yol açacağı öngörülebilir (118). Frontal-bazal ganglion etkileşimi; dürtü kontrol bozukluğu, hafıza fonksiyonunu yürütmede güçlük, karar verme yetisinin bozulması ve dikkat problemlerine yol açabilir. Bazal ganglion hasarında globus pallidus interna ve subtalamik çekirdek etkilendiğinden bilişsel ve davranışsal kayıp görülür (119,120). Bilirubin

ensefalopatili çocukların bazal ganglia hasarlanma bölgeleri manyetik rezonans görüntüleme (MR) ile araştırıldığında globus pallidusun internal-external segmenti ve subtalamik çekirdekte anormallikler demonstratif olarak gösterilmiştir. Bu bulgu otopsi serilerinde aynı bölgelerdeki sarı boyanma ilede doğrulanmıştır (118). Bilirubin toksisitesinden etkilenen diğer bölgeler, serebellum (özellikle purkinje hücreleri), dentat çekirdek, vermis, 4. ventrikül, hipokampus, bazı beyin sapı çekirdekleri özellikle vestibüler, koklear ve okulomotor çekirdekler olarak tanımlanmıştır (116). Etkilenen beyin sapı çekirdekleri, kernikterusta görülen santral işitsel sorunlar ile görme kaybı ve motor anormallikleri de açıklamaktadır (121,122).

Globus pallidusun hiperbilirubinemiye maruz kalması sonucu, dorsolateral prefrontal sistemin etkilenmesiyle konsantrasyon azalması ve dikkat dağınıklığı gözlenmektedir. Ancak, en büyük bilişsel hasarın, globus pallidus internanın dorsomedial kesiminin etkilenmesi sonucu ortaya çıktığı öne sürülmüştür (123). Dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu olan hastalarda koreatetoid hareket gibi motor bozukluklar görülebilmesinin nedeni globus pallidus internanın posterior ve ventrolateral bölgelerinin etkilenmesi sonucu gelişen inhibitör yetmezliktir (124).

2.7. Melatonin

2.7.1. Melatonin Tarihçesi ve Genel Bilgiler

Melatonin ilk kez 1917 yılında, inek pineal bezi içerisindeki bir maddenin kurbağa deri renginde açılmaya neden olmasının keşfedilmesiyle tarihteki yerini almıştır (125).

Lerner ve arkadaşları ise 1958 yılında, pineal ekstrelerde bulunan amfibilere verildiğinde cilt renginin açılmasına neden olan potansiyel pineal hormonu izole etmişlerdir. Lerner bu maddeyi Yunancada siyah anlamına gelen ‘melas’ ve ış anlamına gelen ‘tosos’ kelimelerini birleştirerek melatonin olarak isimlendirmiştir (126).

1975 yılında ise, melatonin salınımının insanlarda ve diğer tüm memelilerde sirkadiyen ritm gösterdiği anlaşılmıştır. Bu döngü tamamen sirkadiyen olup yalnızca çevresel aydınlık-karanlık siklusuna bir yanıt şeklinde değil, aynı zamanda sıklık endojen sinyallerin retina veya suprakiazmatik çekirdeğe ulaşmasına da bağlıdır (127).

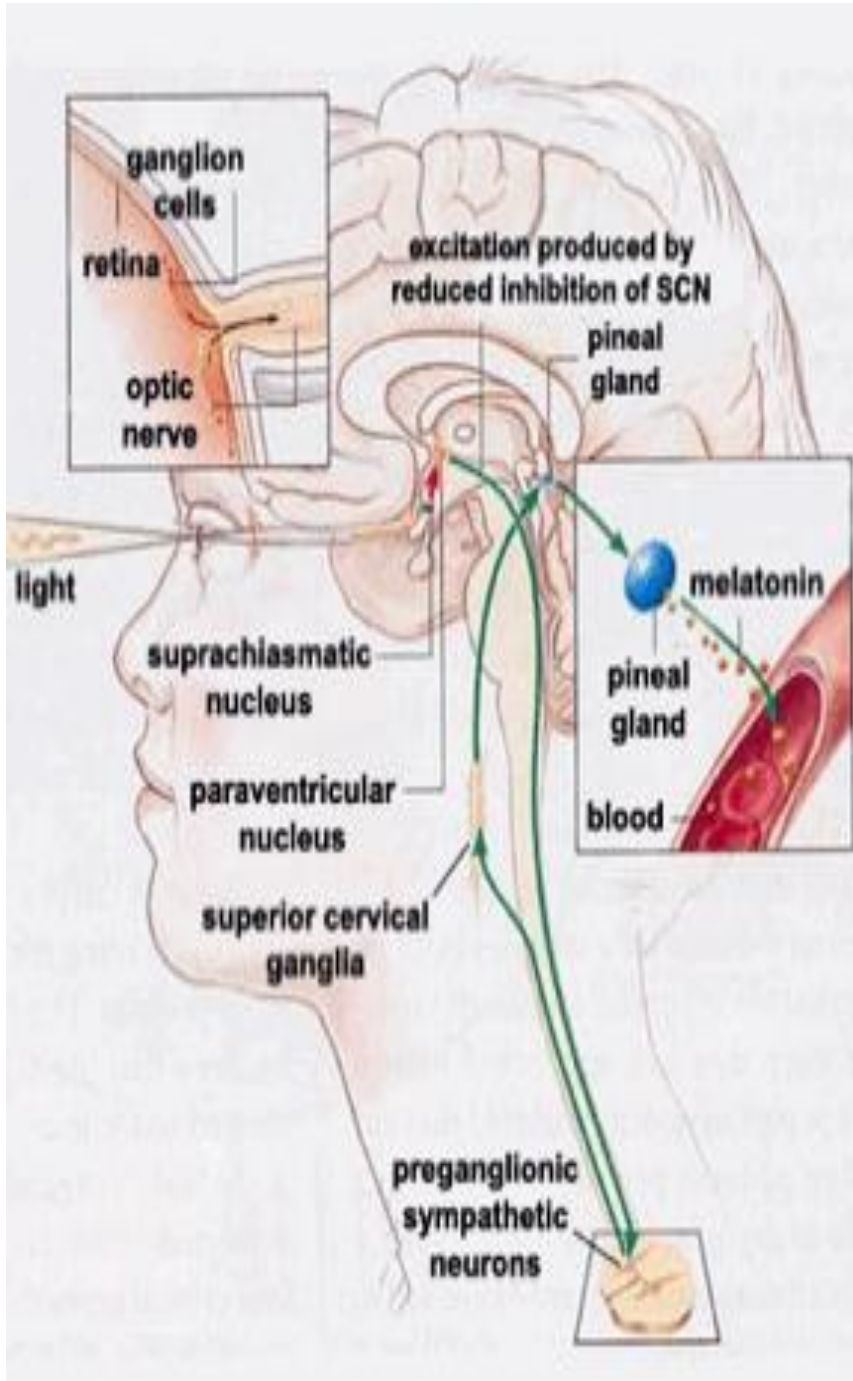
Melatoninin kan ve idrar konsantrasyonu gün ışığında düşük seyrederken karanlıkta yükselmeye başlar, gece 23.00-03.00 saatleri arasında en yüksek değerine ulaşır gün ışımadan önce hızlı bir düşüş gösterir (128). Melatonin salınımı geceleri büyük bir yükselme göstererek

yaklaşık 10 kat kadar artar. Yükselmiş melatonin düzeyinin yüksek kalma süresi ise, karanlığın süresine bağlıdır. Kış aylarında ve uzamış gecelerde bu süre uzundur.

Pineal glandın salgı fonksiyonu indolaminler ve peptidler olmak üzere iki grup endojen madde ile sağlanmaktadır. İndolaminler içinde en önemli endojen madde 232 moleküler ağırlıklı N-asetil-5-metoksitriptamin yani melatonindir (127). Melatonin aynı zamanda retina, timus, solunum yolları epiteli, deri, lens, harderian bezi, gastrointestinal sistemde enterokromofin hücreler, testis ve lenfositler olmak üzere çeşitli ekstrapineal dokularda da bulunmaktadır (129).

2.7.2. Melatonin Üretim Yolu

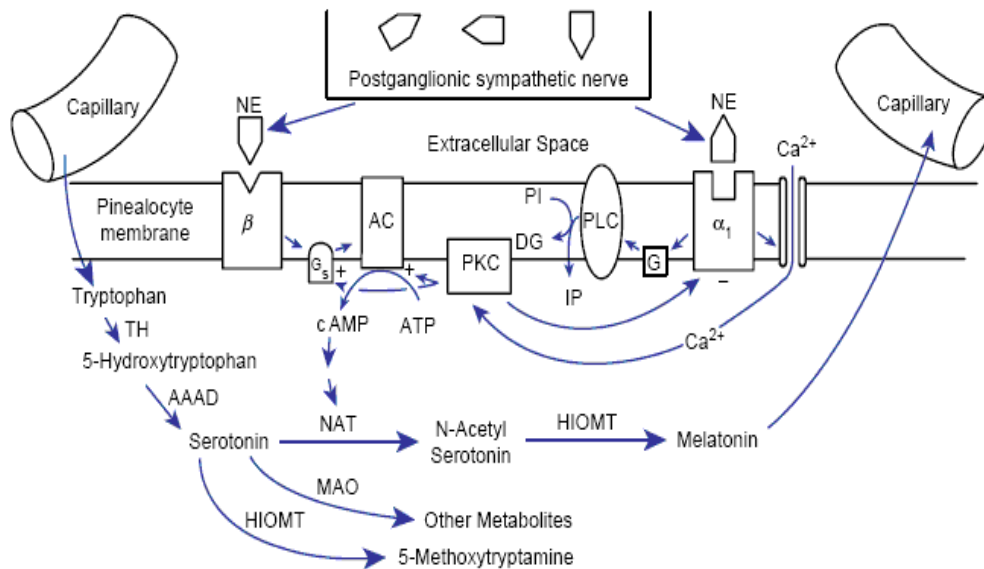
Melatonin hormonunun salgılanması pinealosit hücrelerinin ışığa duyarlı olmasına bağlıdır. Pinealositlerin pineal bez içerisindeki oranı %90'a ulaşır ve bu hücreler fonksiyonel ışık reseptörleridir. Pineal bez, görme sisteminin bir uç organı olarak ritmik ışık mesajlarını organizmaya bildirir (129). Işık uyarısı pineal beze karmaşık, çok nöronlu bir sistemle ulaşır. Retinadan başlayan nöral yolun birinci kısmı retinohipotalamik traktusdur (RHT). Bu traktus, suprakiazmatik çekirdekte (SCN) sonlanır. Retinal ışık reseptörleri ışığı elektriksel uyarıya çevirerek monosinaptik olarak bu çekirdeğe iletirler. SCN'e ayrıca optik traktus aracılığı ile lateral genikulat cisimlerden de uyarı gelir. SCN'den çıkan lifler aynı zamanda hem pineale, hem de omuriliğin intermediolateral kolonuna gider ve buradan superior servikal gangliona (SCG) ulaşır. Sempatik bir ganglion olan SCG'den çıkan postganglionik lifler ise nervi conarii aracılığı ile yine pineal beze ulaşarak, kapillerler boyunca bez içinde dağılırlar (128) (Şekil 8). Pineal bez, sempatik innervasyondan başka az oranda parasempatik ve serotoninergik sinir lifleri ile de innerve olur. Bu lifler bez içinde, çoğunlukla pinealositlerin arasında serbest sinir uçları şeklinde sonlanırlar. Sonuç olarak, melatoninin siklik salınımı, hipotalamusta SCN'nin sinirsel aktivasyonu sonucu oluşur.



Şekil 8: Memelilerde Melatonin Üretim Yolağı

Pineal bez içerisinde sempatik sinir uçlarındaki en önemli nörotransmitter noradrenalindir. Noradrenalin, postsinaptik reseptörler olan pinealosit membranındaki β ve α -reseptörlere bağlanır. Melatoninin %85'i β -reseptörlerin aktivasyonu, %15'i ise α -reseptörlerin aktivasyonu ile sentez edilir (130-131). Norepinefrin hem triptofanın dolaşımdan beze girişini

artırmakta, hem de pinealosit membranındaki β -1 reseptörleri aracılığıyla membrandaki adenil siklazı aktive ederek, hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyelerini yükseltmektedir. cAMP etkisiyle, melatonin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetil transferaz aktivitesi yükselmekte, böylece melatonin sentez ve salgılanması başlamaktadır. Gün ışığının bulunduğu saatlerde, retinadaki fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir ve bu da norepinefrin salınımını baskılar. Karanlıkla birlikte polarize olan fotoreseptör hücreler norepinefrin salgırlar. Melatonin sentez ve salımı arttıkça hormon, pasif difüzyonla dolaşıma geçer (132) (Şekil 9). Ancak diyet, uyku süresi ve vücut postürüne göre melatonin sekresyonu bazı değişiklikler gösterebilir.



Şekil 9: Melatonin sentezinde noradrenalinin rolü ve melatoninin kapiller dolaşıma salınımı

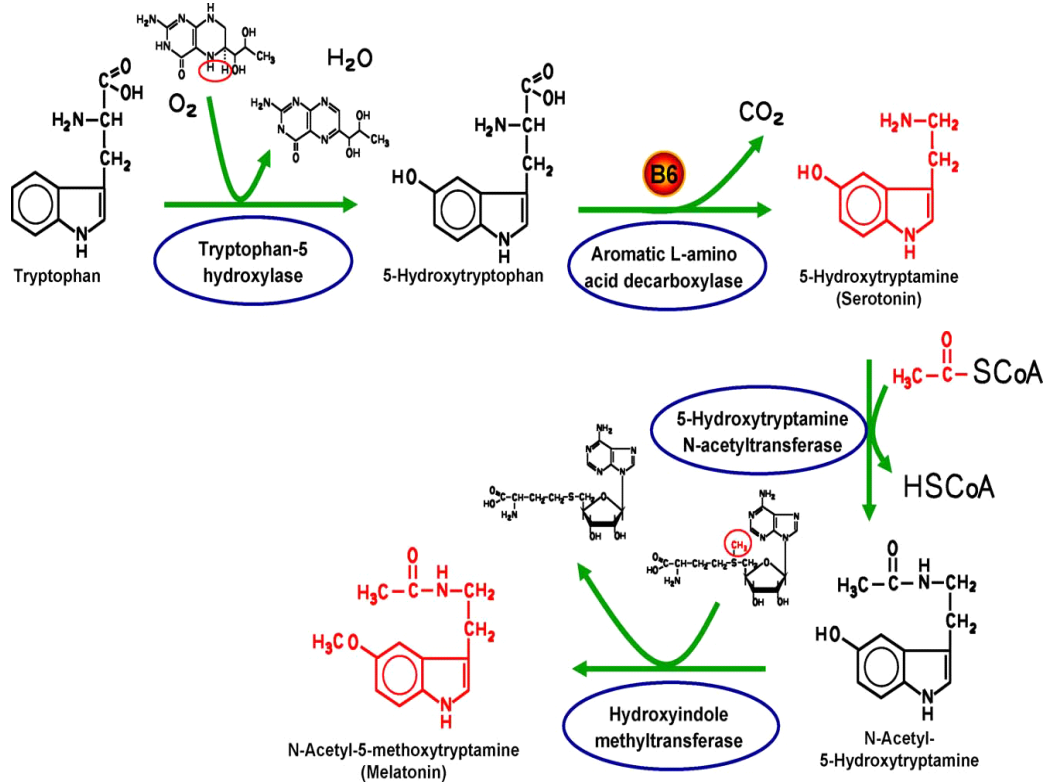
2.7.3. Melatonin Biyosentezi

Melatonin biyosentezi, kandan beze difüze olan triptofanın, pineal bezde triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenmesiyle başlar. Burada görev alan triptofan hidroksilaz enzimi nörotransmitter olarak bilinen serotonin üretim yolağının ilk enzimidir ve yolağın hız kısıtlayıcı basamağını oluşturmaktadır (128).

Triptofan hidroksilaz enzimi, tetrahidrobiopterin (BH4) ve O₂'yi kofaktör olarak kullanır. Bu reaksiyon pinealositler dışında sinir sistemi ve karaciğerde de oluşur. Oluşan 5-

hidroksitriptofan, nörotransmittter olan serotonin ve melatonin sentezi için doğal olarak ortaya çıkan bir ara metabolittir. 5-hidroksitriptofan KBB’i kolayca geçebilir. Aşırı miktardaki triptofanın, B6 vitamini ile birlikte verildiğinde metabolize edilerek vücuttan atıldığı düşünülmektedir (133).

Meydana gelen 5-hidroksitriptofan, L-aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybeder ve neticede serotonin (5-hidroksi triptamin) meydana gelir. Buradaki reaksiyonda B6 vitamini koenzim olarak görev yapmaktadır. 5-hidroksitriptamin KBB’i geçemez. Serotoninin asetilasyonu, N-asetil transferaz aracılığı ile gerçekleşir. Burada Asetil CoA, asetil donörü olarak rol oynar. Meydana gelen N-asetil serotonin, metil donörü olarak S-adenozilmethionin’in kullanıldığı ve hidroksi indol-O-metil transferaz’ın katalizlediği son basamakta melatonine dönüşür ve böylece melatonin biyosentezi tamamlanır (128) (Şekil 10).



Şekil 10: Melatonin Biyosentezi

2.7.4. Melatoninin Hücre Düzeyinde Etki Mekanizması ve Metabolizması

Pineal bezden dolaşıma verilen melatonin hem lipofilik hemde hidrofilik özelliğinden dolayı direkt olarak veya spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücrelere ulaşır. Beyin omurilik sıvısı dahil olmak üzere kana ve tüm vücut sıvılarına hızlı bir şekilde dağılmaktadır. Bu

özelliğinden dolayı pineal bezde oluşan melatonin miktarıyla, plazma melatonin düzeyleri arasında güçlü bir korelasyondan söz edilebilir (129). Ölçülen bütün sıvılarda melatoninin varlığı gösterilmiştir. Anneden fetusa ve süt yoluyla yenidoğana geçebilir (128).

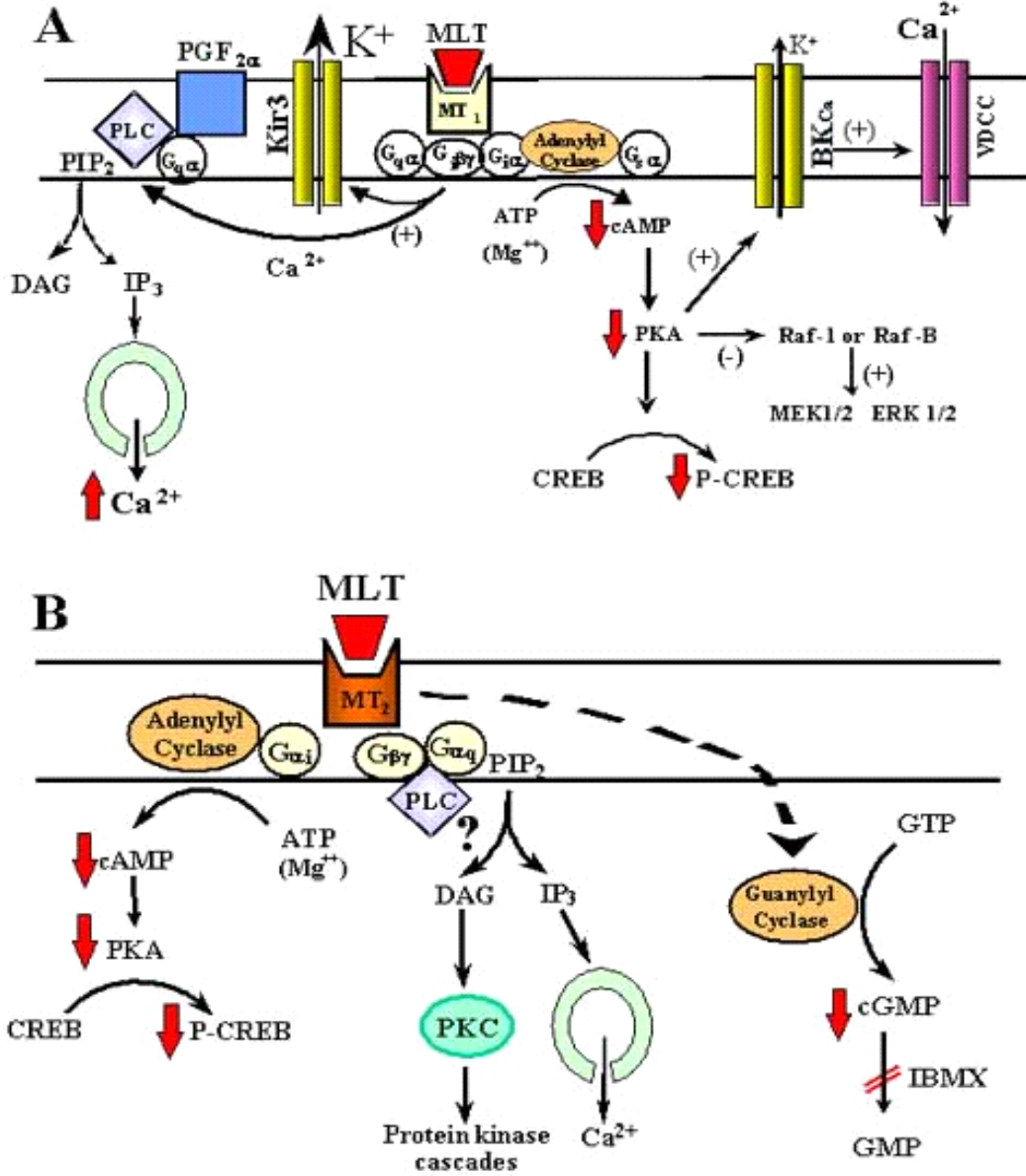
Melatonin endokrin, otokrin ve parakrin işlevlere sahiptir. Bu işlevlerin bazıları direkt olarak bazıları reseptör aracılığı ile gerçekleşmektedir. Radyoaktif işaretli melatoninle yapılan çalışmalarda üç çeşit melatonin reseptörü (MT1, MT2, MT3 -amfibi ve kuşlarda bulunan) gösterilmiş ve bunların iki tanesinin insan kaynaklı olduğu tanımlanmıştır (134). Bu reseptörlerin arteriyel vazokonstriksiyon, immün cevap, üreme, metabolik fonksiyon, nöronal, hücresel ve fizyolojik süreçlerde çok geniş spektrumda görevleri vardır. Vücutta retina, beyin, hipofiz başta olmak üzere periferik dokuların çoğunda (dalak, karaciğer, kan damarları, eritrosit, lökosit, tiroid bezi, timus, plasenta, over, endometriyum ve gastrointestinal sistem) bu reseptörlerin bulunduğu bildirilmiştir (135,136).

MT1 (yüksek afinite-pikomolar) reseptörlerinin G-protein coupled reseptör ailesine afinitesi yüksektir, c-AMP supresyonu ile birlikte fosfolipaz C ve çeşitli iyon kanallarının aktivasyonunda rol oynar. Melatoninin bu reseptöre bağlanması hedef hücrede adenil siklaz aktivitesinin inhibisyonuyla sonuçlanır. MT1 reseptörlerine; kardiyak kan damarları, hipofizin pars tuberalis kısmı ve hipotalamusun suprakiazmatik nukleusunda rastlanmıştır. MT1 reseptörleri retinal fonksiyonlarda, termoregülasyonda, arteriyel vazokonstriksiyonda, sirkadiyen ritimde ve üreme regülasyonunda etkindir (137,138).

MT2 (düşük afinite-nanomolar) reseptörleri hipokampus ve retinada bulunur. MT1 reseptörleri gibi c-AMP supresyonu ile birlikte fosfolipaz C ve çeşitli iyon kanallarının aktivasyonunda rol oynarlar (Şekil 11). Ancak MT1'lerden farklı olarak MT2 reseptörlerinin aktivasyonunun fosfoinozitid (PI) hidrolizi ile kenetli olduğu ve selektif MT2 antagonisti uygulanmasının bu hidrolizi geri çevirdiği belirtilmiştir (139). Melatonin MT2 reseptörü aracılığıyla, SCN'deki nöronal termoregülasyonda, retinada dopamin salgısının inhibisyonunda, vazodilatasyonun indüklenmesinde, arteriyel yatakta lökosit rulo formasyonu oluşumunun engellenmesinde ve immün cevabın artırılmasında rol oynamaktadır (137,140).

MT3 reseptörleri böbrek, beyin ve çeşitli periferik organlarda bulunur. Lökosit adezyonunda lökotrienleri inhibe eder ve intraoküler basıncı düşürür (140).

Melatoninin MT1 ve MT2 reseptörleri desensitizasyona oldukça duyarlıdır, melatonin düzeyi normal konsantrasyonun üzerine çıktığında aktiviteleri azalır (141).



Şekil 11: MT 1 ve MT 2 Reseptör Aktivitesi

Kanda melatoninin %60-70'i albumine bağlı olarak bulunur ve serum düzeyi 10-300 pgr/dl arasındadır. Kan konsantrasyonu gündüz saatlerinde yaklaşık 0-20 pgr/dl düzeylerinde iken, gece saatlerinde 50-300 pgr/dl düzeylerine yükselir. Yarılanma ömrü ise 10-40 dakikadır (128,142).

Melatoninin inaktivasyonu, başlıca karaciğerde P450 bağımlı mikrozomal oksidaz ile indol halkasının 6. konumundan hidroksile olup (6-hidroksimelatonin), daha sonra sülfat ve glukuronik asitle konjuge edilmesi ile gerçekleşir (143). Melatonin metabolitlerinin yaklaşık olarak %50-80'i sülfat deriveleri ve %5-30'u glukuronid deriveleri şeklinde idrar yoluyla

atılmaktadır. Melatoninin %1-3'lük kısmı ise değişmeden idrar yada tükürük ile atılır (128,129). Melatoninin idrardaki başlıca metaboliti 6-hidroksimelatonin sülfat olup, plazma melatonin düzeyinin iyi bir göstergesidir. Metabolitlerin idrardaki miktarları geceleri gündüzden daha fazladır. Ortalama günlük atılım hızı 0-30 ng/8 saatdir ve yüksek oranda bireysel ve günlük farklılık gösterebilmektedir (144).

2.7.5. Melatoninin Vücut Üzerindeki Etkileri

2.7.5.1. Melatoninin Uyku ve Psikiyatrik Hastalıklar Üzerine Etkisi

İnsan uykusunun düzenlenmesinde anahtar mekanizma, ışığa veya karanlığa maruz kalmadır. Işığa maruziyet retinadan beyindeki hipotalamik alana kadar uzanan bir sinir yolunun uyarılmasına neden olur. Hipotalamik alanda bulunan SCN, beynin diğer alanlarına giden hormonları, vücut ısını, uykuyu veya uyanıklılık hissini kontrol eden sinyalleri başlatır (137). Böylece SCN tüm vücudu etkileyen aktiviteleri düzenleyen bir saat gibi çalışır. Bu sırada karanlık saatler gelinceye kadar uyku ile ilişkili melatonin benzeri hormonların salınımı baskılanır. Yani gün boyunca pineal bez inaktiftir. Güneş ışınları kaybolunca SCN tarafından oluşturulan melatonin salınımını engelleyen baskılayıcı sinyaller ortadan kalktığından pineal bez uyarılır ve melatonin üretimi başlar. Melatonin düzeyleri arttıkça daha az uyarı algılanmaya başlanır ve uyku hissi artar. Melatonin düzeylerindeki bu yükseklik tüm gece boyunca yaklaşık olarak 10-12 saat kadar devam eder (145).

Birçok araştırmacı melatonin haplarının uykuya dalma ve uykuda kalmada yardımcı olacağını düşünmektedir. Ayrıca uykuya başlama hızının ve uyku kalitesinin artacağı da bildirilmektedir (131,144). Melatoninin, total uyku süresinden çok uykunun başlangıcı, latent evresi ve kalitesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (144).

Uyku sorunu olan manik kişilerde, hızlı göz hareketleri düzensizliğinde, huzursuz bacak sendromunda, gecikmiş uyku fazı sendromunda ve fibromiyaljisi olanlarda melatonin kullanılmasının uyku süresini ve kalitesini artırdığı bildirilmiştir (148).

Dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu ve uyku başlangıç bozukluğu (sleep-onset insomnia) olan çocuk hastalar için melatonin tedavisi önerilmektedir (147).

Psikiyatrik bozuklukların patogeneğinde pineal beze ait işlev bozukluklarının bulunduğu ve depresyonun düşük melatonin seviyeleri ile ilişkili olduğunda bildirilmiştir (129). Depresyonda melatoninin rolü ve salgılanma düzeyleriyle ilgili yapılan çalışmalarda, depresyon

hastalarında gece melatonin düzeyinin düşük olduğu saptanmıştır (149). Antidepresan olarak kullanılan birçok ilacın norepinefrin ve serotonin düzeylerini artırarak melatonin miktarını artırması, depresyon-melatonin ilişkisinin bir kanıtı olarak görülmektedir (149). Ayrıca çalışmalar, tedavi için kullanılan melatoninin depresyonlu hastalarda uyku örüntüsünü düzenlediği ve depresyon belirtilerinin gerilemesine neden olduğunu göstermektedir (150). Melatoninle ilişkisi araştırılmış diğer bir psikiyatrik hastalık, bipolar bozukluktur. Bipolar bozukluğu olan hastalarda, melatonin düzeyinin düşme eğiliminde olduğu saptanmıştır (151). Bir çalışmada, plazma melatonin seviyesi manik atak süresince depresif атаğa göre yüksek bulunmuştur (152).

Şizofreni hastalarında yapılan çalışmalarda da sirkadiyen ritm bozukluğuna ve düşük serum melatonin düzeylerine rastlanmıştır (153).

Obsesif-kompulsif bozukluğu olan hastalarda yapılan bir çalışmada 24 saatlik serum melatonin düzeyi kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur (154). Cameron ve arkadaşlarının panik bozukluğu ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, panik bozukluğunda azalmış gece melatonin düzeyi saptanmıştır (155).

Yine dirençli epileptik hastalarda düşük melatonin düzeyleri gösterilmiş ve bu düşük düzeylerin epilepsi nöbetini artırdığı bildirilmiştir (156).

2.7.5.2. Melatoninin Kemik Kütlesi Üzerine Etkisi

Melatoninin kemik üzerine etkisi direkttir. Melatonin sekresyonunun baskılanması serum kalsiyum konsantrasyonunu düşürürken, melatonin uygulaması ise artırır. Melatoninin kemik iliğinde bol miktarda bulunması, kemik hücrelerinde otokoid etki ettiğini düşündürmektedir. Melatonin ayrıca doz bağımlı olarak kemik matriks proteinlerindeki artırır. Osteoblastik bir protein olan osteoprotegerinin de melatonin ile arttığı saptanmıştır (157).

Postmenapozal dönemde osteoporoza karşı kullanılan bifosfonatlara ilave olarak melatonin uygulamasının, gerek direkt kemik üzerine olumlu etkileri ve gerekse bu ilaçlara bağlı yan etkileri azaltması sebebiyle kemik koruyucu etkiyi güçlendirebileceği düşünülmektedir (158).

2.7.5.3. Melatoninin Migrene Bağlı Baş ağrısında Etkisi

Migrene bağlı başağrısında melatoninin rolü tam anlaşılmamakla birlikte, bu hastalarda idrar melatonin düzeyleri düşük bulunmuştur. Melatonin reseptörlerinin serebral arterlerde gösterilmesi, melatonin uygulamasının insanda ve deneysel hipertansif sıçanlarda kan basıncını düşürmesi, melatoninin arter düz kaslarını gevşetmesi, melatoninin serebral kan akımını değiştirebileceğini ve böylelikle migrene bağlı baş ağrısında olumlu etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir (159).

2.7.5.4. Melatoninin Kontrasepsiyonda Etkisi

Moğulkaç ve arkadaşları, melatoninin üreme sistemi ve tiroid fonksiyonları üzerine baskılayıcı etkisinin olduğunu ve hipotalamus düzeyinde gonadotropin salıverici hormon salınımını doğrudan etkiyerek lüteinizan hormon ve testosteron salgılanmasını baskıladığını bildirmişlerdir (160).

Yüksek doz melatonin kullanımının menstruel döngü sırasında lüteinizan hormonun zirve yapmasını engellediği ve folikül uyarıcı hormon düzeylerinin sabit kalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu durum, ovulasyonu ve luteal faz esnasında progesteron miktarındaki yükselmeyi engellemektedir. Normal sağlıklı kadınlarda melatonin salgısı, menstruasyon döngüsünde değişiklik göstermez (146). Ancak melatonin, overler tarafından salgılanan ve prolaktin yapımını idame ettiren estradiol salgısını baskılamaktadır. Bunun yanında, serum melatonin konsantrasyonları, hipotalamik amenoresi olan kadınlarda artmaktadır. Hipogonadotropik hipogonadizmlilerde de serum melatonin düzeyleri artmıştır ve testosteron tedavisine yanıt olarak düşer. Bu bulgular melatonin salgısının, seks steroidlerinin üretimini etkileyebileceğini ortaya koymaktadır (161).

Melatonin, kadında kontraseptif olarak tek başına (melatonin 300 mg/gün) ya da progestin ile birlikte (melatonin 75 mg/gün + progestin 0.3-0.75 mg/gün) kullanıldığında ovülasyonu inhibe etmiştir (159,161).

2.7.5.5. Melatoninin Yaşlanma Üzerine Etkisi

Çocuklarda, yetişkinlerden daha yüksek miktarda melatonin salgılanır. İleri yaşlarla birlikte bu salınım azalır (142). Melatonine ait sirkadiyen ritim, 3-4 aylık döneme kadar yenidoğanda gözlenmemektedir. Doğumdan hemen sonra melatonin ve 6-sulfateoxymelatonin (aMT6-s) miktarı oldukça düşüktür. Doğumdan sonraki 6-8. haftalarda melatonin düzeyleri belirgin miktarlara çıkar (162). Bu dönemden sonra melatonin artarak 3-5 yaşa kadar en yüksek

seviyesine ulaşır. Artışlar özellikle geceleri daha yüksektir. Gençlik döneminde yetişkin düzeylerine ulaşır ve bundan sonra melatonin düzeyleri yavaşça düşmeye başlar. Yaş ilerledikçe pineal bezin ritmi de bozulur ve ileri yaşta salınımında azalma belirginleşir. Yaşla beraber pineal bez işlevi ve melatonin düzeyleri azalsa da, geceleri melatonin düzeyleri zirveye ulaşmaya devam eder (130,131).

Antioksidan kapasitenin azalması ve serbest radikallerin oluşturduğu hasar yaşlanma sürecinde organlarda gözlenen anatomik ve işlevsel dejenerasyonun sebeplerindendir (142,163). Bu durum, yaşla birlikte azalan melatonin hormonuna bağlanmıştır çünkü melatoninin antioksidan enzimleri uyarıcı, lipid peroksidasyonunu azaltıcı ve beyin dokusunu oksidatif hasardan koruyucu etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Beyinde ortaya çıkan nörodejeneratif hasarların birçoğunda azalan melatonin nedeniyle artan serbest radikaller suçlanmıştır (135). Önemli bir hidroksil radikal toplayıcısı olan melatoninin yaşlanmayla birlikte kaybı, beyin dokusunun oksidatif saldırıya açık hale gelmesine neden olmaktadır. Melatonin tedavisinin bu durumu engelleyebileceği bildirilmiştir (142).

2.7.5.6. Melatoninin Termoregülasyon ve Biyolojik Saat Üzerine Etkisi

Melatonin insan ve hayvanlarda termoregülasyonda önemli bir role sahiptir. Melatonin, merkezi vücut ısını azaltırken, periferik cilt ısını artırır ve böylece vücutta ısı kaybına yol açar (129). Vücut ısının düzenlenmesi, ısı merkezi olarak bilinen hipotalamusun ön bölümündeki preoptik sahada gerçekleşir. Araştırmalarda bu merkezdeki nöronlarda melatonin reseptörlerinin bulunduğu ve melatonin hormonunun bu merkezi etkileyerek vücut ısında düşmeye neden olduğu belirlenmiştir (148).

Melatonin, görevi biyolojik saatin düzenlenmesi olarak bilinen tek hormondur. Melatoninin yeterli ve dengeli salgılanmaması sonucu oluşan jet lag rahatsızlığında yorgunluk hissi, uykusuzluk, iştahsızlık, hazımsızlık, zihinsel problemler, huzursuzluk, zaman algısında bozulma, olaylara tepki verme zamanının uzaması, yönelim bozukluğu, nedensiz yaygın vücut ağrıları ve bazen terleme gözlenebilir. Herxheimer ve arkadaşları jet lag'in engellenmesi ve tedavisinde melatonin hormonunu önermişlerdir (164).

2.7.5.7. Melatoninin Kanserdeki Etkisi

Melatoninin, kanserli dokularda hücre proliferasyonunu durdurduğu, mitotik aktiviteyi engellediği ve meme dokusunda anti-östrojen etki gösterdiği saptanmıştır. Bu etkileri

kemoterapötik ajanlara benzetilmektedir. Dolayısıyla melatonin, kanser hücrelerinin çoğalmasını, tümör büyümesini ve metastazı azaltmaktadır. Ayrıca prostat ve meme kanseri olan hastalarda melatonin seviyeleri düşük bulunmuştur (129,165).

Bazı araştırmalarda, pinealektominin tümör oluşumunu artırdığı, melatoninin ise azalttığı bildirilmiştir (165). Pinealektomi melanom, lösemi, akciğer, karaciğer, over, hipofiz bezi, prostatın deneysel kanser büyümesini ve metastazını artırırken; yüksek melatonin miktarı bu dokulardaki kanser büyümesini baskılar (166).

2.7.5.8. Melatoninin Kalp Hastalıklarında Etkisi

Melatoninin, hipoksinin giderilmesinde ve hasara bağlı reoksijenasyonda diğer antioksidanlara kıyasla daha etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, melatoninin fizyolojik eksikliğinin, hipoksiyi ve oksidatif hasarı artırabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle oksidatif hasara bağlı kalp hastalıklarında, melatonin kullanımının önemli olabileceği öne sürülmüştür. Melatonin güçlü antioksidan etkisi ile aterosklerozun önlenmesini sağlamaktadır (167). Melatoninin kolesterol metabolizmasını düzenleyici etki gösterdiği, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptör sayısını azaltarak LDL metabolizmasında rol oynadığı bildirilmiştir (168).

Gece boyunca salınan melatoninin kan basıncını ve kalp hızını düşürmesinden dolayı, yüksek tansiyonun dengelenmesinde önemli rol oynayabileceği düşünülmüştür (169). Bir grup araştırmacının yaptıkları bir çalışmada, intravenöz melatonin uygulamasının ventriküler taşikardi, ventriküler fibrilasyon ve prematüre ventriküler kontraksiyonu engellediği saptanmıştır. Ayrıca kardiyak aritmilerin önlenmesinde de askorbik asitten daha etkili olduğu bildirilmiştir (169).

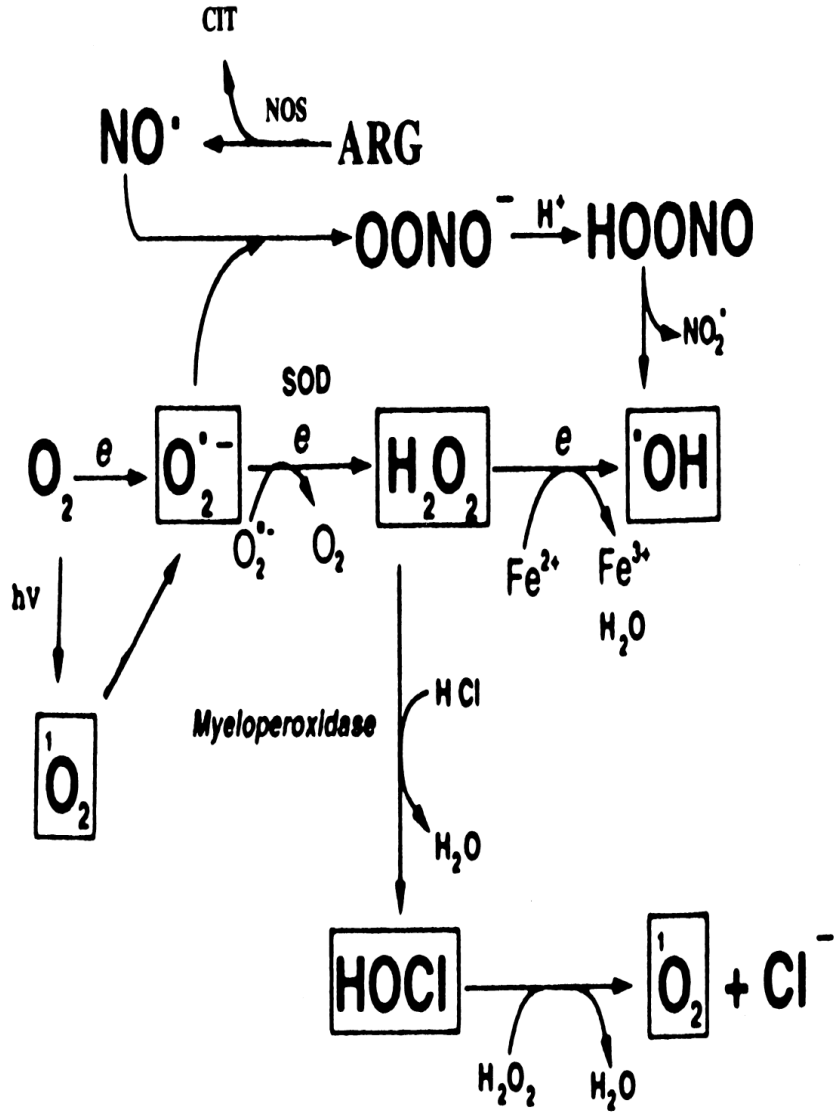
Son yıllarda elde edilen bulgular melatoninin kalp-damar sistemine etkilerinin reseptör ve non-reseptör aracılı olduğunu göstermiştir. Melatonin serebral arterlerde vazokonstriksiyona, periferdeki damar yataklarında ise vazodilatasyona neden olmaktadır. Miyokard infarktüs riski ve ani ölüm riski olan koroner kalp hastalarında melatonin düzeyleri düşük bulunmuştur (170).

2.7.6. Melatoninin Nöroprotektif Etki Mekanizmaları

2.7.6.1. Melatoninin Antioksidan Etkisi

Oksidatif stresin oluşturduğu reaktif oksijen turleri normal oksijen molekulune gore daha yuksek kimyasal aktiviteye sahiptir. Baslica reaktif oksijen turleri; superoksit anyonu (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil (ROO) ve alkoksil (RO) radikalleridir (171). Serbest radikaller dis atomik orbitalde bir veya daha fazla eslesmemis elektronlara sahip, yuksek enerjili, stabil olmayan reaktif molekullerdir. Bu nedenle vucutta protein, lipid, DNA ve nukleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyalle temasa gecerek zarar verirler. Bu zararın yashlanmayı artirdigi ve yashlanmayla arttigi dusunulmektedir. Cesitli kalp hastaliklari, kanserler, bagisiklik sisteminin zayıflaması, dejeneratif sinir sistemi hastaliklari, serbest radikallerle iliskili bulunmustur (172).

O_2 molekulu birçok serbest radikale metabolize olur ve ara urunleri reaktif eder. Tek bir O_2 elektronunun indirgenmesi superoksit anyon radikallerini olusturur. Superoksit dismutaz (SOD) varliginda hidrojen peroksit (H_2O_2) veya nitrik oksitle (NO) eslesip peroksit nitrit ($ONOO^-$) anyonunu olusturur. H_2O_2 ise fenton reaksiyonu ile yuksek toksik hidroksil (OH) radikalini olusturur. Nötrofil ve monositlerin aktivasyonunda miyeloperoksidaz aktivitesi hipoklorur asit (HOCl) olusturur (Sekil 12). Bu reaktif ajanların birçoğu inflamasyon bölgesinde oluşur. Melatoninin; OH, H_2O_2 , HOCl, O_2 ve $ONOO$ gibi ajanları temizleyebilme yeteneği inflamasyon sırasındaki doku hasarını azaltır (173).



Şekil 12: O₂ Molekülünden Serbest Radikal Oluşumu

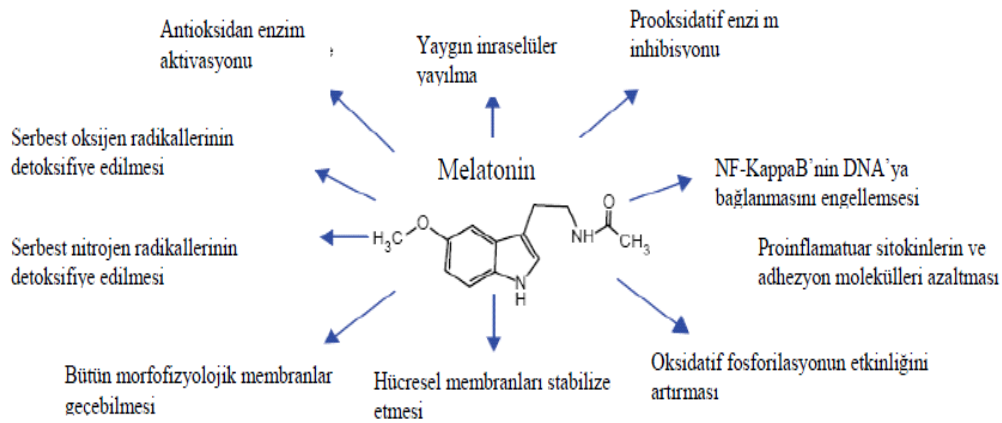
Melatonin, hem invivo hem de invitro çalışmalarla kanıtlanmış çok önemli bir antioksidandır (Şekil 13). Melatonin; doğrudan serbest radikalleri gidererek, dolaylı yoldan özgül melatonin reseptörleri aracılığı ile antioksidan enzimleri aktive ederek veya pro-oksidatif enzimleri inhibe ederek koruyucu özellik gösterir (174). Güçlü bir oksijen radikal toplayıcısı olarak dokuların hasara uğramasını geciktirebilir ayrıca bu serbest radikal toplayıcı özelliği için bağlanma bölgesine ve reseptöre gereksinim duymaz (173).

Melatonin, en zararlı radikallerden biri olan $OH^\bullet$ radikalini nötralize ederek ortadan kaldırır. Bu $OH^\bullet$ radikallerinin giderilmesinde, melatoninin indol nükleusunun yan zincirindeki metoksi ve asetil grupları rol oynamaktadır. Melatonin $OH^\bullet$ radikaliyle reaksiyona girerek indolil kation radikaline dönüşür. Bu bileşik ortamda bulunan süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) radikalini tutarak etki gösterir (175). Melatonin süper oksit dismutazın (SOD) mRNA'sını artırarak da süperoksit

radikalini engeller. Ayrıca peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GR), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin melatonin ile uyarıldığı saptanmıştır (175). Melatonin aynı zamanda, H_2O_2 'nin hücre içi konsantrasyonunu azaltarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek de antioksidan etki göstermektedir (175).

Antioksidan savunma sistemi ile ilişkili diğer bir enzim sitokrom P450 enzimidir. Bu enzim ksenobiyotik metabolizması aracılığı ile serbest radikal oluşumunu artırır. Melatoninin, P450 aktivitesini azaltarak serbest radikal oluşumunu ve dolayısı ile oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (175).

Melatonin, fizyolojik konsantrasyonlarda serebellumda NOS aktivitesini baskılayarak nöral ve kardiyovasküler fonksiyonların fizyolojik düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu etkide, melatoninin serbest radikal oluşumunu önleyici etkisine aracılık etmektedir. NO tek başına bir serbest radikaldir ve O_2^- varlığında $ONOO^-$ oluşumunu artırır. Melatonin ile NOS aktivitesinin baskılanması $NO\cdot$ oluşumunu azaltarak bu yolak üzerinden oksidatif hasarı azaltmaktadır (176). Melatonin, lipofilik özelliğinden dolayı organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir, KKB'yi rahatlıkla geçebilir, hücrelerin çekirdekleri dahil tüm organellerine ulaşabilir. Bu özellik, dejeneratif ya da proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı makromoleküllerin ve özellikle DNA'nın oksidatif hasardan korunmasında melatonine bir üstünlük kazandırmaktadır. Yaşlanmayla birlikte, stres veya toksik ajanlara maruziyet sonucu ortaya çıkan serbest radikal oluşumunu önleyen antioksidan kapasite de azalmaktadır. Bu antioksidan kapasitedeki azalma, melatonindeki azalmayla paralellik gösterir. Bu durum melatoninin antioksidan özelliği ile örtüşmektedir (177).



Şekil 2.7. Melatoninin antioksidan fonksiyonu

Şekil 13: Melatoninin Antioksidan Fonksiyonu

Doğal bir antioksidan olan melatoninin, OH radikalini nötralize etme yeteneğinin glutatyondan 5 kat, peroksit radikal giderme özelliğinin ise E vitamininden 2 kat fazla olduğu saptanmıştır (177). Melatoninin bu antioksidan özelliği, yaşam döngüsünde oldukça önemli olan DNA'yı oksidatif hasardan korumakla birlikte, melatoninin hasarlı DNA'nın onarımını teşvik ettiği de bildirilmektedir. Melatoninin antioksidan enzimleri uyardığı, lipid peroksidasyonunu engellediği ve beyin dokusunu oksijen kaynaklı serbest radikallerinden koruduğu saptanmıştır (177).

Melatoninin anti oksidan ve serbest radikal kovucu etkisini in vitro ortamda göstermek kolaylıkla mümkün olsa da bazı çalışmalar bunun in vivo melatonin konsantrasyonlarının 1000-10000 katı ile gerçekleştirilebileceğini göstermektedir (178). Hayvan deneylerinde yüksek doz melatonin ile (10-450 mg/kg parenteral) antioksidan etkiler görülebilmekle beraber uzun dönem güvenilirliği ve etkisi hakkında yeterli veri yoktur (179). Bu megadozlar insanlarda melatonin reseptör desensitizasyonu ile uyku kalitesini ve sirkadiyen ritmi bozabilir (141). Hücre bağımlı (insan makrofajları) ve hücre bağımsız (bakır sülfat) LDL oksidasyonu gerçekleştirip anti oksidanların koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada, melatoninin fizyolojik konsantrasyonun 10.000-100.000 katı dozda antioksidan etkisi görülmüş, vitamin E (alpha-tocopherol) ise melatoninden 50-100 kat potent bulunmuş ve fizyolojik konsantrasyonlarda antioksidan etkisi gözlenmiştir. Vitamin C (askorbik asit) ve triptofan da melatoninden daha etkili bulunmuş ve bu etkilerini fizyolojik konsantrasyonlarda göstermişlerdir (178).

Melatoninin oksidatif stresi, direkt serbest radikal kovucu etkisi, gen regülasyonu (antioksidan enzim indüksiyonu, prooksidan enzim supresyonu) ve mitokondriyal homeostaz ile azalttığı bilinmektedir. Gen ekspresyonu MT1 ve MT2 reseptör bağımlı iken, direkt serbest radikal kovucu etkisi için reseptöre ihtiyaç duymaz. Mitokondriyal koruyucu etkisi ise mitokondriyal solunum, ATP üretimi, membran potansiyeli, geçirgenlik ve elektron kaybını önlemesi ile gerçekleşmektedir (180).

Sıçanlarda karbontetraklorit'in indüklediği hepatotoksisitede melatoninin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, melatoninin hepatositler üzerindeki antioksidan etkisi hem karaciğer enzimlerindeki anlamlı azalma ile hemde histopatolojik yöntemlerle gösterilmiştir (181).

2.7.6.2. Melatoninin İmmunmodülatuar Etkisi

Farelerin devamlı ışığa maruz kalması veya gece β -adrenerjik reseptör blokörlerinin uygulanımı gibi melatonin oluşumunun inhibe edildiği şartlarda, immün fonksiyonların baskılandığı görülmüştür. Melatoninin humoral ve hücrel immün yanıtı artırdığını destekleyen veriler bulunmaktadır (182). Melatoninin bu etkisi normal şartlarda belirgin değildir. Yaşlanma, viral hastalıklar, kortikosteroid kullanımı veya akut stress gibi immün sistemin baskılandığı durumlarda etki belirgin hale gelmektedir (183).

Wichmann ve arkadaşları, farelerde yumuşak doku travması ve hemorajik şok sonucu immün fonksiyonlardaki baskılanmanın melatonin ile geri çevrildiği ayrıca kronik melatonin tedavisinin insanda lökosit doğal öldürücü hücre aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir (184).

Melatoninin immunosupresyona karşı olan etkileri yada immün fonksiyonları artırıcı etkileri, T-helper lenfositlerdeki spesifik reseptörlere bağlanması ile ilişkilidir. Melatoninin bu reseptörlere bağlanması, interferon-gamma, IL-2 veya opioid peptidlerin salgılanmasını artırmaktadır. Melatoninin indüklediği opioidler, melatoninin hematopoetik etkisine aracılık etmektedir (184).

Fareler üzerinde yapılan araştırmalar, melatoninin kemik iliği T lenfosit hücrelerinde interleukin-4 (IL-4) yapımını ve stroma hücrelerinde granülosit makrofaj koloni stimulan faktör yapımını uyardığını, ayrıca kemik iliği hücrelerini, sitotoksik bileşimlerin neden olduğu apoptozisten koruduğunu göstermiştir (185).

Melatoninin, viral ve bakteriyel enfeksiyonlarda çeşitli organlardaki fonksiyon bozukluklarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (182).

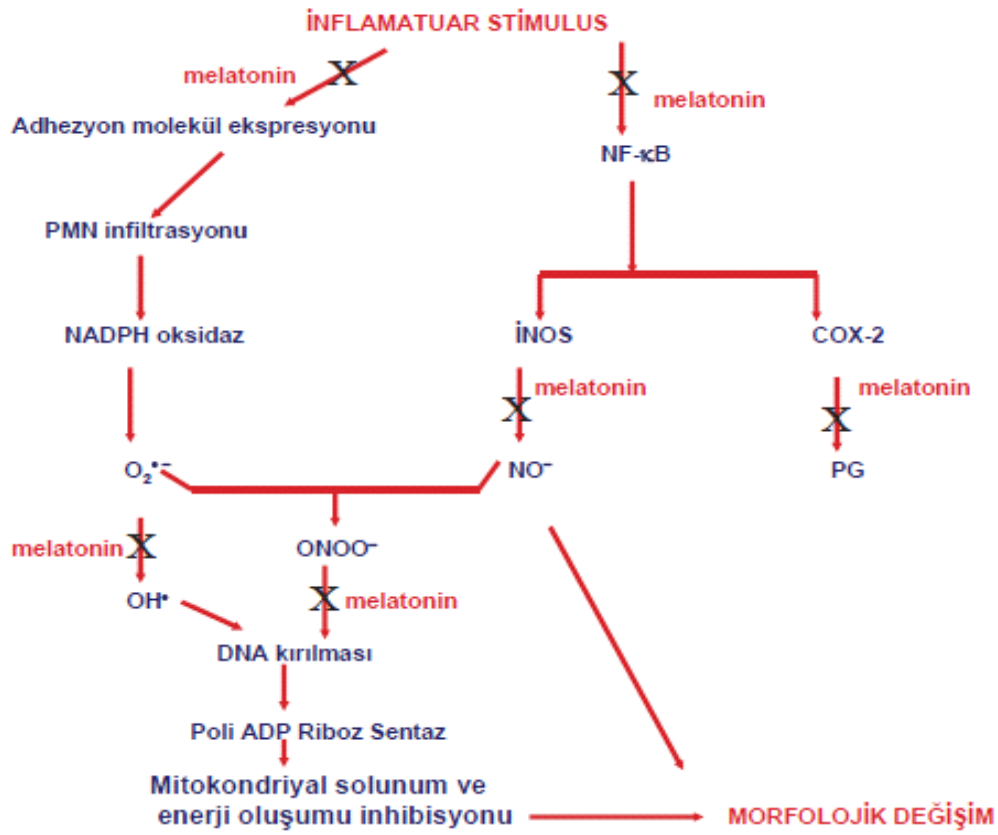
Melatonin dozla bağlantılı olarak immüdepresan etki de göstermektedir. Yüksek farmakolojik dozlarda ($> 100\text{mg/kg}$) melatonin antikor oluşumunu baskılamaktadır. Yüksek dozlarda melatoninin uzun süre reseptöre bağlı kalması down-regülasyona yol açarak immüsupresyona neden olmaktadır (186).

Graft reddinde serbest radikaller önemli rol oynamaktadırlar. Melatoninin immün yanıt üzerindeki inhibitör etkisinin molekülün antioksidan etkisi ile ilişkili olması, melatonin uygulamasının organ transplantasyonunda yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca toksisitesinin olmaması da bu ajanın transplantasyonda güvenle kullanılacak bir ajan olduğunu desteklemektedir (182).

2.7.6.3. Melatoninin Anti-İnflamatuar Etkisi

İnflamasyonun uyarılmasıyla doku hasarına giden yolak üzerinde çeşitli kademelerde melatonin ile blokaj, bu ajana anti-inflamatuar ve doku koruyucu özelliği sağlamaktadır (Şekil 14).

Çeşitli inflamasyon modellerinde (yanık hasarı, sepsis, iskemi/reperfüzyon gibi) nötrofil aktivasyonunun dokularda neden olduğu oksidan hasarı melatoninin anlamlı olarak geri çevirdiği gösterilmiştir (187).



ŞEKİL 5. Doku hasarına yol açan inflamatuvar yolakta melatoninin etkileri (43).

Şekil 14: Doku Hasarına Yol Açan İnflamatuar Yolakta Melatoninin Etkileri

Nuclear factor-kappa B (NF-κB), immün ve inflamatuvar cevapları içeren çok sayıda geni regüle eden oldukça yaygın bir faktördür (188). Sitozolik NF-κB, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artıran, oksidan ve viral proteinleri de içeren birçok mediyatör tarafından aktive edilir. NF-κB'nin nukleusa geçmesi ve DNA'ya bağlanması, birçok enzimin ve interlökin-2 (IL-2), interlökin-6(IL-6), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), nitrik oksit sentazı (iNOS) da

içeren proinflamatuvar sitokinlerin üretimini regüle eder. Melatonin ve diğer anti-oksidanlar, NF- κ B'nin nukleusa translokasyonunu ve proinflamatuvar sitokinlerin çalışmasını azaltırlar (189).

Welin ve arkadaşları, fetal koyunlarda intrauterin asfiksi modeli oluşturup, melatoninin inflamatuvar cevabı azaltarak beyin hücrelerinin ölümünü engellediğini göstermişlerdir (190). Yine, Villapol ve arkadaşları, neonatal sıçanda hipoksik iskemik inme modeli oluşturup, melatoninin beyaz cevherde inflamasyonu azaltarak miyelinizasyonu indüklediğini göstermişlerdir (191). Sıçanlarda umbilikal kord oklüzyonu sonrası melatoninin, mikrogliyal aktivasyonu azaltarak anti-inflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır (192).

Sıçanlarda subaraknoid kanama sonrası erken beyin hasarı döneminde KBB bütünlüğünün bozulmasına sekonder beyin ödemi oluşturulmuş ve melatoninin nöroprotektif etkisi gösterilmiştir. Melatonin sıkı bağlantılarda bulunan protein ekspresyonunun (ZO-1, occludin, claudin-5) bozulmasını engelleyerek KBB disfonksiyonunu önlemiştir. Melatonin ayrıca matriks metalloproteinaz ve vasküler endotelial büyüme faktörü ekspresyonunu azaltarak da inflamatuvar cevabın azalmasına katkıda bulunmuştur. Aynı zamanda, erken beyin hasarı döneminde artan pro-inflamatuvar sitokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) düzeylerini de baskılamıştır (193).

2.7.6.4. Melatoninin Anti Apoptotik Etkisi

Apoptozis, DNA'nın parçalanması ve hücre membran değişiklikleri ile komşu hücrelere hasar vermeden ve inflamasyona yol açmadan meydana gelen programlanmış bir hücre ölümüdür (194). Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da apoptozisin erken fazında mitokondrinin önemini göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (194). Apoptotik yollar genel olarak intrinsik (mitokondri aracılı) ve ekstrinsik (reseptör aracılı) olarak ifade edilmektedir. Pro-apoptotik proteinler (Bax, Bad, Bcl-2) apoptoza gidişi hızlandırırken, anti-apoptotik proteinler (p53, c-myc, bcl-2, bcl-xl) apoptozu yavaşlatmaya çalışırlar. Kaspazlar ise apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarında görev alırlar. Her iki yolağında ortak proteini olan Caspase-3, kromatinlerin yoğunlaşması,

DNA'nın parçalanması ve membran proteinlerinin yıkılması gibi morfolojik değişiklerin meydana gelmesinden sorumludur (195).

Oksidatif stres altında otofaji hücrenin savunma mekanizması olarak devreye girer ancak uzamış otofaji apoptotik olmayan tip 2 programlanmış hücre ölümü ile sonuçlanabilir (196). Otofaji koşullara göre hücreler için kurtarıcı olabildiğı gibi hücrenin ölümüne de sebep olabilir (197). Melatoninin otofajiyi düzenleyici etkileri çeşitli hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Fare deneyinde apoptozise giden hepatoma H22 hücrelerinde melatoninin otofajiyi indükleyerek hücre koruyucu etki gösterdiği kanıtlanmıştır (198). Subaraknoid kanama modelinde de melatoninin anti-apoptotik etkisini otofajiyi artırarak göstermiştir (199). Sıçanlarda serebral iskemi/reperfüzyon hasarında ise melatoninin, otofajiyi azaltarak serebral infarktı ve nöronal hücre ölümünü engellediğı görülmüştür (199).

Melatoninin apoptozun regülasyonundaki yeri ilk kez 1994 yılında keşfedilmiştir. Bunu takiben pek çok deneysel çalışmada apoptoz üzerine melatoninin etkileri incelenmiş ve sonuçlar 3 başlık olarak özetlenmiştir (197);

1. İmmün hücrelerdeki apoptozun inhibisyonu (anti-apoptotik etki),
2. Nöronal hücrelerdeki hücre ölümünün önlenmesi (anti-apoptotik etki),
3. Kanser hücrelerinde apoptozun hızlandırılması (pro-apoptotik etki)'dir.

Melatoninin öncüsü olan N-acetylserotonin iskemik beyin hasarında mitokondriyal hücre ölüm yolağını ve otofajik hücre ölümünü engelleyerek nöroprotektif etki göstermiştir (200). Sitokrom c, Smac, apoptoz indüksiyon faktörleri gibi apoptojenik faktörlerin salınımını ve kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu engelleyerek mitokondriyal hücre ölüm yolağını bloke etmiştir. p62 düzeyini azaltarak da otofajiyi durdurmuştur.

2.7.7. Yenidoğan Hastalıklarında Melatonin

Hücre ve doku hasarının önemli mediyatörlerinden olan ROS ve RNS, oksijen ve nitrojen kaynaklı metabolitlerdir (201). Serbest radikaller tarafından gerçekleştirilen hasar oksidatif stres olarak adlandırılır. Anti-oksidan defans sistemi, serbest radikal üretimini kontrol eder. Serbest radikal oluşumu ile antioksidan defans sistemi arasında kritik bir denge söz konusudur (174). Serbest radikal; hipoksi, hiperoksi, iskemi, inflamasyon gibi bazı biyokimyasal olayların son ürünüdür. Fetal hayatta, hipoksinin derecesi ile serbest radikallere bağı oksidatif

stres arasında direkt ilişki gösterilmiştir (202). Biyolojik toksik etki skalası çok geniş olan serbest radikaller; lipid, protein ve polisakkaritlerin oksidasyonuna ve DNA hasarına neden olur. Oksidatif stres intrasellüler ve ekstrasellüler koruyucu sistemle ROS arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Yenidoğanlar, özellikle prematüre bebekler serbest radikallerin oksidatif hasarına oldukça duyarlıdır (203).

Bebekler, doğum sırasında hipoksik intrauterin hayattan ekstrauterin hayata geçerken hiperoksik değişime girmiş olurlar ve bu durum doğum odasında canlandırılıp oksijen desteği alanlarda daha şiddetlidir. İnfantlar, özellikle prematüre olanların antioksidan defans mekanizmaları tam gelişmemiştir. Fenton reaksiyonu ile yüksek demir düzeyi açığa çıktığında toksik radikaller oluştururlar (204).

Oksidatif stres özellikle yenidoğanlarda birçok organ sistemini etkiler bu nedenle Saugstad tüm spektrumu 'Neonatolojide Oksijen Radikallerine Bağlı Hastalıklar' başlığı altında tanımlamıştır (205). Bronkopulmoner displazi, prematüre retinopatisi, nekrotizan enterokolit, periventriküler lökomalazi gibi birçok hastalık bu kapsama girer. Esasen bunlar birbirinden farklı hastalıklar değil, aynı oksidatif hasar kaskadının değişik sistemleri tutmasıyla meydana gelen sonuçlardır (206).

Melatonin oldukça etkili bir antioksidan ve serbest radikal kovucusudur (207). Melatonin reaktif hidroksil radikallerini detoksifiye ederek ROS'ni doğrudan etkisiz hale getirir. Melatonin ve metabolitleri ROS/RNS ile etkileştiği gibi organik radikallerlede etkileşir, antioksidan enzimleri upregüle ederken (glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz), prooksidan enzimleri (nitrikoksit sentaz, lipooksijenaz) down regüle eder (208).

Melatonin lipid peroksidasyonunu engeller, mitokondriyal hidroperoksit seviyelerini düşürür, glutatyon homeostazını düzenler (209). Ayrıca DNA'ya bağlanan aktive B hücrelerini artırarak ve muhtemelen nukleusa translokasyonunu engelleyerek nukleer faktör kappa hafif zincirini azaltır (210). Proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimini ve polimorfonukleer lökositlerin inflamatuvar alana göçünü azaltır (211).

Hasta çocuklarda muhtemelen artmış oksidatif strese bağlı olarak, endojen melatonin seviyeleri aynı yaştaki kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (212). Bu bilgiler ışığında melatoninin, term ve pretermelerde serbest radikallere bağlı hastalıklarda adjuvan olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Preterm infantlarda melatonin düzeyi düşük olduğundan

dışardan desteklemek, onların sağlığı için gerekli seviyelere ulaşmasını sağlayabilir (213). Melatoninin bu alanda kullanımı ümit verici görünse de çalışmaya açık bir konudur.

2.7.8. Melatonin ve Perinatal Beyin Hasarı

İnsanlarda pineal bezin melatonin sentez fonksiyonu postnatal dönemde başlar ancak melatonin plasentadan geçebildiğinden fetal dolaşımında da melatoninin gece yükselip gündüz düşen sirkadiyen ritmi görülmektedir. Gebelik süresince annenin gece melatonin seviyesi 26-32 GH'dan başlayarak terme kadar giderek yükselir. Gündüz melatonin yükselmeleri 34. GH'da başlar ancak gece değerleri kadar belirgin değildir. İkiz gebeliklerde 28. GH'dan başlayarak tekil gebeliklere göre daha yüksek seviyeler görülür, preeklampsi komplikasyonu gelişirse melatonin seviyeleri düşmeye başlar. Term yenidoğanların umbilikal dolaşımında melatoninin sirkadiyen ritm gösterdiği bilinmektedir. Umbilikal arter ve ven arasında melatonin düzeyi açısından bir fark olmamakla beraber, annenin dolaşımındaki seviyeden düşüktür (214). Bağcı ve arkadaşları, umbilikal arter ve vendeki melatonin seviyelerini spontan vajinal doğumda, sezaryana göre daha yüksek saptamışlardır (215). Melatonin seviyesi ilk 3-4 ayda çok düşük seviyelerdedir ve sirkadiyen ritm göstermez ancak hem preterm hem de term bebeklerde giderek yükselir ve yaklaşık bir yaşında erişkin seviyelerinin yarısına kadar ulaşır (216).

Preterm ve term infantlarda fetal beyin hasarı, morbidite ve mortalite açısından önemli bir faktördür. İmmatür beyinde kan damarları ve su yoğunluğu daha fazla, miyelin oranı az, korteks gelişmemiş, germinal matriks daha belirgindir (217). Neonatal hemorajik beyin hasarı (intraventriküler hemoraji) ve beyaz cevher hasarı (periventriküler lökomalazi) uzun dönemde cerebral palsi ve kognitif sorunlara sebep olur. Beyin hasarının patogenezi serbest radikallerin SSS disfonksiyonu yapması ile karakterize kompleks ve multifaktöriyel bir kaskaddır (173). Nöropatolojik çalışmalarda, yenidoğanların immatür beyin dokusunun hipoksik iskemik hasara karşı erişkinlere göre daha savunmasız olduğu gösterilmiştir. Bu durum eksitatör aminoasit reseptörlerinin artmış yoğunluk ve fonksiyonu ile ROS/RNS'ye karşı savunmasızlıklarından kaynaklanır (218). Özellikle pretermelerde mortalite ve morbidite fizyolojik homeostazi sağlayıp sağlayamamaları ve serbest radikallere karşı koyabilme düzeyleri ile ilişkilidir (219).

Hipoksik iskemik beyin hasarında nörolojik sekeli azaltmada melatoninin etkili olabileceği düşünülmektedir. Melatonin tüm fizyolojik bariyerleri geçip subsellüler düzeye ulaşabildiği için etki düzeyi yüksek bir maddedir (220). Melatoninin fetal beyindeki nöroprotektif etkisi

hayvan çalışmaları ile araştırılmıştır. Fetal koyunlarda umbilikal kord oklüzyonu ile intrauterin asfiksi modeli oluşturulup melatonin verildiğinde, oksidatif strese azalma saptanmış; fetal beyinde apoptozun indüklenmesiyle hücre ölümü gerçekleştirildiğinde, melatonin verilen grupta inflamatuvar cevabın azaldığı görölmüştür (190,221). Neonatal hemorajik beyin hasarı olan sıçanlarda melatoninin sistemik replasmanının posthemorajik beyin atrofisinden koruduğı gözlenmiştir (222). Melatonin juvenil sıçanlarda beyin hasarını iyileştirmede, kognitif ve sensörimotor disfonksiyonun düzeltilmesinde de etkili bulunmuştur (222). Husson ve arkadaşları; yenidoğan farelerde periventriküler lökomalaziye taklit edecek şekilde eksitotoksik beyaz cevher hasarı oluşturulduğunda, melatoninin adenil siklaz reseptörleri aracılığıyla nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Melatonin alan farelerde, ibotenatin indüklediğı beyaz cevher kistlerinde % 82 azalma saptanmıştır. Melatoninin, beyaz cevher lezyonlarını başlangıçta önleyemezse, ikincil olarak lezyonların onarımını desteklediğı gösterilmiştir. Axonal markerlar da melatoninin axonal yeniden büyümeyi ve yeniden yapılanmayı indüklediğini desteklemiştir (223).

Fulia ve arkadaşları asfiktik yenidoğanlara yaşamın ilk 6 saatinde antioksidan molekül olan melatonin vermişler ve tedavi öncesi/sonrası lipid peroksidasyonunu, serum malondialdehit, nitrit/nitrat düzeylerini ölçmüşlerdir. Asfiktik yenidoğanlarda tedaviden 12 ve 24 saat sonra lipid peroksidasyon ürünlerinde belirgin azalma saptanmıştır. Nitrit ve nitrat seviyelerinde asfiktik olup melatonin verilmeyen grupta yüksek seyrederken melatonin tedavisi verilenlerde belirgin düşüş göstermiştir. Melatoninin bu koruyucu etkisi antioksidan özelliğini gösterdiğ gibi mitokondriyal elektron transportunu artırdığını da destekler niteliktedir (224).

Robertson ve arkadaşları, hipotermi tedavisi alan yenidoğan domuzlara melatonin verildiğinde serebral enerji metabolizmasının geliştiğı ve beyin hasarının azaldığını saptamışlardır. Bu çalışmada, hipoksik iskemik hasardan 10 dk sonra melatonin 5 mg/kg/saat dozunda 6 saat iv olarak verilmiş ve hipotermi tedavisinin 24. saatinde tekrarlanmıştır. Magnetik rezonans spektroskopisi biyomarker ile (derin gri cevher laktat/N-asetil aspartat ve laktat/creatin) cerebral enerji metabolizmasının, melatonin verilen grupta belirgin olarak düzeldiğı gösterilmiştir. Melatonin destekli hipotermi, cerebral ATP seviyelerinin yükselmesinde etkin olmuştur (225).

Melatoninin plasentayı getiğı gösterildikten sonra hipoksik hasar için risk altındaki fetüslere melatonin replasmanı yapılmasında tartışılmaya başlanmıştır. Melatoninin maternal-fetal transferini gösterebilmek için terme yakın gebeye melatonin verildikten sonra fetal sirkülasyondaki konsantrasyon ölçölmüştür. Anneye 3 mg melatonin oral olarak verildikten 2

saat sonra umblikal vendeki düzey ile maternal vendeki düzeyin korele olduğu gör÷lm÷ştür. Bu bilgiler, asfiksi riski altındaki fetüsü serbest radikal hasarından korumak adına maternal dolaşımdan fetal dolaşıma rahatlıkla geçebilen melatoninin gelecekte bu amaca yönelik kullanılabileceğini desteklemektedir (225,226).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney düzeneği

Deneyin başlangıcında kullanılacak grup sayısı 3 ve her bir grup için hayvan sayısı (istatistiksel olarak karşılaştırılabilir olması kriterine göre) 8 olarak belirlendi. Ancak; ağırlığı 15-35 gram arasında olan tek bir yenidoğan sıçandan alınacak kan ve doku örnekleri, planlanan parametrelerin çalışılabilmesi için yeterli olmadığından, her bir parametre seti için en az 3 hayvan kullanıldı. Sonuç olarak 72 adet Sprague Dawley sıçan (15-35 gr, 9-12 günlük) kullanıldı. Sıçanlar eşit sayıda hayvan içeren üç gruba ayrıldı. Deney hayvanları, 22°C - 24°C sıcaklıkta ve % 65-70 oranında nem içeren 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne sahip ortamda, annenin kafesinde tutuldular ve anne sütü ile beslendiler. Bu çalışma, Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onay alındıktan sonra (Onay tarihi ve numarası: 03.10.2013-91.2013.mar) Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

3.1.1. Hemoliz Modeli

Hemolize bağlı hiperbilirubinemi modelinin oluşumunda, 75 mg/kg dozunda intraperitoneal fenilhidrazin hidroklorit (Merck) kullanılmıştır (233). Fenilhidrazin, biyolojik olarak önemli moleküllerin karbonil grubuyla ($-C=O$) kolayca etkileşime girer. Hemoglobininle etkileşen fenilhidrazin, sitokrom p450 üzerinden oksidatif reaksiyona girererek, serbest radikallerin üretimine ve hücre membranında hemolize yol açmaktadır (227). Deneylerde fenilhidrazin serum fizyolojik içinde çözülerek uygulanmıştır (228).

Fenilhidrazin uygulanan grupta, ortalama hemoglobin ve hematokrit düzeyleri (sırası ile, 4.26 ± 0.24 mg/dl ve $\% 12.28 \pm 0.4$), kontrol grubuna kıyasla (7.85 ± 0.4 mg/dl ve $\% 24.0 \pm 1.48$) anlamlı şekilde düşük bulundu ($p < 0.0001$). Serum total bilirubin ve direkt bilirubin düzeyleri Fenilhidrazin grubunda (sırası ile, 4.41 ± 0.39 mg/dl ve 2.85 ± 0.25 mg/dl), kontrol grubuna göre (sırası ile, 0.17 ± 0.01 mg/dl ve 0.05 ± 0.00 mg/dl) anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.001$).

Çalışmamızda saptadığımız değerler Mejia ve arkadaşlarının fenilhidrazin hidroklorür ile oluşturduğu hemoliz modeline benzer bulunmuştur (233).

3.1.2. Melatonin Dozu

Melatoninin (Sigma, M5250-5G) dozu, nöroprotektif ve anti oksidan özelliğinden faydalanmak için daha önceki çalışmalar dikkate alınarak 10 mg/kg olarak belirlendi (15,229,230). Deneylerde melatonin etanolde çözülerek serum fizyolojik içinde uygulandı.

3.2. Deney Grupları

3.2.1. Fenilhidrazin (FH) Grubu (n=24)

Bu gruptaki hayvanlara 0. ve 24. saatte 75 mg/kg dozunda 0.1 ml/10 gr olacak şekilde serum fizyolojik (SF) içinde çözünmüş fenilhidrazin (FH) intraperitoneal (ip) olarak verildi. 48. saatte ise 0.1 ml/10gr olacak şekilde SF ile %10'luk hazırlanan etanol ip olarak verildi.

3.2.2. Kontrol Grubu (n=24)

Bu gruptaki hayvanlara 0., 24. Ve 48. saatte 0.1 ml/10 gr olacak şekilde SF ile %10'luk hazırlanan etanol ip olarak verildi.

3.2.3. Fenildidrazin (FH) + Melatonin Tedavi Grubu (n=24)

Bu gruptaki hayvanlara 0. ve 24. saatte 75 mg/kg dozunda 0.1 ml/10 gr olacak şekilde SF içinde çözünmüş FH ip olarak verildi. 0. ve 24. saate FH dozundan 30 dk önce ve 48. saatte 10 mg/kg dozunda melatonin SF ile %10'luk hazırlanan etanol içinde 0.1 ml/10gr olacak şekilde ip olarak verildi.

3.3. Deney protokolü

Gruplara ayrılan hayvanlar 54. saatin sonunda dekapite edildi ve kan örnekleri ve beyin dokuları alındı.

Dekapitasyondan sonra:

Kan örneklerinde pro-inflamatuar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β ve anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 düzeylerine bakıldı. Ayrıca kan örneğinde BDNF düzeyi ölçüldü.

Beyin dokusu örneklerinde oksidan hasarın göstergesi olan malondialdehid, endojen bir antioksidan olan glutatyon düzeyi ve dokuda nötrofil infiltrasyonun göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesi ölçüldü.

3.3.1. Doku Myeloperoksidaz Aktivitesi (MPO) Ölçümü

Doku MPO aktivitesi, dokuda nötrofil infiltrasyonunu gösteren biyokimyasal bir parametredir. Bu amaçla doku örnekleri %0.5 'lik HETAP (50mM potasyum fosfat tamponu içinde -pH 6-) homojenize edildikten sonra, 12,000 rpm'de 10 dk, 4C 'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet 50 mM potasyum-fosfat tamponu içinde tekrar homojenize edildi. Daha sonra her bir tüpe 50 mM potasyum fosfat tamponu + o-dianisidin. 2HCl (20 mg/ml) + H₂O₂ (20 mM) + örnek konuldu ve oda ısısında 3 dak. inkübasyon sonrası reaksiyon % 2'lik sodyumazid ile durduruldu, absorban değerleri 460 nm'de okunarak sonuçları kayıt edildi (231).

3.3.2. Dokuda Lipid Peroksidasyon ve Glutasyon (GSH) Tayini

Oksidan hasarın bir göstergesi olan malondialdehid düzeyinin ve dokudaki endojen antioksidan glutasyon miktarının ölçüldüğü bu yöntemde, doku örnekleri ağırlıklarının 10 katına denk gelen miktarda %10 'luk triklor asetik asit (TCA) solüsyonu ile Ultra Turrax (marka) doku homojenizatöründe homojenizasyonu takiben 3,000 devir ve 4 C'de 15 dak. süreyle santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılıp 15,000 devirde 8 dak. daha santrifüje edilerek ve 1.56x10⁻⁵ M-1 cm⁻¹ katsayısı kullanılarak lipid peroksidasyon düzeyi, malondialdehid (MDA) cinsinden spektrofotometrik ölçümle ifade edildi. Glutasyon ölçümlerinde, modifiye Ellman yöntemi kullanıldı ve GSH miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi (232).

3.3.3. Serumda TNF-alfa, IL-1beta, IL-10, BDNF Düzeyi Ölçümleri

Bu ölçümler, TNF- α (elisa kit 96 testlik ASSAYPRO ET 2010-1), IL-1 β (elisa kit 96 testlik ASSAYPRO E12200-1), IL-10 (elisa kit 96 testlik ASSAYPRO E113010-1), BDNF (elisa kit 96 testlik USCNK SEA011 Hu) ticari kitleri kullanılarak yapıldı.

BDNF, SSS'de nöral fonksiyonların devamında, nöronal gelişim, proliferasyon, rejenerasyonda kritik öneme sahip bir nörotrofik faktördür. SSS'de plastisite ve onarımdan sorumlu olan bu büyüme faktörü, deneysel inme modellerinde nöroprotektif etki göstermiş ve beyin hasarı sonrası rejenerasyonda da etkili olmuştur.

3.3.4. Serum Bilirubin, Hemoglobin ve Hematokrit Düzeyi Ölçümleri

Hemoglobin siyanomethemoglobin gibi (Beckman-Coulter LH-750) spektrofotometrik olarak, hematokrit kırmızı kan hücrelerinin indirekt olarak hesaplanması ile ölçüldü. Serum total ve

direkt bilirubin düzeyleri, diazo reaktifi (Cobas 800, Roche-diagnostik, Almanya) kullanılarak ölçüldü.

3.4. İstatistiksel Analiz

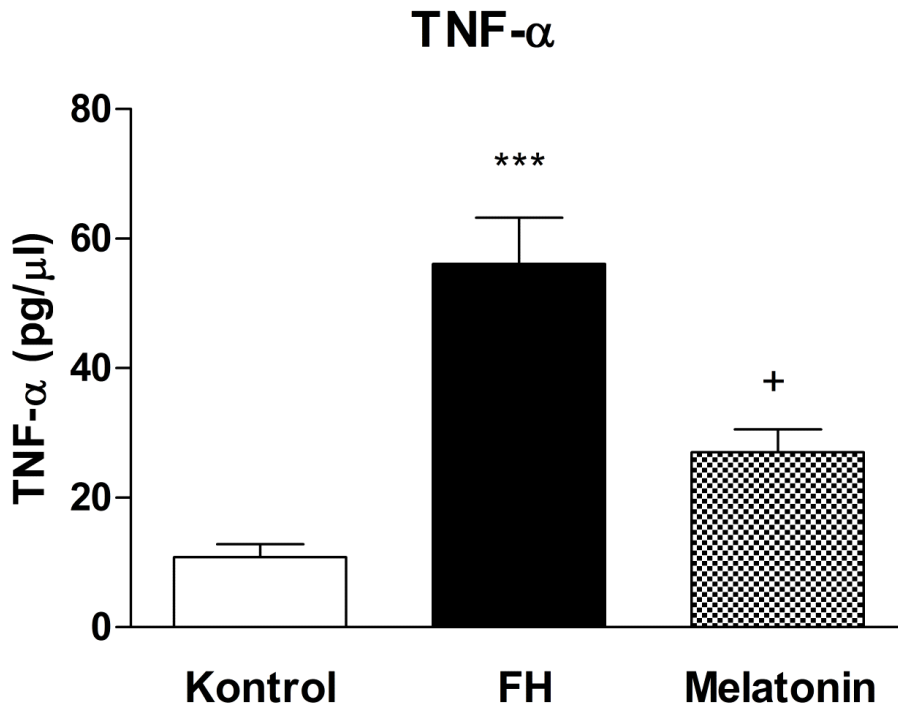
Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Mikroskopik değerlendirme için Mann-Whitney U non-parametrik test, diğer parametrelerin değerlendirilmesinde iki-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. $p<0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Serumda TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve BDNF Düzeyleri

4.1.1. SerumTNF- α Düzeyi

Fenilhidrazin uygulanan grupta, serum TNF- α düzeyleri (56.08 ± 7.13 pg/ μ l), kontrol grubuna kıyasla (10.81 ± 2.0 pg/ μ l) anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.001$). Melatonin tedavi grubunda TNF- α düzeyi, fenilhidrazin grubuna göre anlamlı derecede düşük (27.04 ± 3.5 pg/ μ l) bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 15).

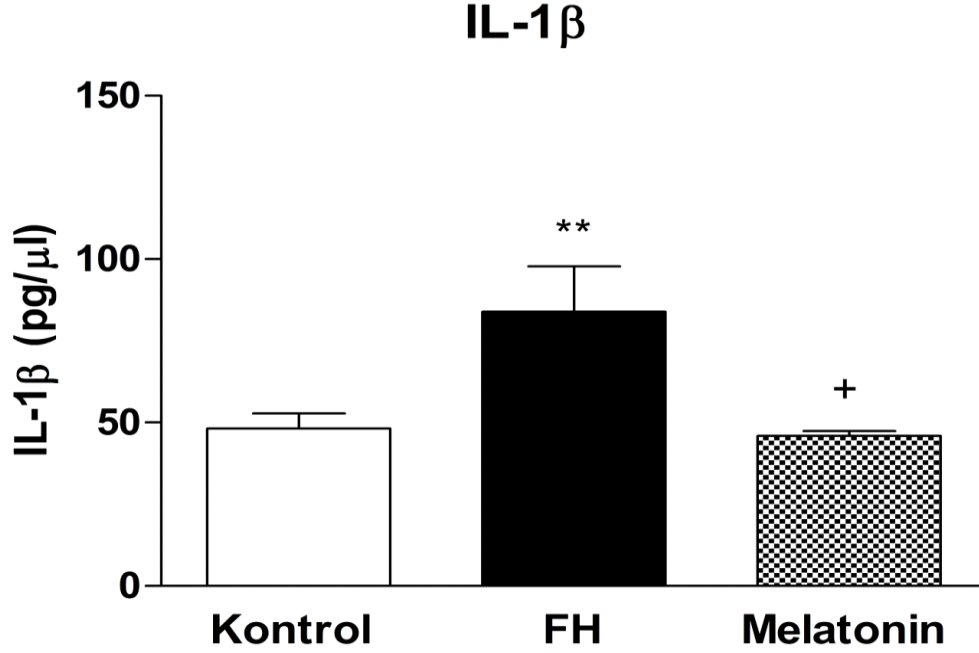


Şekil 15: Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarında serum TNF- α düzeyleri

4.1.2. SerumIL-1 β Düzeyi

Fenilhidrazin uygulanan grupta, serum IL-1 β düzeyleri (83.95 ± 13.81 pg/ μ l), kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (48.16 ± 4.67 pg/ μ l) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek

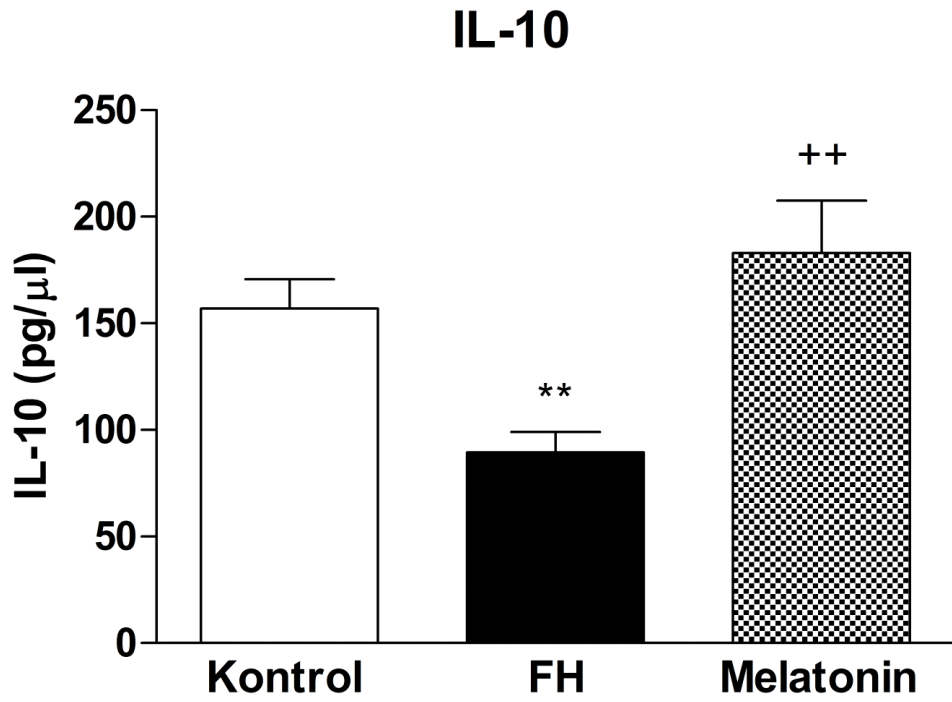
bulundu ($p<0.01$). Melatonin tedavi grubunda IL-1 β düzeyi, fenilhidrazin grubuna göre anlamlı derecede düşük (45.58 ± 1.44 pg/ μ l) bulundu ($p<0.05$) (Şekil 16).



Şekil 16: Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarında serum IL-1 β düzeyleri

4.1.3. Serum IL-10 Düzeyi

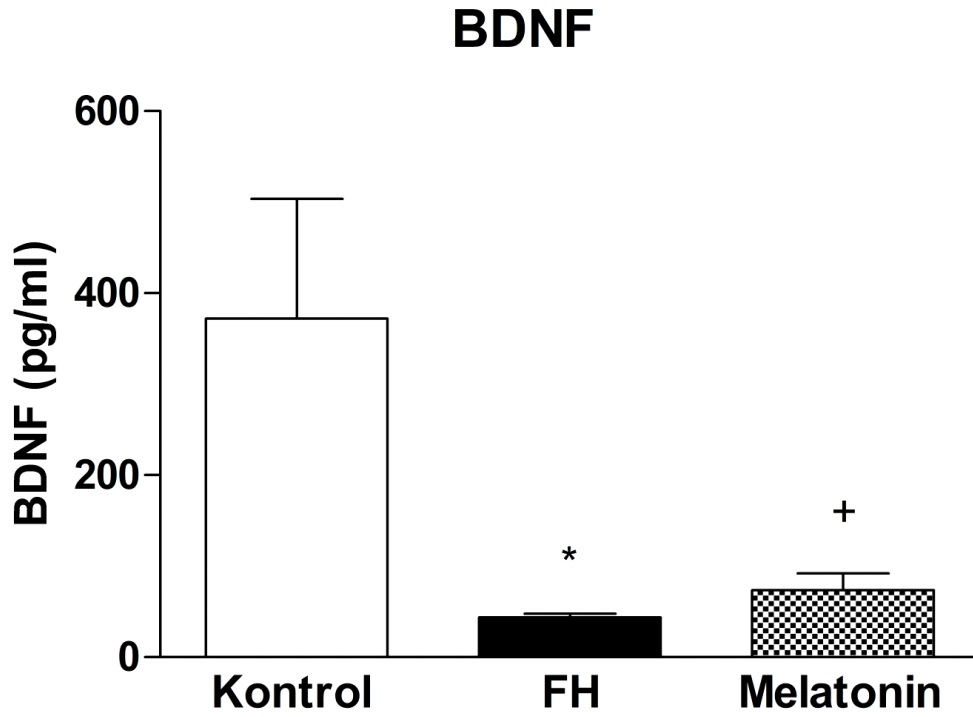
Serumda anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 düzeylerine bakıldığında, kontrol grubunda (156.90 ± 13.7 pg/ μ l) fenilhidrazin grubuna göre (89.40 ± 9.76 pg/ μ l) anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Melatonin verilen grupta ise serum IL-10 düzeyinin (183.0 ± 24.65 pg/ μ l) Fenilhidrazin grubuna göre anlamlı şekilde yükselmiş olması dikkat çekicidir ($p<0.01$) (Şekil 17).



Şekil 17: Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarında serum IL-10 düzeyleri

4.1.4. Serum BDNF Düzeyi

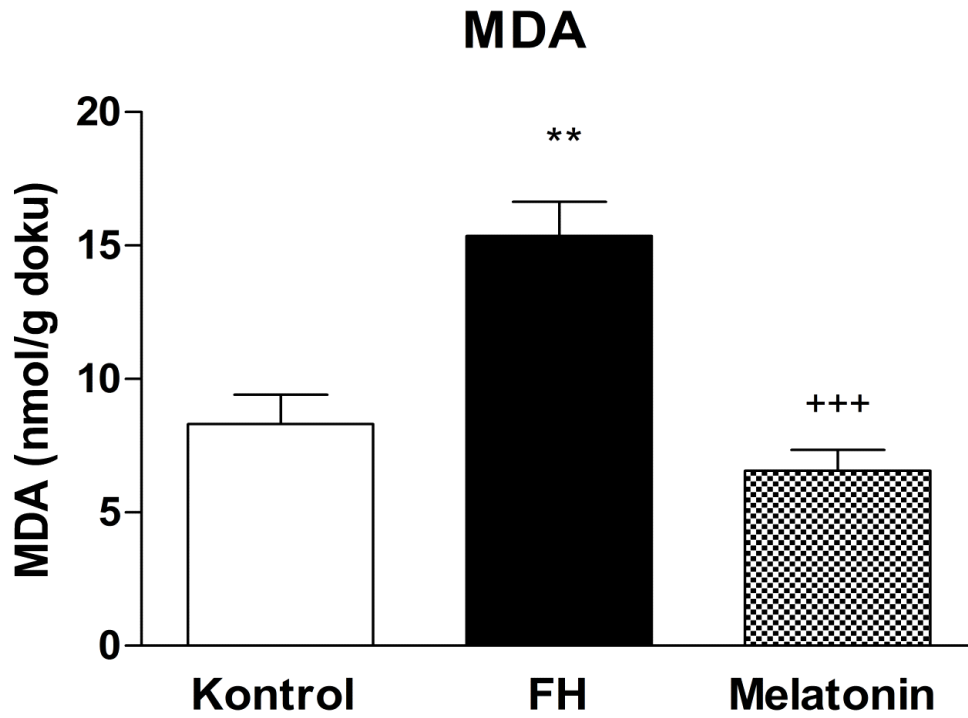
Nörotrofik faktör olup nörogenez ve sinaptik plastisiteden sorumlu olan BDNF fenilhidrazin grubunda (41.35 pg/ml) kontrol grubuna göre (278.9 pg/ml) anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Melatonin tedavi grubunda ise BDNF düzeyi (57.4 pg/ml) fenilhidrazin grubundan anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0.01$) (Şekil 18).



Şekil 18: Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarında serum BDNF düzeyleri

4.2. Beyin Lipid Peroksidasyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

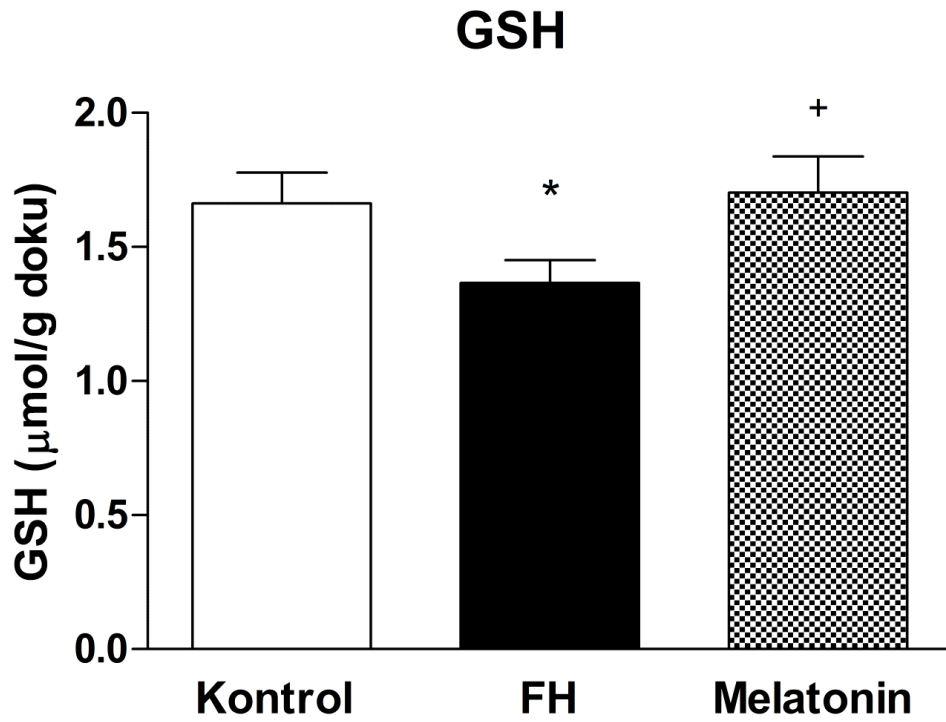
Fenilhidrazin grubunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan beyin MDA düzeyi (15.36 ± 1.27 nmol/g), kontrol grubuna kıyasla (8.30 ± 1.10 nmol/g) anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.01$). Fenilhidrazin grubunda görülen MDA düzeylerindeki artışın, melatonin ile tedavi edilen grupta (6.56 ± 0.77 nmol/g), anlamlı şekilde ($p < 0.0001$) engellendiği saptanmıştır (Şekil 19).



Şekil 19: Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarına ait beyin MDA düzeyleri

4.3. Beyin Glutasyon İçeriğinin Değerlendirilmesi

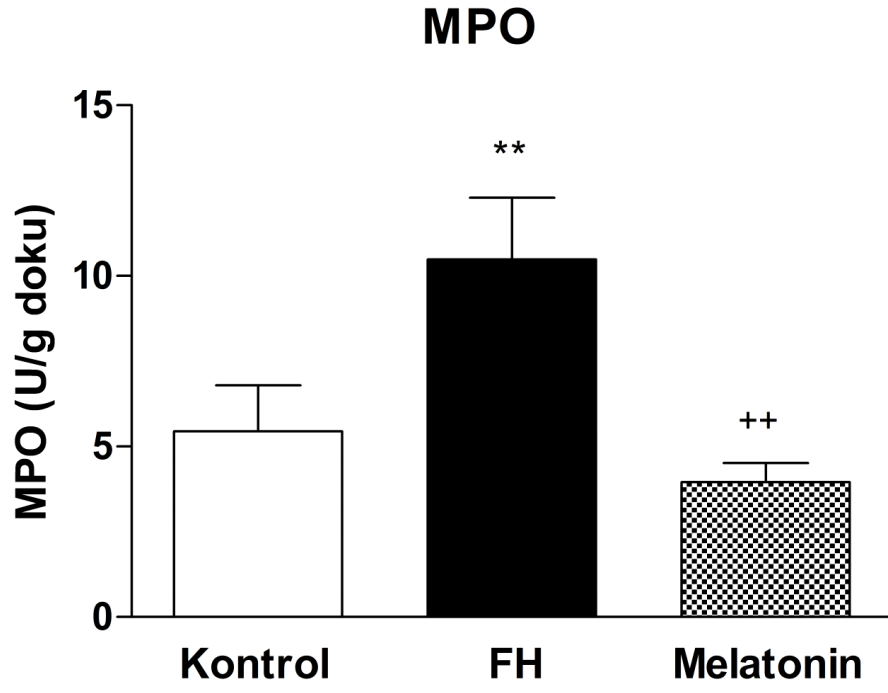
Beyin dokusunda antioksidan GSH miktarları değerlendirildiğinde, fenilhidrazin grubunda GSH düzeyinin ($1.36 \pm 0.08 \mu\text{mol/g}$), kontrol grubuna kıyasla ($1.66 \pm 0.11 \mu\text{mol/g}$) anlamlı şekilde düşmüş olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Melatonin ile tedavi edilen grupta beyin GSH düzeyindeki düşüşün anlamlı şekilde engellendiği gözlemlendi ($1.70 \pm 0.13 \mu\text{mol/g}$) ($p < 0.05$) (Şekil 20).



Şekil 20: Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarına ait beyin glutatyon (GSH) düzeyleri

4.4. Beyin Myeloperoksidaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Fenilhidrazin grubunda ortalama beyin myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi (10.4 ± 1.81 U/g) kontrol grubuna kıyasla (5.44 ± 1.35 U/g) anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0.05$). Bu artan MPO aktivitesi, melatonin tedavisi ile (3.95 ± 0.56 U/g) kontrole yakın değerlere geri döndü ($p < 0.01$) (Şekil 21).



Şekil 21: Kontrol, fenilhidrazin ve tedavi gruplarına ait MPO düzeyleri

5. TARTIŞMA

Yenidoğan döneminde indirekt hiperbilirubinemi halen önemli bir halk sağlığı sorunudur (1). Ciddi hiperbilirubineminin nörolojik hasar oluşturma potansiyeli bulunmaktadır. Son yıllarda görülen kernikterus vakaları, bilirubin nörotoksitesitesi ile ilgili endişeleri ve taburculuk zamanıyla ilgili tartışmaları beraberinde getirmiştir (4). Hiperbilirubineminin neden olduğu bölgesel hasar, bilirubine bağlı nörolojik disfonksiyon sonucu işitsel ve motor fonksiyonlarda bozukluklara yol açabilmektedir. Bilirubinun subtalamik çekirdek ve globus pallidusda yaptığı hasar sonucu hafif koordinasyon ve hareket bozukluğundan diskinetik serebral palsiye kadar varan ciddi motor sekeller görülebilmektedir (94).

Bilirubin nörotoksitesitesinin altta yatan mekanizmaları ve nörogelişimsel sonuçlarla bilirubin seviyeleri arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamakla birlikte bazı mekanizmalar öne sürülmektedir. Bu mekanizmaların tanımlanması bilirubin nörotoksitesitesinin önlem ve tedavisine ışık tutabilir. Konjuge olmayan bilirubin, KBB bütünlüğünü; glutatyon homeostazını bozarak, endotelyal nitrik oksit sentaz (NOS) ekspresyonunu artırıp NO oluşumuna ve sitokin salınımına yol açarak da bozabilir ve uzamış hiperbilirubinemde beyine geçişi kolaylaştırabilir (36). Konjuge olmayan bilirubin, hücre içine Ca girişi, nekroz ve apoptoz ile de hücre ölümüne neden olabilmektedir (42,48). Bu mekanizmaların yanı sıra AKB'in mitokondrilerin şişmesi, Bax translokasyonu, mitokondriyal depolarizasyon, sitokrom c salınımı, kaspaz-3 aktivasyonu ve poli-ADP-riboz-polimeraz yıkımına yol açarak da nöronal apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (57,58). AKB 'in beyinde, oksidatif stres, ROS üretimine yol açarak, okside glutatyonla karşı koruyucu etkisi olan DJ-1 protein miktarını azaltarak ve ekstrasellüler glutamat artışı yaparak nöronlarda dağılım bozukluğuna da yol açtığı ileri sürülmüştür (55,64,65). Yine astrositlerdekine benzer şekilde mikroglialarda da MAPK ve NF-Kb yi aktive eder ve erken dönemde proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açar. Bilirubin nörotoksitesitesi sonucu fetal beyin hücre kültüründe TNF-alfa'nın (TNF- α) 4 ile 24 saat arasında, IL-1 β 'nin 12 saatte maksimum seviyeye ulaştığı gösterilmiştir. TNF- α bu hasarda, nöronal hücre ölümüne yol açan kaskadı başlatarak, glutamat nörotoksitesitesini artırır. Ayrıca IL-1 β , IL-6 gibi sitotoksik sitokinlerin üretimini artırarak nörotoksitede kritik rol oynar (76,77). AKB, sıçanlarda kortikal astrositlerde ve mikroglialarda reaktiviteye yol açarak inflamasyonu şiddetlendirir, endotelyal hücreler ve bağlantılarını etkileyerek KBB'ni bozar (82), pro-inflamatuvar sitokinler, ROS ve NOS salınımını artırarak sinir sonlanmalarında

sinaps kayıpları ve disfonksiyonuna yol açar. Bilirubin nörotoksitesinin altında yatan hücrel ve moleküler mekanizmalar, yıllardır süren araştırmalara rağmen hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzdeki bilgiler ışığında, hücre zarının yapısında bozulma ve fosfolipid simetri kaybı gibi morfolojik değişiklikler (85,88), mitokondri zarı ve sinir hücrelerinde lipid akıcılığının, protein sıralamasının ve redoks dengesinin bozulması ile mitokondriyal şişme ve geçirgenlik artışı (86,87), hücre enerji metabolizmasında bozulma (88,89), Na-K ATP az gibi hücre zarı taşıma sistemlerinin bozulması (88,90), glutamat salınım ve geri alımının bozulmasına bağlı eksitotoksiste ve artmış oksidatif stres (88) nedeniyle hücrenin nekroz veya apoptoz ile ölüme gitmesi (10,88,91) olarak özetlenebilir. Bilirubine bağlı nörotoksitenin önlenmesi ve tedavisinde bu mekanizmalar hedeflenerek bir yol çizilmelidir.

Hiperbilirubineminin erken tanı ve tedavisi ile kernikterus vakaları azalmış olsa da halen küçümsenmeyecek düzeydedir (4). Ayrıca total bilirubin seviyeleri tolere edilebilir sınırlarda bulunan infantlarda bile nörolojik hasar saptanabilmesi, olayın sadece bilirubin düzeyinden farklı bir boyutu olduğunu düşündürmektedir. Göreceli olarak düşük bilirubin seviyelerinde dahi nörotoksiteyi artıran birçok faktör devreye girmektedir. Hemoliz ve hemoliz sonrası ortaya çıkan ürünler bu hasarda bilirubin ile birlikte başrolde yer alır. AKB'i bağlayacak albumin seviyesinin düşük olması, asidoz, sepsis, hipotermi, intraventriküler hemoraji, hematolojik ve genetik anormallikler, albumin bağlayıcı ilaç kullanımı, hipoksi, bilirubinün nörotoksiste potansiyelini önemli ölçüde artırır. Hipoksinin hiperbilirubinemi toksitesinin üzerine eklendiğinde glial hücre nekrozu ve apoptozu artırdığı gösterilmiştir (5). Asidoz bilirubin molekülünü polar hale getirip asit-baz dengesini bozarak ve serebral kan akımını artırarak düşük bilirubin seviyelerinde dahi toksik etkiyi artırmaktadır (4). Orta derecede bilirubin yüksekliğinin motor ve bilişsel fonksiyonları baskılayıcı etkisi gösterilmiştir. Yine orta derecede bilirubin seviyeleri ile nörolojik ve davranışsal problemler ilişkilendirilmiştir (116). Yenidoğan sarılığı ağır veya uzun süreli olduğunda öğrenme ve hafızayı etkileyebilir, hatta orta düzey AKB düzeyleri bile gelişim geriliği, dikkat eksikliği, otizm ve izole sinirsel işitme kaybı ile sonlanabilir (10,29). Bilirubin nörotoksitesinde pekçok faktör kolaylaştırıcı ve hazırlayıcı rol oynadığından sadece bilirubin düzeylerine bakarak hiperbilirubinemi nörotoksitesini kesin olarak öngörebilmek zordur.

Bilirubinün nörotoksik etkileri, ekzojen bilirubin verilip beyinde serbest bilirubin konsantrasyonu artırılarak, bilirubinün albuminden ayrılmasına neden olan çeşitli ilaçlar verilerek (234), glukuronil transferaz enzim aktivitesi azaltılarak (235) veya hemoliz yoluyla

deneysel hiperbilirünemi modeli oluşturularak (233) farklı yöntemlerle araştırılmıştır. Hemolizin bilirübinin nörotoksik etkisini potansiyelize etmesi tartışılmaz olmakla birlikte ensefalopatinin patogeneğinde rol oynayan tüm hemoliz metabolitleri henüz aydınlatılamamıştır. Hemolitik hastalıkta hem oksijenazın katabolik aktivasyonuna bağlı olarak KBB geçirgenliği etkilenmekte ve bilirübin, serbest demir (Fe^{2+}), karbon monoksit (CO) ve lipid peroksidasyon ürünleri açığa çıkmaktadır. Hemoliz sonucu bilirübinle birlikte oluşan bir diğer molekül olan Fe^{2+} , hemolize bağlı nörotoksisitede kritik rol oynar (236). Serbest demirin indüklediği oksidatif strese bağlı olarak nörodejeneratif hastalıklar görülebilmektedir. Ferro (Fe^{2+}) ve ferrik (Fe^{3+}) demir Fenton ve Haber-Weis reaksiyonları ile H_2O_2 'in katabolizması sonucu hidroksil radikallerini oluşturur ve hücre hasarına neden olur (236). Fe^{2+} yükü aşırı arttığında voltaj bağımlı Ca kanalları aktive olarak Ca ile birlikte Fe^{2+} 'inde ekstrasellüler alandan intrasellüler alana girmesi için alternatif bir yol oluşturarak nörotoksisiteye katkıda bulunur (239). Aşırı demir yükünün beyin ödemi ve hücre ölümüne sekonder beyin hasarı yaptığına dair çeşitli hayvan çalışmaları bulunmaktadır (237,238). Vücutta demir yükü arttığında nöro-davranışsal bozukluklar, aktivitede azalma, reflekslerde değişiklikler gözlenir (240). Yenidoğan farelere fazla demir takviyesi yapıldığında serebral korteksten ziyade bazal gangliada birikip öğrenme kapasitesi ve motor aktivitede azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (241). Rh uygunsuzluğuna bağlı hemolitik hastalığı bulunan infantlarda ferritin yüksek, transferrin düşük, lipid peroksidasyon ürünleri artmış olarak saptanmıştır. Bu tablo Rh uygunsuzluğundaki nörolojik hasarda hemolizin ve dolayısı ile demir toksisitesinin de rolü olabileceğini düşündürmektedir (236). Hemoliz sırasında bilirübine eşlik eden diğer maddelerin de nörotoksisitede rolü olabileceği bilindiğinden çalışmamızda hemoliz-hiperbilirünemi modeli ile oluşturulacak bir nörotoksisitenin kliniğe daha gerçekçi bir ışık tutacağı düşünülmüştür.

Sıçanlarda, kan beyin bariyeri deneysel modellerinde bilirübine geçirgenliğin 10. günde maksimum olduğu ve 21. güne dek yüksek olduğu gösterilmiştir (242). Bu çalışmada kullanılan Sprague-Dawley sıçanlar 9-12 günlük olduklarından kan beyin bariyeri geçirgenliğinin yüksek olduğu bir dönemde deneye alınmışlardır. Çalışmamızda kullanılan model, Mejia ve arkadaşları tarafından 2007 yılında geliştirilmiştir (233). Bu modelde, 7 günlük erkek Wistar sıçanlara intraperitoneal yoldan 75 mg/kg fenilhidrazin, 24 saat ara ile verilerek oluşturulan hemolizde, hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde belirgin düşüş ile birlikte indirekt ve direkt bilirübinde artış saptanmıştır. Sıçanlarda hiperbilirünemi olarak kabul edilen serum bilirübin düzeyi, önceki çalışmalar esas alınarak 3mg/dl olarak kabul

edilmiştir (243). Oluşturulan bu modelde beyin dokusunda bilirubin ve demir depolanması gösterilmiş ve histolojik incelemede hemoliz grubunda nöronlarda asidofili, nukleus ve sitoplazmada koyulaşma, perikaryon kontraksiyonu sitoplazmik membran kaybı ve doku disorganizasyonu ile prezente olan nöron hasarı saptanmıştır. Bizim modelimizde fenilhidrazin uygulanan grupta, ortalama hemoglobin ve hematokrit düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuş ve total ve direkt bilirubin değerleri ise kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır. Fenilhidrazin grubundaki total bilirubin düzeyleri sıçanlarda hiperbilirubinemi kabul edilen 3mg/dl üstünde saptanmıştır. Direkt bilirubin artışı ise artmış AKB 'in sıçanın ekstrahepatik dokularında konjuge bilirubine dönüştürülmesi şeklinde yorumlanmıştır.

Preterm nöroproteksiyon konusunda yapılan prelinik ve klinik çalışmalar sonucunda melatoninin klinik kullanıma en yakın ajan olduğu görülmüştür (213). Melatonin; perinatal beyin hasarına yol açan oksidatif, eksitotoksik, inflamatuvar tüm yolakları engellemesi, lipofilik özelliği ile plasenta ve KBB'i gibi biyolojik bariyerleri aşabilmesi, bilinen yan etkisinin olmaması ile güvenilirliği nedeniyle diğer anti-oksidan ajanlardan ayrılmıştır (126). Hayvan ve insan çalışmaları sonucunda melatoninin kısa dönem kullanımının güvenilir olduğu noktasında fikir birliğine varılmıştır (144). Çocuk ve erişkinlerde yapılan klinik çalışmalarda uzun dönem kullanımda da herhangi bir komplikasyon bildirilmemiştir. Melatonin replasmanı, endojen melatonin sekresyonunda azalma yapmadığı gibi, uygun sirkadiyen ritmin sağlanmasına da destek olur (144). Melatoninin nöroproteksiyondaki etki mekanizmaları, bilirubin nörotoksitesinde öne sürülen mekanizmalar ile örtüştüğünden ve sistemik olarak verildiğinde KBB ve tüm vücut sıvılarına geçtiğinden çalışmamızda hemoliz-hiperbilirubineminin oluşturacağı nörotoksiteyi önlemede melatonin kullanılması düşünülmüştür. Diğer prelinik çalışmalarda melatonin verilme yolu olarak intravenöz veya intraperitoneal yol tercih edilmiştir. Bazı klinik çalışmalarda ise enteral yol kullanılmıştır. Biz çalışmamızda melatonin IP yoldan uyguladık. Melatonin terapötik aralığı oldukça geniş bir ajandır. Gebe sıçanlara 15 gün süreyle 200 mg/kg/gün verilmesinin perinatal mortalite ya da malformasyonları artırmadığı gösterilmiştir (248). Erişkin hayvan çalışmalarında iskemik inme modelinde melatoninin 5 mg/kg ' dan yüksek dozda iskemi öncesi veya sırasında verilmesi durumunda maksimum nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir (249). İn vivo deneysel çalışmaların bir çoğunda melatoninin nöroprotektif etki gösterdiği doz aralığı 1.25-20 mg/kg olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda melatoninin nöroprotektif etkisinden optimum düzeyde yararlanmak amacıyla melatonin dozu 10 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Kullandığımız ardışık tedavi şemasını seçme nedenimiz ise melatoninin yarı ömrü 10-40 dakika gibi oldukça kısa olması ve hemoliz-hiperbilirubinemi nörotoksisitesinin etki penceresinin belli olmamasıdır. Sonuçlarımız seçilen melatonin dozunun, uygulama yolunun, ardışık tedavi şemasının FH ile oluşturulan nörotoksisitede etkili olduğunu göstermiştir.

Son yıllarda yenidoğan döneminde genel mortalitenin düşmesine paralel olarak nörolojik prognozun iyileştirilmesi, tedavi ve koruyucu yöntemlerde en büyük hedefi oluşturmaktadır. Yenidoğan dönemindeki pek çok olumsuz etken, infantların yaşam boyu hayat kalitesini düşürecek ciddi sekeller bıraktığı için neonatoloji pratiğinde çalışanlar ve bilimsel çalışmalar nöroproteksiyon üzerinde yoğunlaşmıştır (244). Günümüzde nöronal hasarı önlemeyi hedefleyen deneysel ve klinik çalışmalar oldukça geniş spektrumda ajanı çalışmaktadır. Bu ajanlar arasında melatonin giderek artan bir ilgiyle araştırılmakta olup nöroprotektif etkisini kanıtlayan çok sayıda hayvan deneyi ve klinik çalışma bulunmaktadır (244). Melatoninin nöroprotektif etki mekanizmalarından bir tanesi mitokondriyal apoptoz yolağına karşıt etki etmesi ile gerçekleşmektedir. Melatonin, Bcl-2 bağımlı yolağı aktive ederek mitokondriyal fonksiyonları stabilize eder. Aynı zamanda 5-, 12- lipooksijenaz ve NOS aktivitesini azaltarak, serbest radikal kovucu etki göstererek ve SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz enzim aktivitesini artırarak antioksidan etki gösterir (174). Antioksidan enzim sistemini aktive ederken, prooksidan enzim sistemini inhibe eder. Hidroksil radikallerini kovucu etkisi ile lipid peroksidasyonunu engelleyerek DNA ve sitozolik proteinleri oksidatif hasardan korur. Glutatyon peroksidazın m-RNA'sını artırarak glutatyon miktarında da artış sağlar (175). Çalışmalarda travmatik beyin hasarında düşen glutatyon seviyelerinin melatonin ile artırıldığı gösterilmiştir (245). Melatonin, NF- κ B'nin nukleusa translokasyonunu ve proinflamatuar sitokinlerin salınmasını azaltarak antiinflamatuar mekanizma üzerinden de nöroproteksiyon yapar (189). Aynı zamanda, erken beyin hasarı döneminde artan pro-inflamatuar sitokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) düzeylerini de baskılar (193). Melatonin KBB'i rahatlıkla geçebilir, hücrelerin çekirdekleri dahil tüm organellerine ulaşabilir. Bu durum nöroproteksiyonda kullanılabilirliğini artırmaktadır.

Melatonin ile yapılan prelinik çalışmalarda değişik beyin hasarı modellerinde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir. Fetal koyunlardaki intrauterin asfiksi modelinde, melatoninin inflammatuar cevabı azaltarak beyin hücrelerinin ölümünü engellediği gösterilmiştir (190). Bu çalışmada mid-gestasyonel dönemde (90. gün) umbilikal kord oklüzyonu ile koyunda asfiksi modeli

oluşturulup, fetüse reperfüzyondan 10 dk sonra melatonin 20 mg/kg dozunda 6 saatlik infüzyon şeklinde verilmiş melatoninin nöroprotektif etkisi histopatolojik olarak gösterilmiştir. Villapol ve arkadaşları, neonatal sıçanda hipoksik iskemik inme modeli oluşturup, melatoninin beyaz cevherde inflamasyonu azaltarak miyelinizasyonu indüklediğini göstermişlerdir (191). Bu çalışmada melatonin 20 mg/kg/gün IP 2 dozda verilmiş ve postmitotik oligodendrosit miktarını artırarak tedavi edici etki göstermiştir. Husson ve arkadaşları ise yenidoğan farelerde periventriküler lökomalaziye taklit edecek şekilde, ibotenat ile eksitotoksik beyaz cevher hasarı oluşturulduğunda, melatoninin adenil siklaz reseptörleri aracılığıyla nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir (223). Bu çalışmada da melatonin 0.0005-5 mg/kg 'a kadar artan doz aralığında IP olarak uygulandığında doz bağımlı olarak periventriküler beyaz cevher hasarını azaltmıştır. Hipotermi tedavisi alan yenidoğan domuzlara melatonin verildiğinde melatonin destekli hipotermimin, cerebral ATP seviyelerinin yükselmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (225). Bu çalışmada melatonin resüstasyondan 10 dk önce başlanıp 5 mg/kg/h dozda 6 saatlik infüzyon şeklinde verilip 24. saatte tekrarlandığında serebral enerji metabolizması düzelmiş ve beyin hasarı sadece hipotermi tedavisi alan gruba göre anlamlı olarak azalmıştır. Sıçanlarda tek taraflı uterin arter ligasyonu ile fetal hipoksi ve gelişim geriliği oluşturulan modelde ise, melatonin IP olarak 0.002-20 mg/kg/g 'e kadar artan dozlarda postnatal ilk 3 gün kullanılmış ve nöroprotektif etkisinin 0.2 mg/kg/g ile başladığı daha düşük düzeylerin anlamlı şekilde nöroproteksiyon sağlamadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada melatonin kortikal enfarkt hacmini azaltmamakla birlikte inflamasyonu azaltmış ve miyelinizasyonu indüklemiştir (245).

Melatonin nörotoksik etkisi son yıllarda klinik çalışmalarda özellikle de perinatal asfiksida araştırılmıştır. Perinatal asfiksida melatoninin nöroprotektif etkisini araştıran bir klinik çalışmaya 30 hipoksik iskemik ensefalopatili (HİE) infant dahil edilmiştir. Bebeklerin 15 tanesine tüm vücut soğutma, 15 tanesine tüm vücut soğutma ile birlikte 5 gün süreyle melatonin 10 mg/kg enteral olarak verilmiş ve 15 sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Her iki HİE grubunda kontrole göre yüksek melatonin, SOD ve NO değerleri saptanmıştır. Melatonin+hipotermi grubunda melatonin düzeyi daha yüksek, NO' de düşüş daha belirgin ancak SOD'daki düşüş daha az olarak gözlenmiştir. Yine melatonin+hipotermi grubunda EEG'de nöbet aktivitesi ve MR'da beyaz cevher tutulumu azalmış olarak saptanmıştır. Bu grubun 6 aylık muayenesinde nörolojik anormallik ve Denver gelişimsel tarama testinde gerilik tespit edilmemiştir (246). Folia ve arkadaşları 20 asfiktik yenidoğandan 10 tanesine 10 mg/doz olacak şekilde 8 doz toplam 80 mg enteral melatonin vermişler ve tedavi

öncesi/sonrası lipid peroksidasyonunu, serum malondialdehit, nitrit/nitrat düzeylerini ölçmüşlerdir. Melatonin verilen yenidoğanlarda tedaviden 12 ve 24 saat sonra lipid peroksidasyon ürünlerinde belirgin azalma saptanmıştır. Nitrit ve nitrat seviyeleri de asfiktik olup melatonin verilmeyen grupta yüksek seyrederken melatonin tedavisi verilenlerde belirgin düşüş göstermiştir. Melatonin tedavisi verilmeyen 10 asfiktik yenidoğandan 3 tanesi ilk 72 saat içinde kaybedilmiş, tedavi grubundaki asfiktik yenidoğan vakalarından hiçbirisi mortal seyretnemiştir. Melatoninin bu koruyucu etkisi antioksidan özelliğini gösterdiği gibi mitokondriyal elektron transportunu artırdığını da destekler niteliktedir (224). Prematüriteliğe bağlı beyin hasarında melatonin replasmanının prognoza etkisinin, prematüre ve termelerde melatonin optimal tedavi dozunun, preterm doğum yapacak annelere doğumdan hemen önce verilecek intravenöz melatoninin fetüste nöroprotektif etkisinin araştırıldığı çalışmalar ise halen devam etmektedir (247). Yenidoğan yoğun bakım ünitesindeki pretermelere melatonin replasmanı yapıp terme ulaştıklarında beyaz cevher hasarının MR ile tespit edileceği bir diğer çalışma da devam etmektedir (247).

Konjuge olmayan bilirübinin hem astrositlerde hem de mikrogliyalarda erken dönemde proinflamatuvar sitokinlerin salınımına ve nötrofil infiltrasyonuna yol açtığı bilinmektedir (69). Proinflamatuvarlar sitokinler ise mikrogliaların aktifleşmesine, KBB' de bozulmaya ve nöroinflamasyona yol açmaktadır (69). IL-1 β proinflamatuvar etkisi bilinen bir sitokindir. Kaspaz 1,4,5 aktivasyonu ve bu mekanizmalardan bağımsız direkt hücre ölümü ve otofajiyi artırarak nörotoksik etki yapar (250). Bir çalışmada, yaşlı insanların beyinde, enfeksiyon, hasarlanma gibi dejeneratif olaylara bağlı IL-1 β salınımının fazla olduğu ve kognitif fonksiyonları etkileyerek nörotoksositeye yol açtığı saptanmıştır (251). Erişkin sıçanlarda yapılan bir çalışmada lipopolisakkarit enjeksiyonu ile IL-1 β artışı ve inflamasyon ile hipokampüste hasara bağlı öğrenme güçlüğü görülmüştür. İntraserebral IL-1 β antagonisti enjeksiyonu sonrasında ise nöropatolojik çalışmalar ve nörodavranışsal testlerde iyileşme, hipokampal hasar ve inflamatuvar cevapta azalma saptanmıştır. Bu çalışma IL-1 β 'nın beyin dokusunda yaptığı hasarı ve bunun nörolojik disfonksiyona yol açtığını ortaya koymaktadır (252). Sıçanlarda hipoksik iskemik beyin hasarında progesteronun nöron koruyucu etkisinin gösterildiği çalışmada beyin dokusunda IL-1 β düzeyindeki azalma gösterilmiştir (253). Sıçanlarda travmatik beyin hasarı modelinde IL-1 β 'nın hem beyin dokusu hem de venöz kan değerlerinin yükseldiği gösterilmiş ve IL-1 β antagonisti ile inflamatuvar beyin hasarının azaldığı tespit edilmiştir (254). Bizim çalışmamızda da yenidoğan sıçanlardaki hemoliz-hiperbilirubinemi modelinde, venöz IL-1 β düzeyi ölçülmüş ve fenilhidrazin grubunda

istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Bu bulgu, bu modelde proinflatuar sitokin salınımı oluştuğunu düşündürmüş ve melatonin tedavisi ile nöro-inflamasyonu tetikleyen bu proinflatuar sitokin seviyesi kontrol grubu değerlerine gerilemiştir.

Bilirubin nörotoksitesi ile ilgili çalışmalarda TNF- α , 4-24 saat arasında maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Sıçan hücre kültüründe klinik olarak tolere edilebilir düzeyde AKB'e 4 saat kadar maruz kalmak, astrositler de aktivasyona ve TNF- α , IL-1 β salınımına yol açmıştır (72). Bunlardan TNF- α , oksidatif stres ile reaktif oksijen ve nitrojen moleküllerinin oluşumu ile ilgili bir sitokin olarak bilinmektedir. Hiperbilirubinemi yenidoğanların nöronal hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, TNF- α +IL-1 β ko-inkübasyonu ile NO/NOS, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9 ve Jun-NH₂-terminal kinase 1 and 2 (JNK1/2) aktivasyonu gösterilmiştir (71). İskemik inmeli hastalarda yapılan klinik çalışmada venöz kanda bakılan TNF- α düzeylerinin beyin hasarının yoğunluğu ile orantılı olarak arttığı gösterilmiştir (77). Sıçanlarda lipopolisakkaritin indüklediği bakteriyel endotoksin kaynaklı nörolojik hasarda, serum TNF- α seviyesi hasarla orantılı olarak yüksek saptanmış ve agmatine tedavisi sonrası serum TNF- α seviyesi düşmüş, nörolojik prognozda iyileşme görülmüştür (184). Yenidoğan sıçanlarda travmatik beyin hasarı sonrası farmakolojik hipotermi modeli oluşturulmuş ve tedavi grubunda beyin dokusunda TNF- α düzeyindeki azalma gösterilmiştir (255). Çalışmamızda da fenilhidrazin grubunda serum TNF- α düzeyi, kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek saptanırken melatonin, tedavi grubundaki TNF- α düzeylerini anlamlı şekilde düşürmüştür. Bu bulgu melatoninin anti inflamatuvar özelliği ile açıklanabilir diye düşünmekteyiz.

IL-10; makrofaj, T helper 1, T helper 2 lenfositler, dendritik hücre, sitotoksik T hücre, B lenfosit, monosit ve mast hücreleri gibi birçok hücreden salgılanan 1. kromozomda kodlanan immünregülatuar bir sitokindir ve IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- α ekspresyonunu azaltır. B lenfositlerde apoptozisi engeller, hücre proliferasyonunu artırır, immunglobulin subtiplerinin dönüşümünü artırır (256). Deneysel travmatik beyin hasarı oluşturulan yetişkin sıçanlara eksojen olarak İL-10 verilmesi ile infarkt sahasının küçüldüğü ve nöronların inflamatuvar sitokin etkilerinden korunduğu gösterilmiş, nöron koruyucu etkisi ortaya konmuştur (257). Farelerde travmatik beyin hasarı modelinde artan TNF- α ve IL-1 β düzeyleri shengyu decoction tedavisi ile düşerken, serumda antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyesinde ise

yükselme saptanmış ilacın nöroprotektif etkisi serumda proinflamatuvar sitokinleri azaltıp antiinflamatuvar sitokinleri artırması ile ortaya konmuştur (258). Bizim çalışmamızda fenilhidrazin grubunda kontrol grubuna göre azalmış saptanan IL-10 seviyesi, literatürdeki araştırmalara paralel şekilde melatonin tedavisi ile kontrol grubunun da üzerine çıkmıştır. Bu bulgu melatoninin IL-10 düzeyindeki artışla inflamasyonu engellediği ve bu etkinin IL-1 ile TNF- α 'daki azalmalarla birlikte olduğunu desteklemektedir.

BDNF, nöronlar için yaşamsal önem taşıyan dendritik dallanma ve sinaptik plastisiteden sorumlu nöron koruyucu işlevi olan dimerik bir proteindir (260). BDNF fetal beyin formasyonunun oluşmasında önemli bir büyüme faktörü olarak da bilinmektedir. BDNF geninden sentezlenen ve nörotrofin ailesinden bir büyüme faktörü olan bu beyin türevli nörotrofik faktör, beyinde ve periferde (kan dolaşımında) bulunmaktadır (260). BDNF, nöron gelişiminde, canlılığında ve işlevlerinin sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca BDNF'nin dopaminerjik, serotonerjik, GABAerjik ve kolinerjik nöronların gelişim ve hayatta kalma süreçleri için gerekli olduğu bildirilmiştir (261). BDNF sinyalizasyonu saniyeler içinde gerçekleşir ve nöronlar arası sinaptik gücü arttıran uzun dönem potansiyelizasyondan sorumludur. Preklinik çalışmalarda, özellikle orta beyindeki dopaminerjik nöronların canlılığını sürdürebilmesi ve diferansiyasyonu için BDNF 'nin çok önemli olduğu ortaya konmuştur. Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda, BDNF düzeyinde düşme olduğu gösterilmiştir. BDNF hem kaspaz inhibisyonu ile apoptozisi engelleyerek hem de otofajik modülasyon ile nöron kurtarıcı etki göstermektedir (259). Ayrıca Bcl2 ve Bclx, ERK1/2 üzerinden aktive olabildiğinden BDNF 'nin nöronlarda anti-apoptotik sürece aracılık ettiği moleküler olarak da kanıtlanmıştır. BDNF, KBB 'den çift taraflı geçebilen bir ajan olduğundan kan düzeylerinin önemli bir kısmının nöron ve glial hücrelerden kaynaklandığı dolayısıyla SSS 'deki düzeyleri yansıttığı düşünülmektedir. Farelerde yapılan çalışmada BDNF'nin kan ve beyindeki düzeyleri arasındaki korelasyon gösterilmiştir (260). Erişkin depresif hastalarda yapılan bir klinik çalışmada, aşırı stres sonucu hipotalamo-hipofizer-adrenal aksa artan glukokortikoid seviyelerinin, venöz kanda BDNF düzeyini düşürüp, hipokampüste fanksiyonel nöronlarda apoptoz ve atrofiye neden olduğu gösterilmiştir (260). Chui ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada da stres faktörünün BDNF düzeyini anlamlı olarak baskıladığı gösterilmiştir (262). Bizim çalışmamızda da, fenilhidrazin grubunda hemoliz-hiperbilirubinemiye sekonder nöronal stres artışına bağlı olarak BDNF düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Tedavi grubunda ise, BDNF, melatoninin nöron koruyucu etkisine aracılık etmiş ve

fenilhidrazin grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, melatoninin BDNF salınımını artırarak da nöroproteksiyonda etkin olabileceği olasılığını düşündürmektedir.

MDA lipid peroksidasyonunun bir belirteci olup, oksidatif stres göstergesi olarak kullanılan yüksek reaktif ve genotoksik bir ajandır. Çalışmalarda sarılıklı infantlarda serum MDA düzeyi sağlıklı olanlara göre yüksek saptanmıştır (263). Ancak fototerapi sonrası MDA düzeyinin değerlendirildiği klinik çalışmalarda çelişkili sonuçlar bulunmuştur (264). Hiperbilirubinemisi olmayan kontrol grubu ile hiperbilirubinemili yenidoğanların fototerapi öncesi ve sonrası değerlendirildiği bir çalışmada MDA düzeyi sarılıklı yenidoğanlarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek saptanırken, fototerapi sonrası bu düzeyde anlamlı düşme gözlenmiştir (264). Sıçanlarda bisphenol-A'nın indüklediği apoptoza bağlı beyin hasarında, melatonin verilen grupta MDA düzeyinde düşme ve glutasyon düzeyinde yükselme saptanmıştır (265). Çalışmamızda da lipid peroksidasyonu, beyin dokusu MDA düzeyleri ile değerlendirilmiş ve FH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkan beyin dokusu MDA düzeyleri, melatonin tedavisi ile kontrol grubunun da altındaki seviyelere gerilemiştir.

Sıçanlarda manganezin indüklediği oksidatif hasara bağlı nöronal hasarda melatonin tedavisi sonrası MDA düzeyinde düşme ve glutasyon düzeylerinde yükselme gösterilmiştir (266). Davutoğlu ve arkadaşları hiperbilirubinemili yenidoğanlarda hiperbilirubinemi derecesiyle korelasyonlarına göre sırasıyla katalaz, SOD, glutasyon peroksidaz, G6PD antioksidan enzim aktivitesinde azalma, oksidatif hasara bağlı olarak da MDA ve NO seviyelerinde yükselme saptamışlardır (267). Neonatal sıçanlarda hiperoksik akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kontrol, hiperoksi ve hiperoksi+melatonin tedavi grubu oluşturulmuş ve tedavi grubunda SOD, GSH-Px değerleri belirgin olarak yükselirken, MDA'da anlamlı düşüş saptanmıştır. Bu bulgulara paralel olarak tedavi grubunda histopatolojik skorlar daha düşük bulunmuştur (268). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde GSH düzeyinin hemoliz-hiperbilirubinemi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü gözlenirken melatonin tedavisi verilen grupta kontrolle eş değerlere kadar yükselmiştir.

Nötrofillerin hipoksik iskemik beyin hasarındaki rolü bilinmektedir (270). MPO, lökositlerde primer olarak da nötrofillerde bulunup buradan salınır. MPO, hidroksil, tyrosil, aldehit gibi yüksek reaktif radikaller aracılığıyla lokal hasar yaptığı gibi sistemik inflamatuvar kaskatı da aktive eder (271). Sıçanlarda orta serebral arter ligasyonu ile oluşturulan fokal iskemide nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olarak beyin dokusunda artmış MPO aktivitesi

saptanmıştır (269). Sıçanlarda deneysel otoimmün ensefalomyelit modelinde nöron dejenerasyonuna bağlı artmış MPO aktivitesi gösterilmiştir (270). Sıçanlarda N-methyl-d-aspartate ile oluşturulan eksitotoksik akut beyin hasarında 12. saatten 14. güne kadar farklı zamanlarda sakrifiye edilip MPO aktivitesi değerlendirilmiş ve 12. saatten 7. güne kadar MPO+ hücreler görülmüştür. MPO+ hücrelerin en yoğun olduğu zaman aralığı 12-24 saat arası ve en yoğun olduğu hücre tipi ise nötrofiller olarak belirtilmiş ancak daha seyrek olmakla birlikte nöron, makrofaj ve mikrogliyalarda da MPO+' lığına rastlanmıştır (271). Çalışmamızda dokuda nötrofil infiltrasyonunu gösteren doku MPO aktivitesinin fenilhidrazin grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptanması, bu modelde nöro-inflamasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Melatonin tedavisi ile beyin dokusu MPO düzeylerinin kontrole yakın değerlere geri dönmesi melatoninin, nörotoksisitenin bu noktasında da etkin olabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarının yorumlanmasında çalışmamızın histolojik skorlarının henüz tamamlanmamış olması kısıtlayıcı bir faktördür. Ancak modelde oluşturulan hemoliz ve hiperbilirubineminin sonucunda inflamatuvar sitokinler, BDNF, beyin dokusunda MDA ve MPO, GSH düzeylerinin nörotoksisiteyi destekleyen değişimler göstermesi ve melatonin tedavisi ile bu düzeylerin anlamlı olarak kontrol grubuna yaklaşması, melatoninin hemoliz-hiperbilirubinemiye bağlı nörotoksisitede nöroprotektif olabileceğini desteklemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada ilk kez hemoliz-hiperbilirubinemi modelinde oluşturulan nörotoksisitede, ardışık melatonin tedavisinin inflamasyon ve oksidan hasarı geri çevirmede etkin olduğu gösterilmiştir. Daha önce çeşitli klinik durumlarda nöroprotektif etkisi gösterilen melatoninin, bilirubin nörotoksisitesini önlemede de umut vaad edebileceği görülmektedir. Melatoninin nöroprotektif etkisinin araştırılacağı klinik etkinlik, doz ve tedavi şemasına yönelik çalışmalar, halen bazı toplumlarda önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam eden hiperbilirubinemi sekellerini önlemede yeni ufuklar açacaktır.

KAYNAKLAR

1. Dağoğlu T., Ovalı F. İndirekt Hiperbilirubinemi. Neonatoloji İstanbul Nobel Tıp 2007; 517-536.
2. Piazza AJ., Stoll BJ. Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. In: Behrman R.E., Kliegman R.M., Jenson H.B, Stanton B.F Nelson Textbook of Pediatrics. Saunders Comp. (18th edition) 2007; 756-766.
3. Gopinathan V., MillerNJ., Milner AD., and Rice-Evans CA. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. FEBS Lett 1994; 349: 197–200.
4. Gkoltsiou K., Tzoufi M., Counsell S., Rutherford M. and Cowan F. Serial brain MRI and ultrasound findings: relation to gestational age, bilirubin level, neonatal neurologic status and neurodevelopmental outcome in infants at risk of kernicterus. EarlyHum. Dev. 2008; 84: 829–838.
5. Ahdab-Barmada M. and Moossy J. The neuropathology of kernicterus in the premature neonate: diagnosticproblems. J. Neuropathol. Exp.Neurol. 1984; 43: 45-56.
6. Maisels MJ., Neonatal Jaundice. Pediatrics in Review 2006; 27(12): 443-453.
7. Ding K., Wang H., Xu J., Lu X., Zhang L., Zhu L. Melatonin reduced microglial activation and alleviated neuroinflammation induced neuron degeneration in experimental traumatic brain injury: Possible involvement of MTOR pathway. Neurochemistry International. 2014; 76: 23-31.
8. Gazzin S., Berengeno A.L., Strazielle N., Fazzari F., Raseni A., Ostrow J.D., Wennberg R., Ghersi-Egea J. F. and Tiribelli C. Modulation of Mrp1 (ABCC1) and Pgp (ABCB1) by bilirubin at the blood-CSF and blood-brain barriers in the Gunnrat.2011; *PLoS ONE* 6, e16165.
9. Melton K., Akinbi HT. Neonatal jaundice: Strategies to reduce bilirubin induced complications. Postgraduate Med 1999;106:167-178.
10. Maisels JM., Watchko JF. Neonatal Hyperbilirubinemia In: Fanaroff AA., Fanaroff JMeditors. Care of the high risk neonate. Saunders-Elsever; 2013; p.310-345.
11. Çoban A.,Neyzi O, Ertuğrul T. Kernikterus (Bilirubin Ensefalopatisi). Pediatri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002; 402-420.
12. <http://www.emedicine.com/med/topic227.htm> (Bilirubin Impaired Conjugation)

13. Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr. Neurol.* 2003; 29: 410-421.
14. Oski F.A. Neonatal Hyperbilirubinemia. *Principles of and Practice of Pediatrics*, Second Edition, Cashore W.J., Lippincott Company, Philadelphia 1994; 446-455.
15. Stoll B.J., Kliegman R.M. Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. In: Behrman R.E., Kliegman R.M., Jenson H.B. (eds) *Nelson textbook of Pediatrics*. Saunders Comp. (17th edition) 2003; 592-596.
16. Maisels MJ., MacDonald MG., Mullett MD., Seshia MM. *Avery's Neonatology Jaundice Pathophysiology and Management of the Newborn*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. 2005; pp. 768-846.
17. Wong RJ., Desandre GH., Sibley E., Stevenson DK. Neonatal Jaundice and liver diseases. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC(eds). *Neonatal-Perinatal Medicine. Diseases of the Fetus and Infant*, 8th edition Mosby Elsevier 2006; 1419-65.
18. Mehta S., Kumar P., Narang A. A randomized controlled trial of fluid supplementation in term neonates with severe hyperbilirubinemia. *J Pediatr.* 2005; 147(6): 781-5
19. Maisels M.J. *Jaundice neonatology*, Fourth Edition , (Eds): Avery G.B., Pletcher M.A., MacDonald M.G., J.B. Lippincott Company, 1994; 630-725.
20. Gartner LM. Neonatal jaundice. *Pediatr Rev* 1994; 15: 422-432.
21. McMahon JR., Stevenson DK., Oski FA. Physiologic Jaundice . In: Taeusch HW., Ballard RA. eds. *Avery's Disease of the Newborn* 7th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998; pp 1003-1007.
22. Kavlu A. *Kliniğimiz Yenidoğan Ünitesine Yatırılan İndirekt Hiperbilirubinemili Olguların Değerlendirilmesi*. Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık tezi, İstanbul, 2006.
23. Bhutani et al *Pediatrics* 1999; 103: 6-14.
24. Norr K.F., Nacion K. Outcomes of postpartum early discharge, 1960-1986. A Comparative Review. *Birth* 1987; 14: 135-141.
25. American Academy of Pediatrics, Provisional Committee for Quality Improvement and Subcommittee on Hyperbilirubinemia: Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004; 114: 297-316.

26. Okumura A., Kidokoro H., Shoji H., Nakazawa T., Mimaki M., Fujii K., Oba H. And Shimizu T. Kernicterus in preterm infants. *Pediatrics*, 2009; 123: e1052–e1058.
27. Moll M., Goelz R., Naegele T., Wilke M. and Poets C.F. Are recommended phototherapy thresholds safe enough for extremely low birth weight (ELBW) infants? A report on 2 ELBW infants with kernicterus despite only moderate hyperbilirubinemia. *Neonatology* 2011; 99: 90–94.
28. Conlee J.W. and Shapiro S.M. Development of cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: a quantitative light microscopic analysis. *Acta Neuropathol.* 1997; 93: 450–460.
29. Shapiro S.M. Chronic bilirubin encephalopathy: diagnosis and outcome. *Semin. Neonatal Med.Fetal.* 2010; 15: 157–163.
30. Nguyen N., Bonzo J.A., Chen S., Chouinard S., Kelner M.J., Hardiman G., Belanger A. and Tukey R.H. Disruption of the *ugt 1* locus in mice resembles human Crigler-Najjar type I disease. *J. Biol.Chem.* 2008; 283: 7901–7911.
31. Fujiwara R., Nguyen N., Chen S. and Tukey R.H. Developmental hyperbilirubinemia and CNS toxicity in mice humanized with the UDP glucuronosyl-transferase1 (UGT1) locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2010; 107: 5024–5029.
32. Cardoso F.L., Brites D. and Brito M.A. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res.Rev.* 2010; 64: 328–363.
33. Cashore W.J., Oh W. and Brodersen R. Reserve albumin and bilirubin toxicity index in infant serum. *Acta Paediatr.Scand.* 1983; 72: 415–419.
34. Sequeira D., Watchko J.F., Daoud M. J., O'Day T.L. and Mahmood B. Unconjugated bilirubin efflux by bovine brain microvascular endothelial cells in vitro. *Pediatr. Crit.CareMed.* 2007; 8: 570–575.
35. Daoud M., Tsai C., Ahdab-Barmada M. and Watchko J.F. ABC transporter (Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2) expression in the developing human CNS. *Neuropediatrics.* 2008; 39: 211–218.
36. Palmela I., Cardoso F.L., Bernas M., Correia L., Vaz A.R., Silva R.F., Fernandes A., Kim K.S., Brites D. and Brito M.A. Elevated levels of bilirubin and long term exposure impair human brain microvascular endothelial cell integrity. *Curr. Neurovasc.Res.* 2011; 8: 153–169.

37. Kim J. and Jung Y. 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: 295–303.
38. Wennberg R.P., Ahlfors C.E., Bhutani V.K., Johnson L.H. and Shapiro S. M. Toward understanding kernicterus: a challenge to improve the management of jaundiced newborns. *Pediatrics.* 2006; 117: 474–485.
39. Rigato I., Pascolo L., Ferneti C., Ostrow J.D. and Tiribelli,C. The human multidrug resistance associated protein MRP 1 mediates ATP-dependent transport of unconjugated bilirubin. *Biochem.J.*2004; 383: 335–341.
40. Brites D. The evolving landscape of neuro-toxicity by unconjugated bilirubin: role of glial cells and inflammation. *Frontiers In Pharmacology.* 2012.
41. Hirrlinger J., Konig J., Keppler D., Lindenau J., Schulz J.B. and Dringen R. The multi-drug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione-disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J. Neurochem.*2001; 76: 627–636.
42. Falcão A.S., Bellarosa C., Fernandes A., Brito M.A., Silva R.F., Tiribelli C. and Brites D. Role of multi-drug resistance associated protein 1 expression in the invitro susceptibility of rat nerve cellto unconjugated bilirubin. *Neuroscience.* 2007a; 144: 878–888.
43. Corich L., Aranda A., Carrassa L., Bellarosa C., Ostrow J.D. and Tiribelli C. The cytotoxic effect of unconjugated bilirubin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells is modulated by the expression level of MRP1 but not MDR1. *Biochem.J.* 2009; 417: 305–312.
44. Hansen T.W. Bilirubin oxidation inbrain. *Mol.Genet.Metab.* 2000a; 71: 411–417.
45. Brito M.A., Lima S., Fernandes A., Falcão A.S., Silva R.F., Butter field D.A. and Brites D. Bilirubin injury to neurons: contribution ofoxidative stress and rescue by glyco-urso-deoxycholicacid. *Neurotoxicology.* 2008a; 29: 259–269.
46. Conforti L., Adalbert R. and Coleman M. P. Neuronal death: where does the end begin? *Trends Neurosci.*2007; 30: 159–166.
47. Rodrigues, C. M., Solá, S., and Brites,D. Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons. *Hepatology* 2002a;35: 1186–1195.
48. Brito M.A., Silva R.F.,and Brites D. Bilirubin induces loss of membrane lipids and exposure of phosphatidylserine in human erythrocytes. *CellBiol.Toxicol.* 2002;.18: 181–192.

49. Khan N.M. and Poduval T.B. Immuno-modulatory and immuno-toxic effects of bilirubin: molecular mechanisms. *J. Leukoc.Biol.* 2011; 90: 997–1015.
50. Sasaki M., Gonzalez-Zulueta M., Huang H., Herring W.J., Ahn S., Ginty D.D., Dawson V.L. and Dawson T.M. Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.*2000; 97: 8617–8622.
51. Mancuso C., Capone C., Ranieri S.C., Fusco S.,Calabrese V.,Eboli M.L., Preziosi P.,Galeotti T.,and Pani G. Bilirubin as an endogenous modulator of neurotrophin redox signaling.*J. Neurosci.Res.*2008; 86: 2235–2249.
52. Fernandes,A.,Coutinho,E.,Lanier, L. M.,andBrites,D. Bilirubin induced changes at neuronal cytoskeletal dynamics: novel cues for reduced axonal arborization. *Glia.* 2009a; 57: S102–S102.
53. Fernandes,A.,Coutinho,E.,Lanier,L. M., andBrites, D. Exploring neuronalcytoskeletondefectsby unconjugatedbilirubin. *Int.J.Dev. Neurosci*2010;28: 715–716.
54. Chang,F.Y.,Lee,C.C.,Huang,C. C., andHsu,K.S.Unconjugatedbilirubinexposureimpairs hippocampal long-termsynaptic plasticity. 2009; *PLoS ONE* 4, e5876.
55. Silva S.L., Vaz A.R., Diógenes M. J., vanRooijen N., Sebastião A. M., Fernandes A. Silva R.F.M. and Brites D. Impairment of neuritesprouting by unconjugated bilirubin is mediated by NO and glutamate, modulated by microglia, and prevented by glycurso-deoxycholic acid and interleukin-10. *Neuropharmacology.* 2012; 62: 2397–2407.
56. Wang, Y.,and Tang, B. L. SNAREs in neurons – beyond synaptic vesicle exocytosis (Review). *Mol.Membr.Biol.*2006; 23: 377–384.
57. Solá, S.,Diógenes,M.J.,Brites,D.,and Rodrigues,C.M. Release of cytochrome c with the interaction of bilirubin, amyloid beta-peptide and glyco-chenodeoxycholate from isolated mitochondria. *ActaMed.Port.* 2002; 15: 269–275.
58. Rodrigues, C. M., Solá, S., and Brites,D. Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons. *Hepatology.* 2002a;35: 1186–1195.
59. Malik,S.G.,Irwanto,K.A.,Ostrow, J.D.,andTiribelli,C. Effect of bilirubin on cytochrome c oxidase activity of mitochondria from Mouse brain and liver. *BMC ResNotes* 3. 2010; 162.

60. Vaz A.R., Delgado-Esteban M., Brito, M. A., Bolanos J.P., Brites,D. and Almeida A. Bilirubin selectively inhibits cytochrome c oxidase activity and induces apoptosis in immature cortical neurons: assessment of the protective effects of glyoursodeoxy-cholicacid.J. Neurochem. 2010; 112: 56–65.
61. Hankø,E., Hansen,T.W., Almaas, R., Lindstad,J., and Rootwelt,T. Bilirubin induces apoptosis and necrosis in human NT2-N neurons. *Pediatr.Res.*2005; 57: 179–184.
62. Bellefontaine, N., Hanchate, N. K., Parkash, J., Campagne, C., de Seranno,S.,Clasadonte,J., d'AnglemontdeTassigny,X., and Prevot,V. Nitricoxide as key mediator of neuron-to- neuron and endothelia-to-glia communication involved in the neuroendocrine control of reproduction. *Neuroendocrinology.* 2011; 93: 74–89.
63. Brites,D., Fernandes,A., Falcão,A. S., Gordo,A.C., Silva,R.F., and Brito, M.A. Biological risks for neurological abnormalities associatedwith hyperbilirubinemia. *J. Perinatol.*2009; 29(Suppl.1): S8–S13.
64. Vaz,A.R., Silva,S.L., Barateiro,A., Fernandes,A., Falcão,A.S., Brito, M. A. and Brites,D. 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.*2011b; 229: 381–390.
65. Lev N., Ickowicz D., Melamed E., and Offen D. Oxidative insults induce DJ-1up-regulation and redistribution: implications for neuroprotection. *Neurotoxicology.* 2008; 29: 397–405.
66. Streit,W.J. Microgliaas neuro-protective, immuno competent cells of the CNS. *Glia.* 2002; 40: 133–139.
67. Liu, W.T., Lin,C.H., Hsiao,M., and Gean, P.W. Minocycline inhibits the growth of glioma by inducing autophagy. *Autophagy.* 2011b; 7: 166–175.
68. Orellana,J.A., Saez,P.J., Shoji,K.F., Schalper,K.A., Palacios-Prado,N., Velarde,V., Giaume,C.,B ennett,M. V., and Saez,J.C. Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid.Redox Signal.*2009; 11: 369–399.
69. Allaman, I.,Belanger,M.,and Magistretti,P.J. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and forworse. *Trends Neurosci.* 2011; 34: 76–87.

70. Fernandes,A., Vaz,A.R., Falcão, A. S., Silva,R.F., Brito,M.A., and Brites,D. Glycoursodeoxycholicacid and interleukin-10 modulate the reactivity of rat cortical astrocytes to unconjugated bilirubin. *J. Neuropathol.Exp.Neurol.* 2007b; 66: 789–798.
71. Fernandes,A., Falcão,A.S., Silva,R. F., Gordo,A.C., Gama,M.J., Brito, M. A., and Brites,D. Inflammatory signalling pathways involved in astroglial activation by unconjugated bilirubin. *J. Neurochem.*2006; 96: 1667–1679.
72. Fernandes,A., Barateiro,A., Falcão, A. S., Silva, S.L., Vaz,A.R., Brito,M. A., Silva,R.F., and Brites,D. Astrocyte activity to unconjugated bilirubin requires TNF-alpha and IL-1beta receptor signaling pathways. *Glia* 2011;59: 14–25.
73. Carson,M.J., Bilousova,T.V., Puntambekar,S.S., Melchior,B., Doose,J. M., and Ethell,I.M. Aroseby any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics.* 2007; 4: 571–579.
74. Gordo,A.C., Falcão,A.S., Fernandes,A., Brito, M.A., Silva,R.F.,and Brites, D. Unconjugated bilirubin activates and damages microglia. *J. Neurosci.Res.*2006;84: 194–201.
75. Silva,S.L., Vaz,A.R., Barateiro,A., Falcão,A.S., Fernandes,A., Brito,M. A., Silva,R.F., and Brites,D. Features of bilirubin-induced reactive microglia: from phagocytosis to inflammation. *Neurobiol.Dis.*2010; 40: 663–675.
76. Lee,S.C., Liu,W., Dickson,D.W., Brosnan, C.F., and Berman, J.W. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1beta. *J. Immunol.* 1993; 150: 2659–2667.
77. Chao,C.C., and Hu,S.Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Dev. Neurosci.* 1994; 16: 172–179.
78. Morandi,A., Hughes,C.G., Girard,T.D., McAuley,D.F., Ely,E.W., and Pandharipande, P.P. Statins and brain dysfunction :a hypothesis to reduce the burden of cognitive impairment in patients who are critically ill. *Chest.* 2011; 140: 580–585.
79. Daulatzai, M.A. Dysfunctional nucleus tractus solitarius: its crucial role in promoting neuropathogenic cascade of Alzheimer's dementia- a novel hypothesis. *Neurochem.Res.* 2012; 37: 846–868.
80. Rossi,D., and Volterra,A. Astrocytic dysfunction: in sights on the role in neurodegeneration. *Brain Res.Bull.* 2009; 80: 224–232.

81. Yirmiya,R.,and Goshen,I. Immunomodulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav.Immun.* 2011 ; 25: 181–213.
82. Sofroniew,M.V., and Vinters,H. V.Astrocytes: biology and pathology. *ActaNeuropathol.* 2010; 119: 7–35.
83. Gutierrez,H., and Davies, A.M. Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-kappa B. *TrendsNeurosci.*2011; 34: 316–325.
84. Yakovleva,T., Bazov,I., Watanabe, H., Hauser,K.F.,and Bakalkin, G. Transcriptional control of maladaptive and protective responses in alcoholics: a role of the NF-kappa B system. *BrainBehav. Immun.* 2011; 25(Suppl.1): S29–S38.
85. Brito MA., Silva R., Tiribelli C., Brites D. Assessment of bilirubin toxicity to erythrocytes. Implication in neonatal jaundice management. *Eur J Clin Invest.* 2000; 30: 239-247.
86. Rubin RA., Balow B., Fisch RO. Neonatal serum bilirubin levels related to cognitive development at ages 4 through 7 years. *J Pediatr.* 1979; 94: 601-604.
87. Odell GB., Storey GN., Rosenberg LA. Studies in kernicterus. 3. The saturation of serum proteins with bilirubin during neonatal life and its relationship to brain damage at five years. *J Pediatr* 1970; 76: 12-21.
88. Brito,M.A.,Brites,D.,andButterfield, D.A. A link between hyper- bilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes. *BrainRes.*2004; 1026: 33–43.
89. Grojean S., Vert P., Daval JL. Combined effects of bilirubin and hypoxia on cultured neurons from the developing rat forebrain. *Semin Perinatol.* 2002; 26: 416-424.
90. Mireles LC., Lum MA., Dennery PA. Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes. *Pediatr Res.* 1999; 45: 355-362.
91. Rodrigues CM., Sola S., Castro RE., Laires PA., Brites D., Moura JJ. Perturbation of membrane dynamics in nerve cells as an early event during bilirubin-induced apoptosis. *J Lipid Res.* 2002; 43: 885-894
92. Volpe J.J. Bilirubin and brain injury. In: Volpe J.J. (ed). *Neurology of the newborn*: WB Saunders; 2001: 521-546.
93. Johnson L., Brown A.K., Bhutani V.K. BIND- a clinical score for bilirubin induced neurologic dysfunction in newborns. *Pediatrics* 1999; 104: 746.
94. Dennery P.A., Seidman D.S., Stevenson D.K. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 2001; 22; 344(8): 581-590.

95. Watchko J.F. Vigintiphobia revisited. *Pediatrics*. 2005; 115(6): 1747-1753.
96. Stocker R., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. *Methods Enzymol* 1990; 186: 301-309.
97. McDonagh A.F. Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium. *J Perinatol* 2001; 21 Suppl 1: 7-12.
98. De Carvalho M., De Carvalho D., Trzmielina S., Lopes J., Hansen T.W. Intensified phototherapy using daylight fluorescent lamps. *Acta Paediatr* 1999; 88(7): 768-771.
99. Stevenson DK., Fanaroff AA., Maisels MJ., Young BW., Wong RJ., Vreman HJ., MacMahon JR., Yeung CY., Seidman DS., Gale R., Oh W., Bhutani VK., Johnson LH., Kaplan M., Hammerman C., Nakamura H. Prediction of hyperbilirubinemia in near-term and term infants. *Pediatrics*. 2001; 108: 31-3
100. Watchko J.F. Exchange transfusion in the management of neonatal hyperbilirubinemia. In: Maisels M.J., Watchko J.F. Neonatal jaundice monographs in clinical pediatrics. Singapore: Harward Academic Publishers, 2000; 169-176.
101. Dağoğlu T., Ovalı F. İndirekt Hiperbilirubinemi. *Neonatoloji, İstanbul, Nobel Tıp* 2000; 443-460.
102. Gottstein R., Cooke RW. Systematic review of intravenous immunoglobulin in haemolytic disease of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003; 88: F6.
103. Martinez J.C., Garcia H.O., Otheguy L.E., Drummond G.S., Kappas A. Control of severe hyperbilirubinemia in full-term newborns with the inhibitor of bilirubin production Sn-mesoporphyrin. *Pediatrics* 1999; 103(1): 1-5.
104. Kappas A., Drummond GS., Valaes T. A single dose of Sn-mesoporphyrin prevents development of severe hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient newborns. *Pediatrics* 2001; 108: 25.
105. Kappas A., Drummond GS., Henschke C., Valaes 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: 468.
106. Suresh GK., Martin CL., Soll RF. Metalloporphyrins for treatment of unconjugated hyperbilirubinemia in neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; CD004207.

107. Newman T.B., Klebanoff M.A. Neonatal hyperbilirubinemia and long-term outcome: another look at the Collaborative Perinatal Project. *Pediatrics* 1993; 92(5): 651-657.
108. Seidman D.S., Paz I., Stevenson D.K. Laor A., Danon Y.L., Gale R. Neonatal hyperbilirubinemia and physical and cognitive performance at 17 years of age. *Pediatrics* 1991; 88: 828-833.
109. Johnson L.H., Sivieri E., Bhutani V.K. Neurologic outcome of singleton ≥ 2500 gr. CORE Project babies not treated for hyperbilirubinemia. *Pediatr Res* 1999; 45: 203A.
110. Ozmert E., Erdem G., Topcu M., Yurdakok M., Tekinalp G., Genç D., Renda Y. Long-term follow-up of indirect hyperbilirubinemia in full-term Turkish infants. *Acta Paediatr* 1996; 85: 1440-4.
111. Mc Mahon JR., Stevenson DK., Oski FA. Bilirubin toxicity, encephalopathy and kernicterus. In: Taeusch HW, Ballard RA, eds. *Avery's Disease of the Newborn*, 7 ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998; pp1003-1007.
112. Dennery PA., Seidman DS., Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 581-590
113. Connolly AM, Volpe JJ. Clinical feature of bilirubin encephalopathy. *Clin Perinatol* 1990; 17: 371-379
114. Ip S., Chung M., Kukig J., et al. An evidence-based review of important issues concerning neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 2004; 114: 130-153.
115. Johnson, L. and Bhutani, V.K. The clinical syndrome of bilirubin-induced neurologic dysfunction. *Semin Perinatol*. 2011; 35: 101–113.
116. Soorani-Lunsing, I., Woltj, H.A., and Hadders-Algra, M. Are moderate degrees of hyperbilirubinemia in healthy term neonates really safe for the brain?. *Pediatr Res*. 2001; 50: 701–705.
117. McCandless, D.W. Neurological sequelae from jaundice: Kernicterus. Humana Press/Springer, New York. 2011; (219–26).
118. Bhutani, V.K. and Johnson, L. Kernicterus in the 21st century: Frequently asked questions. *J Perinatol*. 2009; 29: S20–S24.
119. Wong, C.G. and Stevens, M.C. The effects of stimulant medication on working memory functional connectivity in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2012; 71: 458–466.

120. Sonuga-Barke, E.J.S. and Fairchild, G. Neuroeconomics of attention deficit/hyperactivity disorder: Differential influences of medial, dorsal, and ventral prefrontal brain networks on suboptimal decision making? *Biol Psychiatry*. 2012; 72: 126–133.
121. Rance, G., Beer, D.E., Cone-Wesson, B. et al. Clinical findings for a group of infants and young children with auditory neuropathy. *Ear Hear*. 1999; 20: 238–252.
122. Paludetto, R., Mansi, G., Raimondi, F. et al. Moderate hyperbilirubinemia induces a transient alteration of neonatal behavior. *Pediatrics*. 2002; 110: e50.
123. Middleton, F.A. Fundamental and clinical evidence for basal ganglia influences on cognition. in: M.A. Bedard (Ed.) *Mental and behavioral dysfunction in movement disorders*. Humana Press, Totowa, NJ; 2003: 13–3.
124. Arsalidou, M., Duerden, E.G., and Taylor, M.J. The centre of the brain: Topographical model of motor, cognitive, affective, and somatosensory functions of the basal ganglia. *Hum Brain Mapp*. 2012; (Jun 19 (Epub ahead of print)).
125. McCord, CP., Allen, FP. Evidences associating pineal gland function of alterations in pigmentation. *J Exptl Zool* 1917; 23:..207.
126. Lerner, AB., Case, JD., Takahashi, Y., Lee, TH., Mori, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80:2587
127. Klein DC., Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole -O- methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1979; 174:245.
128. Claustrat B., Brun J., Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005; 9: 11-24.
129. Macchi MM., Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25: 177-195.
130. Palaoğlu S., Beşkonaklı E. Pineal bez ve yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics* 1998; 1: 13-18.
131. Touitou Y. Human aging and melatonin: clinical relevance. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1083-1100.
132. Shein HM, Wurtman RJ. Cyclic adenosine monophosphate: stimulation of melatonin and serotonin synthesis in cultured rat pineals. *Science* 1969; 166: 519.

133. Tricoire H., Locatelli A., Chemineau P., Malpoux B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 2002; 143: 84.
134. Witt-Enderby PA., Bennett J., Jarzynka MJ., et al. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 2003; 72: 2183.
135. Reiter RJ. The pineal gland and melatonin relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol* 1995; 30: 199-212.
136. Siu AW., Reiter RJ., To CH. The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J Pineal Res* 1998; 24: 239-244.
137. Bountin JA., Aedinot V., Ferry G. Delagrangé P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26: 412-419.
138. Reppert SM. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Rhythms* 1997; 12: 528-531.
139. Dubovich ML. Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci*, 1995; 16: 50-56.
140. Sugden D., Davidson K., Hough KA., Teh MT. Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. *Pigment Cell Res* 2004; 17: 454-460.
141. Gerdin MJ., Masana MI., Rivera-Bermúdez MA., et al. Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB J* 2004; 18: 1646.
142. Mollaoğlu H, Özgüner MF. Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005; 12: 52-56.
143. Kopin IJ., Pare CM., Axelrod J., Weissbach H. 6-Hydroxylation, the major metabolic pathway for melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1960; 40: 377.
144. Cardinali DP., Pévet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 1998; 2: 175-190.
145. Arendt J. Melatonin, circadian rhythms and sleep. *New Engl J Med* 2000; 343: 1114-1116
146. Rohr UD., Herold J. Melatonin deficiencies in women. *Maturitas* 2002; 41: S85-S104.
147. Bendz LM., Scates AC. Melatonin treatment for insomnia in pediatric patients with Attention deficit/hyperactivity disorder. *Ann Pharmacother*. 2010; 44: 185-191.

148. Tsuzuki K., Okamoto-Miunu K., Mizuno K. Effects of humid heat exposure on sleep, thermo regulation, melatonin and microclimate. *J Therm Biol* 2004; 29: 31-34.
149. Khaleghipour S., Masjedi M., Ahade H., Enayate M., Pasha G., Nadery F et al. Morning and nocturnal serum melatonin rhythm levels in patients with major depressive disorder: an analytical cross-sectional study. *Sao Paulo Med J* 2012; 130: 167-172.
150. Challet E. Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 2007; 148: 5648-5655.
151. Lam RW., Bercowitz AL., Berga SL., Clark CM., Kripke DP., Gillin JC. Melatonin suppression in bipolar and unipolar mood disorders. *Psychiatry Res* 1990; 33: 129-134.
152. Pacchierotti CL., Iapichino L., Bossini L., Pieraccini F., Castrogiovanni P. Melatonin in psychiatric disorders: a review on the melatonin involvement in psychiatry. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22: 18-23.
153. Suresh Kumar PN., Andrade C., Bhakta SG., Singh NM. Melatonin in schizophrenic outpatients with insomnia: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Psychiatry* 2007; 68: 237-241.
154. Catapano F., Monteleone P., Fuschino A., Maj M., Kemali D. Melatonin and cortisol secretion in patients with primary obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res* 1992; 44: 217-225.
155. Cameron OG., Nesse RM. Systemic hormonal and physiological abnormalities in anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology* 1988; 13: 287-307.
156. Bazil CW., Short D., Crispin D., Zheng W. Patients with intractable epilepsy have low melatonin, which increases following seizures. *Neurology*. 2000; 55: 1746-1748.
157. Ostrowska Z., Kos-Kudla B., Marek B., Kajdaniuk D., Staszewicz P., Szapska B., Strzelczyk J. The influence of pinealectomy and melatonin administration on the dynamic pattern of biochemical markers of bone metabolism in experimental osteoporosis in the rat. *Neuro Endocrinol Lett*, 2002; 23 Suppl 1: 104-109.
158. Suzuki N., Somei M., Seki A., Reiter RJ., Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J Pineal Res*, 2008; 45: 229-34.
159. Bubenik GA., Blask DE., Brown GM., Maestroni GJ., Pang SF., Reiter RJ., Viswanathan M., Zisapel N. Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biol Signals Recept*, 1998; 7: 195- 219.

160. Moğulkaç R., Baltacı AK. Hipertiroidi oluşturulan ratlarda intraperitoneal melatonin uygulamasının tiroid hormonları ve testesteron salınmasına etkisi. Genel Tıp Dergisi 2002; 12: 129-132.
161. Voordouw BC., Euser R., Verdonk RE., Alberda BT., de Jong FH., Drogendijk AC et al. Melatonin and melatonin progestin combination after pituitary-ovulation function in women and can inhibit ovulation.. J Clin Endocrinol Metab 1992; 74: 108-117.
162. Ratzburg,C. Melatonin–the myths and facts. http://www.vanderbilt.edu/AnS/psychology/health_psychology/melatonin.htm retrieved on Jan 01, 2013.
163. Shigeta H., Yasui A., Nimura Y., Machida N., Kageyama M., Miur Met al. Postoperative delirium and melatonin levels in elderly patients. Am J Surg 2001; 182: 449-454.
164. Herxheimer A., Petrie KJ. Melatonin for preventing and treating jet lag. Cochrane Database Syst Rev. 2001; 1:CD001520.
165. Özgüner F., Özcankaya R., Delibaş N., Koyu A., Çalışkan S. Melatonin ve klinik önemi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1995 ; 2: 1-6.
166. Karasket M, Fraschini F. Is there a role for pineal gland in neoplastic growth? In Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuro-immunomodulation (Eds FFraschini,RJ Reiter) New York. 1991; 243-251.
167. Reiter RJ,Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart.Cardiovasc Res 2003; 58: 10-19.
168. Tan DX., Manchester LC., Reiter RJ., Qi W., Kim SJ., El-Sokkary GH. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. J Pineal Res 1998; 25: 184-191.
169. Yildiz M.,Akdemir O. Assessment of the effects of physiological release of melatonin on arterial distensibility and blood pressure. Cardiol Young 2009; 19: 198-203.
170. Sewerynek E. Melatonin and the cardiovascular system. Neuro Endocrinol Lett, 2002; 23 Suppl 1: 79-83.
171. Kaur C., Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. Int J Food Sci Tech 2001; 36: 703-725.
172. Meydani M. Antioxidants and cognitive function. Nutr Rev 2001; 59: S75-S82.

173. Reiter RJ., Tan DX., Manchester LC., Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237-256.
174. Şahna E., Deniz E., Aksulu HE. Miyokardiyal iskemi-perfüzyon hasarı ve melatonin. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006; 6: 163-168.
175. Reiter RJ., Tan DX., Erren TC., Fuentes-Broto L., Paredes SD. Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther*, 2009; 8: 354-360.
176. Reiter RJ., Paredes SD., Manchester LC., Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2009; 44: 175-200.
177. Reiter RJ. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 412-420.
178. Duell PB., Wheaton DL., Shultz A., Nguyen H. Inhibition of LDL oxidation by melatonin requires supraphysiologic concentrations. *Clin Chem* 1998; 44 : 1931.
179. Reiter RJ., Tan DX., Poeggeler B., et al. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 719: 1.
180. Gerdin MJ., Masana MI., Dubocovich ML. Melatonin-mediated regulation of human MT(1) melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 2023.
181. Kus I., Ogeturk M., Oner H., Şahin S., Yekeler H., Sarsılmaz M., Protective effects of melatonin against tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell biochem function* 2005; 23: 169-174
182. Reiter RJ., Maestroni JM. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. *J Mol Med*, 1999; 77: 36-39.
183. Reiter RJ., Calvo JR., Karbownik M., Qi W., Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; 917: 376-386.
184. Wichmann MW., Zelleneger R., DeMaso CM., Ayala A., Chaudry IH. Melatonin administration attenuates depressed immune functions after trauma-hemorrhage. *J Surg-Res*, 1996; 63: 256-262.
185. Maestroni GJM. T-Helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res*, 1995; 18: 84-89.
186. Maestroni GJM. The immunoendocrine role of melatonin. *J Pineal Res*, 1995; 19: 149-165.

187. Toklu H., Kapucu C., Ercan F., Erkanli G., Kaçmaz A., Tilki M., Yeğen BC. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today*, 2005; 35: 52-59.
188. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res Bull* 1999; 48: 233e8.
189. Reiter RJ., Calvo JR., Karbownik M., Qi W., Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 376–86.
190. Welin AK., Svedin P., Lapatto R., Sultan B., Hagberg H., Gressens P., et al. Melatonin reduces inflammation and cell death in white matter in the mid-gestation fetal sheep following umbilical cord occlusion. *Pediatr Res* 2007; 61(2): 153–8.
191. Villapol S., Fau S., Renolleau S., Biran V., Charriaut-Marlangue C., Baud O. Melatonin promotes myelination by decreasing white matter inflammation after neonatal stroke. *Pediatr Res* 2011; 69(1): 51–5.
192. Carloni S., Perrone S., Buonocore G., Longini M., Proietti F., Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pineal Res* 2008; 44(2): 157–64.
193. Chen J, Chen G, Li J, Qian C, Mo H, Gu C, Yan F, Yan W, Wang L, Melatonin attenuates inflammatory response-induced brain edema in early brain injury following a subarachnoid hemorrhage: a possible role for the regulation of pro-inflammatory cytokines., *J Pineal Res*. 2014 Oct; 57(3): 340-7.
194. Fulda S., Debatin KM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 217-223.
195. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 2010; 17: 1104-1114.
196. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9: 1004–1010.
197. Smith CM, Chen Y, Sullivan ML, Kochanek PM, Clark RS. Autophagy in acute brain injury: feast, famine, or folly? *Neurobiol Dis*. 2011; 43: 52–59.
198. Liu C, Jia Z, Zhang X, Hou J, Wang L, Hao S, et al. Involvement of melatonin in autophagy-mediated mouse hepatoma H22 cell survival. *Int Immunopharmacol*. 2012; 12: 394–401.

199. Chen J, Wang L, Wu C, Hu Q, Gu C, Yan F, et al. Melatonin-enhanced autophagy protects against neural apoptosis via a mitochondrial pathway in early brain injury following a subarachnoid hemorrhage. *J Pineal Res.* 2014; 56: 12–19.
200. Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, Wu Q, Zhang X, Luo C, Zhou S, Sirianni AC, Sarkar S, Kristal BS, Friedlander RM, Wang X. N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *J Neurosci.* 2014 Feb 19; 34(8): 2967-78
201. B. Halliwell, “Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?” *The Lancet*, 1994; vol. 344, no. 8924, pp. 721–724.
202. S. Perrone, M. L. Tataranno, S. Negro et al., “Early identification of the risk for free radical-related diseases in preterm newborns,” *Early Human Development*, , 2010; vol. 86, no. 4, pp. 241–244.
203. Gitto, R. J. Reiter, M. Karbownik et al., “Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period,” *Biology of the Neonate*, , 2002; vol. 81, no. 3, pp. 146–157.
204. O.D. Saugstad, “Bronchopulmonary dysplasia: oxidative stress and antioxidants,” *Seminars in Neonatology*, 2003; vol. 8, no. 1, pp. 39–49.
205. O. D. Saugstad, “Oxidative stress in the newborn: a 30-year perspective,” *Biology of the Neonate*, 2005; vol. 88, no. 3, pp. 228–236.
206. R. L. Haynes, R. D. Folkerth, R. J. Keefe et al., “Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia,” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2003; vol. 62, no. 5, pp. 441–450.
207. R. J. Reiter, S. D. Paredes, L. C. Manchester, and D.-X. Tan, “Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin melatonin as an antioxidant,” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2009; vol. 44, no. 4, pp. 175–200.
208. R. J. Reiter, D.-X. Tan, C. Osuna, and E. Gitto, “Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review,” *Journal of Biomedical Science*, 2000; vol. 7, no. 6, pp. 444–458.
209. R. J. Reiter, D.-X. Tan, M. P. Terron, L. J. Flores, and Z. Czarnocki, “Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions,” *Acta Biochimica Polonica*, 2007; vol. 54, no. 1, pp. 1–9.

210. N. Mohan, K. Sadeghi, R. J. Reiter, and M. L. Meltz, "The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF- κ B," *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1995; vol. 37, no. 6, pp. 1063–1070.
211. J. C. Mayo, R. M. Sainz, D.-X. Tan et al., "Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages," *Journal of Neuroimmunology*. 2005; vol. 165, no. 1-2, pp. 139–149.
212. L. Marseglia, S. Aversa, I. Barberi, et al., "High endogenous melatonin levels in critically ill children: a pilot study," *Journal of Pediatrics*, , 2013; vol. 62, pp. 357–360.
213. B. Poeggeler, "Melatonin replacement therapy infants: the impact of pharmaco-kinetics." *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2013; vol. 6, pp. 367–368.
214. Nakamura Y, Tamura H, Kashida S, et al. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. *J Pineal Res* 2001; 30: 29–33.
215. Bagci S, Berner AL, Reinsberg J, et al. Melatonin concentration in umbilical cord blood depends on mode of delivery. *Early Hum Dev* 2012; 88: 369–73.
216. Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, et al. Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol* 2008; 25: 291–303.
217. Z. S. Vexler and D. M. Ferriero, "Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury," *Seminars in Neonatology*. 2001; vol. 6, no. 2, pp. 99–108.
218. T. E. Inder and J. J. Volpe, "Mechanisms of perinatal brain injury," *Seminars in Neonatology*. 2000; vol. 5, no. 1, pp. 3–16.
219. A. J. du Plessis and J. J. Volpe, "Perinatal brain injury in the preterm and term newborn," *Current Opinion in Neurology*, vol. 15, no. 2, pp. 151–157.
220. S. Perrone, G. Stazzoni, M. L. Tataranno, and G. Buonocore, "New pharmacologic and therapeutic approaches for hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn," *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2012; vol. 25, no. 1, pp. 83–88.
221. S. L. Miller, E. B. Yan, M. Castillo-Meléndez, G. Jenkin, and D. W. Walker, "Melatonin provides neuroprotection in the late-gestation fetal sheep brain in response to umbilical cord occlusion," *Developmental Neuroscience*. 2005; vol. 27, no. 2–4, pp. 200–210.

222. T. Lekic, A. Manaenko, W. Rolland et al., "Neuroprotection by melatonin after germinal matrix hemorrhage in neonatal rats," *Acta Neurochirurgica*. 2011; no. 111, pp. 201–206.
223. I. Husson, B. Mesplis, P. Bac, J. Vamecq, P. Evrard, and P. Gressens, "Melatonergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge," *Annals of Neurology*. 2002; vol. 51, no. 1, pp. 82–92.
224. F. Fulia, E. Gitto, S. Cuzzocrea et al., "Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin," *Journal of Pineal Research*, 2001; vol. 31, no. 4, pp. 343–349.
225. N. J. Robertson, S. Faulkner, B. Fleiss, et al., "Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model," *Brain*, 2013; vol. 136, pp. 90–105.
226. Y. Okatani, K. Okamoto, K. Hayashi, A. Wakatsuki, S. Tamura, and Y. Sagara, "Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term," *Journal of Pineal Research*, 1998; vol. 25, no. 3, pp. 129–134.
227. Hansen TWR, Allen JW. Hemolytic anemia does not increase entry into, nor alter rate of clearance of bilirubin from rat brain. *Biol Neonate* 1996; 69: 268–74.
228. Concise International Chemical Assessment Document 19 Phenylhydrazine. Geneva: World Health Organization; 2000.
229. Del Angel-Meza AR, Dávalos-Marín AJ, Ontiveros-Martinez LL, Ortiz GG, Beas-Zarate C, Chaparro-Huerta V, Torres-Mendoza BM, Bitzer-Quintero OK. Protective effects of tryptophan on neuro-inflammation in rats after administering lipopolysaccharide. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 2011; 215-219.
230. Yingli J., Qingbin W., Xiaochen Y., Bingwei L., Mingming L., Xiaoyan Z., Shuying L., Hongwei L., Ruijuan X. Microvascular protective role of pericytes in melatonin-treated spinal cord injury in the C57BL/6 mice. *Chin Med J*; 2014; 127(15): 2808-2813.
231. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982, 78: 206-9.
232. Aykaç G, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Öz H: The effect of ethanol ingestion on hepatic lipid peroxidase, glutathione peroxidase, and glutathione transferase in rats. *Toxicol* 1985; 36: 71-6.

233. Gerardo Barrag'an Mejia [a](#), Cecilia Ridaura Sanz [b](#), Marco Mart'inez Avila [c](#), Armando Valenzuela Peraza [c](#), David Calder'on Guzm'an [a](#), Hugo Ju'arez Olgu'ın [d](#), Aline Morales Ram'irez [a](#), Edna Garc'ia Cruz. Experimental hemolysis model to study bilirubin encephalopathy in rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*. 2008; 168: 35–41.
234. Hanko E, Tommarello S, Watchko JF, Hansen TW. Administration of drugs known to inhibit P-glycoprotein increases brain bilirubin and alters the regional distribution of bilirubin in rat brain. *Pediatr Res*. 2003; 54: 439–40.
235. Shapiro SM. Somatosensory and brainstem auditory evoked potentials in the Gunn rat model of acute bilirubin neurotoxicity. *Pediatr Res*. 2002; 52: 844–9.
236. Aygun C, Tekinalp G, Gurgey A. Increased fetal iron load in rhesus hemolytic disease. *Pediatr Hematol Oncol* 2004; 4: 329–33.
237. [Bostanci MO](#), [Bağirici F](#). Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron-induced neurotoxicity. [Brain Res Bull](#). 2008 May 15; 76(1-2): 57-62.
238. Chtourou Y, Fetoui H, Gdoura R. [Protective effects of naringenin on iron-overload-induced cerebral cortex neurotoxicity correlated with oxidative stress](#). *Biol Trace Elem Res*. 2014 Jun;158(3): 376-83.
239. Bostanci MÖ, Bağirici F. [Blocking of L-type calcium channels protects hippocampal and nigral neurons against iron neurotoxicity. The role of L-type calcium channels in iron-induced neurotoxicity](#). *Int J Neurosci*. 2013 Dec; 123(12): 876-82.
240. Sobotka TJ, Whittaker P, Sobotka JM, Brodie RE, Quander DY, Robl M, et al. Neurobehavioral dysfunctions associated with dietary iron overload. *Physiol Behav* 1996; 59: 213–9.
241. Fredriksson A, Schroder N, Eriksson P, Izquierdo I, Archer T. Maze learning and motor activity deficits in adult mice induced by iron exposure during a critical postnatal period. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000; 119: 65–74.
242. Roger C, KozielV, Vert P, Nehlig A. Autoradiographic mapping of local cerebral permeability to bilirubin in immature rats: effects of hyperbilirubinemia. *Pediatr Res* 1996; 39: 64–71.
243. Dominguez F, Gonz'alez G, Cedars M, Calvo J. Apertura reversible de la barrera hemato-encef'lica inducida por hipercapnia en hiperbilirrubinemia experimental. *Ann Espa'noles Pediatr* 1997; 46: 374–7.

244. Lodygensky GA, Vasung L, Sizonenko SV, et al. Neuroimaging of cortical development and brain connectivity in human newborns and animal models. *J Anat.* 2010; 217: 418–28.
245. Olivier P, Fontaine RH, Loron G, et al. Melatonin promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats. *PLoS ONE* 2009; 4: e7128.
246. H Aly, H Elmahdy, M El-Dib, M Rowisha, M Awny, T El-Gohary, M Elbatch, M Hamisa and A-R El-Mashad. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study. *Journal of Perinatology*, 13 November 2014.
247. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. Clin Perinatol. 2014 Mar; 41(1): 119-31.
248. Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 1999; 50: 271–279.
249. Macleod MR, O'Collins T, Horky LL, Howells DW, Donnan GA. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of melatonin in experimental stroke. *J Pineal Res.* 2005; 38: 35–41.
250. Smith ED, Prieto GA, Tong L, Sears-Kraxberger I, Rice JD, Steward O, Cotman CW. Rapamycin and interleukin-1 β impair brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival by modulating autophagy. J Biol Chem. 2014 Jul 25; 289(30): 20615-29.
251. Patterson SL. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. Neuropharmacology. 2014; (14): S0028-3908.
252. Lan KM, Tien LT, Pang Y, Bhatt AJ, Fan LW. IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats. Toxicol Lett. 2015 Apr 2; 234(1): 30-9.
253. Liu S, Wu H, Xue G, Ma X, Wu J, Qin Y, Hou Y. Metabolic alteration of neuroactive steroids and protective effect of progesterone in Alzheimer's disease-like rats. *Neural Regen Res.* 2013 Oct 25; 8(30): 2800-10.
254. Hasturk A, Yilmaz E, Turkoglu E, Kertmen H, Horasanli B, Hayirli N, Erguder B, Evirgen O. Therapeutic evaluation of interleukin 1-beta antagonist Anakinra against traumatic brain injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, January 2015, Vol. 21, No. 1.

255. Senol N, Nazıroğlu M. Melatonin reduces traumatic brain injury-induced oxidative stress in the cerebral cortex and blood of rats. Neural Regen Res. 2014 Jun 1; 9(11): 1112-6.
256. Jasenka Trifunović, Larisa Miller, Željko Debeljak, Vesna Horvat. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. Biochemia Medica 2015; 25(1): 36-48.
257. Knoblach SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. Exp Neurol. 1998 Sep; 153(1): 143-51.
258. Zhao GW, Wang Y, Li YC, Jiang ZL, Sun L, Xi X, He P, Wang GH, Xu SH, Ma DM, Ke KF. The neuroprotective effect of modified "Shengyu" decoction is mediated through an anti-inflammatory mechanism in the rat after traumatic brain injury. J Ethnopharmacol. 2014; 151(1): 694-703.
259. Stahl SM. Depression and bipolar disorders. In Essential Psychopharmacology second edition (Stahl SM ed). Cambridge University Press 2000; pp 135-197.
260. Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. Neurosci Lett 2002; 328: 261-26.
261. Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L, Miller JA, Welcher AA. Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. Protein Expr Purif 1995; 6: 465-471.
262. Chui DH, Marcellino M, Marotta F, Sweed H, Solimene U, Vignali AI, Xiao W, Ayala A, Cagnuolo U, and Zerbinati N. A Double-Blind, Rct Testing Beneficial Modulation of Bdnf in Middle-Aged, Life Style-Stressed Subjects: A Clue to Brain Protection? J Clin Diagn Res. 8(11): MC01–MC06.
263. Dogan M, Peker E, Kirimi E, Sal E, Akbayram S, Erel O, et al. Evaluation of oxidant and antioxidant status in infants with hyperbilirubinemia and kernicterus. Hum Exp Toxicol 2011; 30: 1751e60.
264. Akisu M, Coker C, Tuzun S, Yilmaz D, Kultursay N. Serum malondialdehyde levels in preterm and full term infants undergoing phototherapy. Acta Paediatr 1998; 87: 605e6.
265. El-Missiry MA, Othman AI, Al-Abdan MA, El-Sayed AA. Melatonin ameliorates oxidative stress, modulates death receptor pathway proteins, and protects the rat cerebrum against bisphenol-A-induced apoptosis. J Neurol Sci. 2014 Dec 15; 347(1-2): 251-6.

266. Deng Y, Jiao C, Mi C, Xu B, Li Y, Wang F, Liu W, Xu Z. Melatonin inhibits manganese-induced motor dysfunction and neuronal loss in mice: involvement of oxidative stress and dopaminergic neurodegeneration. Mol Neurobiol. 2015 Feb; 51(1): 68-88.
267. Davutoglu M, Guler E, Olgar S, Kurutas EB, Karabiber H, Garipardic M, et al. Oxidative stress and antioxidant status in neonatal hyperbilirubinemia. Saudi Med J 2008; 29: 1743e8.
268. Suleymanoglu S, Cekmez F, Cetinkaya M, Tayman C, Canpolat FE, Kafa IM, Tanju A, Arzıman IK, Fidancı M, Tunc T, Sarıcı SU. Protective effects of melatonin therapy in model for neonatal hyperoxic lung injury. Altern Ther Health Med. 2014 Sep-Oct; 20(5): 24-9.
269. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. Stroke. 1994 Jul; 25(7): 1469-75.
270. John W. Chen, Michael O. Breckwoldt, Elena Aikawa, Gloria Chiang and Ralph Weissleder. Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain (2008), 131: 1123-1133.
271. Oscar Campuzano, Maria del Mar Castillo-Ruiz, Laia Acarin, Berta Gonzalez, Bernardo Castellano. Decreased myeloperoxidase expressing cells in the aged rat brain after excitotoxic damage. Experimental Gerontology Volume 46, Issue 9, September 2011, Pages 723–730.