T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖZGÜN BİR HİPERBİLİRUBİNEMİ MODELİNİN ZEBRABALIĞINDA GELİŞTİRİLMESİ

EBRU ÖNAL

ORCID: 0009-0001-5363-263X

SİNİRBİLİMLERİ ANABİLİM DALI

TEMEL SİNİRBİLİMLER YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

HAZİRAN 2023

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2020970082

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖZGÜN BİR HİPERBİLİRUBİNEMİ MODELİNİN ZEBRABALIĞINDA GELİŞTİRİLMESİ

EBRU ÖNAL

ORCID: 0009-0001-5363-263X

SİNİRBİLİMLERİ ANABİLİM DALI

TEMEL SİNİRBİLİMLER YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Abdullah KUMRAL

İkinci Danışman: Gülçin ÇAKAN AKDOĞAN

(Bu araştırma TÜBİTAK 122S215 numaralı proje ile desteklenmiştir)

İZMİR

HAZİRAN 2023

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitiüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "Özgün bir hiperbilirubinemi modelinin zebrabalığında geliştirilmesi" başlıklı Yüksek Lisans tezin içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğmi, değerlendirme ve sonhçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, teizimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını, aksi bri durumda aleyhine doğabilieccek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Öğrenci Adı Soyadı: Ebru ÖNAL

Tarih:

TEŞEKKÜR

İlk olarak, Supervisor'ım olan Dr. Gülçin ÇAKAN-AKDOĞAN'a teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Yüksek lisansım süresince birçok çalışmada yer almamı sağlayarak şuan ki bilgi birikimimi edinmemi sağladı ve engin bilgileri, hoşgörüsü ve sabrı ile çalışmalarımda bana yol gösterdi. Zor zamanlarımda desteğini hiç eksik etmedi. Her zaman şefkatli, neşeli ve arkadaş gibi yaklaşması sayesinde huzur ortamı oluşturarak her gün büyük bir istekle çalışmalarımı devam ettirebilmemi sağladı. Hem bir bilim insanı hem bir anne hem de bir arkadaş olarak bana çok iyi bir rol model oldu.

Beni öğrencisi olarak kabul eden resmi danışmanım Prof. Dr. Abdullah KUMRAL' a ayrıca teşekkür etmek istiyorum. Her zaman anlayışla ve hoşgörüyle bana kıymetli vaktini ayırarak çalışmalarımı ve bu tez çalışmasını ilerletmemi sağladı. Destekleri ve katkıları için minnettarım.

Jüri Üyelerim Prof. Dr. Mete Akisü, Prof. Dr. Çağlar Karakaya ve Dr. Aslı SADE 'ye tez çalışmamı değerlendirmek için değerli zamanlarını ayırdıkları için ayrıca teşekkür etmek istiyorum.

Projemizde ortak çalıştığım diğer bir kişi ise yüksek lisansa başladığım ilk zamanlarda bana yol gösteren, başım sıkıştığında her zaman yardımıma koşan, balık birimi sorumlumuz Emine Gelinci' ye her şey için çok teşekkür ediyorum.

Projemizde ortak çalıştığım tıp intern doktoru olan Metahan Güzelkaya' ya teşekkür etmek istiyorum. Çalışmamız boyunca hem bilgileriyle hem de iyi bir arkadaş olarak bana desteklerini hiç esirgemedi.

Herkesin yardımına koşan, kendisinden her gün yeni bir şey öğrendiğim, lab arkadaşım, dert ortağım ve güzel kalpli arkadaşım Esra Ersöz' e zor zamanlarımda yanımda olduğu için, beni yüreklendirdiği ve bana desteğini hiç esirgemediği için sonsuz teşekkür ediyorum.

Güçlü karakteri ve azmiyle bende hayranlık uyandıran, her gün güler yüzüyle günümü güzelleştiren, tez döneminde psikolojik desteğini hiç esirgemeyen, kalbi pamuk gibi olan Özlem Erez' e çok teşekkür ediyorum.

Birlikte geç saatlere kadar birbirimizi motive ederek çalıştığım, her başım sıkıştığında yardımıma koşan, beni hep motive eden ve bana hayattan keyif almayı öğreten arkadaşım Merve Başol' a ayrıca teşekkür ediyorum.

Bana yol gösteren, her konuda cesaretlendiren ve yardımlarını hiç esirgemeyen Khalid Abdalla' a hem iyi bir arkadaş hem de iyi bir Supervisor olduğu için ayrıca teşekkür ederim.

Sevgili lab arkadaşım Helin Özaktaş' a tanıştığımız günden bu yana sürekli yüzümü güldürerek ve yanımda olarak hayatıma renk kattığı için teşekkür etmek istiyorum.

Lab'ımıza geldiği günden beri mantıklı yaklaşımlarıyla hayatıma dokunan Serhat Songören' e teşekkür ederim.

Çiğdem Karakoyun'a ayrıca teşekkür etmek istiyorum. Hem akademik hem de yaşam deneyimleriyle yoluma ışık tuttu.

Balıklarımızı besleyen ve balıkların annesi olan sevgili Meryem Özaydın'a teşekkür ediyorum. Onun sayesinde bu güzel çalışmaları yapabildik.

Ayrıca en yakın arkadaşlarım olan Neşe Baysan' a ve Zehra Vural'a çok teşekkür ediyorum. Lisans eğitimimde tanıştığımız günden bu yana her zaman beni destekleyip yüreklendirdiler. Benim için arkadaştan çok daha öte aile gibi oldular. Her anımda yanımda olmaları benim için çok kıymetliydi.

Kardeşim Salih Önal' a beni hep desteklediği ve bir arkadaş gibi yanımda durduğu için çok teşekkür ediyorum. Küçük kardeşim Fatma Önal' a hayatıma neşe getirdiği ve günlerimi güzelleştirdiği için ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak anne ve babama, beni büyütüp bu günlere getirdikleri için, tüm okul hayatım boyunca beni destekledikleri ve arkamda durdukları için ve her zaman daha iyi yerlere gelmem için sonsuz çaba gösterdikleri için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ i

ŞEKİLLER DİZİNİ ii

SİMGELER VE KISALTMALAR iv

ÖZET vi

ABSTRACT viii

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi 1

1.2. Araştırmanın Amacı 1

1.3. Araştırmanın Hipotezleri 2

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Bilirubin 3

2.2. Hiperbilirubinemi 5

2.3. Hiperbilirubineminin (Sarılık) Nedenleri 5

I. Bilirubin Yapımının Artması 6

II. Bilirubin Klirensinin Azalması 6

III. Bilirubinin Artmış Enterohepatik Dolaşımı 8

2.4. Bilirubinin Neden Olduğu Nörolojik Hastalıklar: 9

2.4.1. Akut Bilirubin Ensefalopatisi 10

2.4.2. Kronik bilirubin ensefalopatisi 12

2.5. Tedavi Yöntemleri 13

2.5.1. Fototerapi: 13

2.5.2. Fototerapinin Ciddi Yan Etkileri: 15

2.5.3. Kan Değişimi: 16

2.6. Literatürdeki *in Vitro* ve *in Vivo* Hiperbilirubinemi Modelleri: 16

2.6.1. *In Vitro* Modeller: 16

2.6.2. *Ex-Vivo* Modeller: 17
2.6.3. *İn Vivo* Modeller: 18
2.7. Zebrabalığı Modeli: 20
2.7.1. Zebrabalığı Gelişim Aşamaları 20
2.7.2. Karaciğer Gelişimi ve aktivasyonu: 21
2.7.3. Gastrointestinal Sistem Gelişimi 22
2.7.4. Bilirubin metabolizmasında rol alan genler 23
2.7.5. Nörolojik bir model olarak zebrabalığı 25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 29
3.1. Araştırmanın Tipi 29
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı 29
3.4. Araştırmanın Değişkenleri 34
3.5. Veri Toplama Araçları: 35
3.8. Etik Kurul Onayı 37
4. BULGULAR 38
4.1. Erken dönem Zebra balığı larvalarının bilirubin maruziyeti: 38
4.2. Sinir dokularında bilirubin birikiminin kantitatif analizi: 44
4.3. Zebrabalığı larvasında hiperblirubineminin gelişimsel ve nörolojik etkileri 47
4.3.1. Vücut uzunluğu 48
4.3.2. Beyin ve göz gelişimi 49
4.3.3. Hiperbilirubineminin histoplatojik etkilerinin incelenmesi: 54
4.4. Zebrabalığı hiperbilirubinemi modelinde nörolojik işlevlerin test edilmesi: 64
4.4.1. Bakış kısıtlılığı testi 64
4.4.2. Serbest yüzme davranış testi 65

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 68
6. KAYNAKLAR 77
7. EKLER 92

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Bilirubin klirensinin azaldığı kalıtsal hastalıkların özellikleri..... 8
Tablo 2: ABE hastalık seyirlerindeki semptomlar 11
Tablo 3: Yüksek gelirli ülkerden elde edilen verilere göre kernikterus gelişme sıklığı 12
Tablo 4: Hiperbilirubinemi düzeyleri ve ABE hastalık seyrinin Zebrabalığıyla karşılaştırılması 69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hem-bilirubin metabolizması 3
Şekil 2: Bilirubin metabolizması şematik gösterimi 4
Şekil 3: Gilbert sendromu, Crigler Najjar Sendromlarında UGT1A1 enzim aktivitesinin karşılaştırılması 6
Şekil 4: Opistotonus fenotipi..... 11
Şekil 5: Fototerapi sonrası oluşan bilirubinin suda çözünen izoformları..... 14
Şekil 6: Zebrabalığı gelişim şeması gösterimi 21
Şekil 7: Karaciğer gelişim şeması gösterimi 22
Şekil 8: Gastrointestinal sistemin gelişim şemasının gösterimi 23
Şekil 9: Zebrabalığı gelişimsel döneminde hmox ve bvr gen ifadelerinin gösterimi 24
Şekil 10: Zebrabalıklarında ve insanlarda görülen hematopoez süreci..... 25
Şekil 11: Zebrabalığı ve insan beyin anatomilerinin karşılaştırmalı gösterimi..... 27
Şekil 12: Bilirubinin toksik etkilerinin zamana ve doza bağlı olarak gözlemlenmesi.. 39
Şekil 13: Bilirubinin nörotoksik etkilerinin zamana ve doza bağlı olarak gözlemlenmesi..... 40
Şekil 14: Bilirubine maruz kalan zebrabalığı larvalarının şiddetli fenotip prevelansı.. 41
Şekil 15: 4dpf'de bilirubin maruziyetinin zebrabalığı larva fenotipi üzerindeki etkileri 41
Şekil 16. 4 dpf larvaların beyin dokularında biriken bilirubin miktarının analizi. 45
Şekil 17. 3 dpf ve 5 dpf'de beyin dokularında bilirubin birikiminin analizi. 47
Şekil 18: Casper larvalarının vücut uzunluğunun 4dpf'de analizi..... 49
Şekil 19. Beyin ve göz kompartmanlarının genişliğinin analizi (4 dpf) 51
Şekil 20. Bilirubine maruz kalan larvaların beyninin görüntülenmesi ve beyin morfolojilerinin analizi..... 53
Şekil 21: Bilirubin uygulanan larvaların beyninin histopatoloji görüntüleri (yanal) . 56
Şekil 22: Bilirubin uygulanan larvaların beyninin histopatoloji görüntüleri (dorsal) 57
Şekil 23: Otik vezikül yapısının gösterimi. 58
Şekil 24: Bilirubin uygulanan larvaların otik veziküllerinin histopatoloji görüntüleri 59

Şekil 25: Bilirubin uygulanan larvaların karaciğerlerine ait histopatoloji görüntüleri.61
Şekil 26: Bilirubin uygulanan larvaların gastrointestinal sisteminin histopatolojik olarak incelenmesi..... 63
Şekil 27. Işık uyaran testi ile zebrabalığında bakış kısıtlılığının analizi..... 65
Şekil 28: Bilirubin nörotoksisitesine bağlı serbest yüzme davranışının analizi……. 66
Şekil 29: Otik vezikülün yakından gösterimi (O:otolitler ve S:saccule)..... 73
Şekil 30: Yenidoğan ve Zebrabalığının karşılaştırmalı gösterimi……75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Dpf: Döllenmeden sonraki gün (*Day post fertilization*)

BSA: Sığır serum albümini (*Bovine serum albumin*)

ABE: Akut bilirubin ensefalopatisi

UGT1A1: 5'-difosfo glukuronosiltransferaz 1A1 enzimi

MRP2: Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 2 (Multidrug resistance-associated protein 2)

ABCB1: ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı B1 (*ATP-binding cassette transporter B1*)

OATP: Organik anyon taşıma polipeptitleri (*Organic anion transporting polypeptides*)

TSB: Toplam serum bilirubin

MGV: Ortalama Gri Değeri (Mean Gray Value)

G6PD: Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (*Glucose-6-phosphate dehydrogenase*)

CN-I: Crigler Najjar Tip I sendromu

CN-II: Crigler Najjar Tip II sendromu

MARS: Moleküler emici devirdaim sistemi (*Molecular adsorbent recirculating system*)

M: Molar

µM: Mikromolar

µL: Mikrolitre

ml: Mililitre

mg: miligram

dL: desilitre

s: Saat

SEM: Standart Hata

N: Evren Büyüklüğü

n: Örneklem Büyüklüğü

P: P-değeri

nm: nanometre

ER: Endoplazmik Retikulum

ÖZGÜN BİR HİPERBİLİRUBİNEMİ MODELİNİN ZEBRABALIĞINDA GELİŞTİRİLMESİ

Ebru Önal, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler AD. Temel Sinirbilimler, 35340 Balçova-İzmir

ÖZET

Yenidoğan unkonjuge hiperbilirubinemisi, yüksek total serum bilirubin seviyesi ile karakterize olup, zamanında doğmuş bebeklerin % 60'ı,ve erken doğmuş bebeklerin ise neredeyse tamamında görülen yaygın bir sağlık sorunudur. Bilirubine maruz kalma miktarı ve süresine bağlı olarak olumsuz fizyolojik veya patolojik etkileri olabilir. Hastalığın şiddet düzeyine bağlı olarak letarji, beslenme sorunları, tonus değişiklikleri, ateş, apne, nöbet, koma ve hatta ölümle sonuçlanabilir. Hastalığın kronik formu olan Kernikterus ise bazal gangliyonlar ve beyin sapının etkilenmesine bağlı olarak yukarıya bakış kısıtlılığı, sensörinöral işitme kaybı, koreatetoid serebral-palsi ve diş minesi bozuklukları gibi ciddi işlev bozukluklar ile sonuçlanabilmektedir. Hiperbilirubinemi için mevcut tedaviler sorunun altında yatan nedenleri ele almak yerine bilirubinin nörotoksik etkilerini azaltmak için geçici çözümler sunmaktadır. Hiperbilirubinemi için tedavi yöntemlerinin yetersiz ve riskli olmasından dolayı yeni etkin yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Zebrabalığı gelişimsel nörotoksisite modelini oluşturmak için uygun bir model olabilir ve yenidoğan hiperbilirubinemisine yönelik olası tedavilerin ve hastalığın altında yatan mekanizmaların araştırılmasına olanak sağlayabilir. Zebrabalığı, çok sayıda yavru eldesi, görüntüleme ve manipülasyon kolaylığı ve larval dönemin yenidoğana benzer olması gibi avantajlar sunar. Ayrıca, larval dönemde kan beyin bariyerinin geçirgen olması, karaciğer enzimlerinin geç aktivasyonu, serumda bilirubin varlığı ve bilirubin mekanizmasında bulunan enzimlerin ortologlarının bulunması yenidoğan hiperbilirubinemi geliştirilmesine uygun bir organizma olduğuna işaret etmektedir. Ancak bugüne kadar zebrabalığında yenidoğan hiperbilirubinemi modeli geliştirilmemiştir. Bu çalışmada zebrabalığı larvası kullanılarak, yenidoğan hiperbilirubinemisi modellenmiş ve bu modelde gelişen

fenotipler ve nörotoksisite incelenmiştir. Araştırmamızda, bilirubine maruz kalan zebrabalığı larvalarında, beyinde ve ilgili dokularda bilirubin birikimini takiben ödem, doku hasarı, kaslarda morfolojik bozukluklar, letarji, tonus değişiklikleri, opistotonus ve bakış kısıtlılığı gözlemlenmiştir. Literatürde daha önce tanımlanmamış olan bu model sayesinde hastalığın altta yatan patogenezinin tanımlanması ve etkin tedavi seçeneklerinin ortaya konulması açısından yol gösterici olabilir.

Anahtar sözcükler: Yenidoğan, Hiperbilirubinemi, Akut bilirubin ensefalopatisi, Kronik bilirubin ensefalopatisi

DEVELOPMENT OF A UNIQUE HYPERBILIRUBINEMIA MODEL IN ZEBRAFISH

Ebru Önal, Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of Neurosciences. Basic Neurosciences, 35340 Balçova-İzmir

ABSTRACT

Neonatal unconjugated hyperbilirubinemia, characterized by high total serum bilirubin level, is a common health issue that presents as Jaundice in 60 % of term infants and almost all preterm infants. Depending on the developmental process, quantity and duration of bilirubin, harmful pathological or physiological effects may result. Lethargy, feeding issues, tone changes, fever, apnea, seizure, semi-coma, and even mortality can occur depending on the disease's severity. The chronic form of the disease, *Kernicterus*, affects the basal ganglia and brain stem, causing serious dysfunctions such as upward gaze limitation, sensorineural hearing loss, choreoathetoid cerebral palsy and tooth enamel disorders. Current therapies only provide short-term relief from the the neurotoxic consequences of bilirubin, instead of treating the root causes of hyperbilirubinemia. Due to the inadequate and dangerous treatment methods, new, effective treatments are required.

The zebrafish is a suitable model for constructing the developmental neurotoxicity model, that is also enables enables research into potential treatments for neonatal hyperbilirubinemia and the underlying causes of the condition. Zebrafish offer some advantages such as obtaining a large number of offspring, ease of imaging and manipulation, and similarity of the larval period to the newborn. Additionaly, a suitable organism for the development of neonatal hyperbilirubinemia is also indicated by the permeability of the blood-brain barrier during the larval stage, delayed activation of liver enzymes, the presence of bilirubin in the serum, and the presence of orthologs of enzymes involved in the bilirubin mechanism. However, to date, hyperbilirubinemia has not been modeled in zebrafish.

In this research, zebrafish larvae were used to mimic neonatal hyperbilirubinemia, and developed phenotypes and neurotoxicity were investigated in

this model. In our research, following bilirubin accumulated in the brain and tissues of zebrafish larvae that were exposed to the bilirubin, some consequences was oberved such as edema, tissue degeneration, moprhological defects in muscles, lethargy, tonus changes and limitaiton of upward gaze. According to this model, which has not been previously developed in the literature, it can serve as a guide for defining the disease's underlying etiology and revealing promising therapy approaches.

Key words: Neonatal, Hyperbilirubinemia, Acute bilirubin encephalopathy, Chronic bilirubin encephalopathy

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Hiperbilirubinemi, serumda bilirubin miktarının artması ile karakterize bir klinik durumdur. Hiperbilirubinemi gelişmesinin üç ana nedeni: bilirubin yapımının artması, karaciğerde konjugasyon ve klirensinin azalması ve artmış enterohepatik dolaşımdır.

Yenidoğan bebeklerde sıklıkla fizyolojik sarılık olarak kendini gösterir. Antioksidan özellikleri sayesinde hücre zarını koruyarak hücre savunmasında rol alır. Bazı durumlarda ortaya çıkan yüksek düzeylerdeki bilirubin patolojik sarılık olarak tanımlanır ve akut ve kronik bilirubin nörotoksisitesine neden olabilir. Akut durumda letarji, hipotoni veya hipertoni, opistotonus, retrokollis, ateş ve koma gibi nörotoksik bulgulara neden olabilir. Kronik durumda ise ciddi beyin hasarına bağlı olarak motor ve işitsel bozukluklar, yukarıya bakış kısıtlılığı, koreatetoid serebral-palsi ve diş minesi hipoplazisi gibi kalıcı sekellere yol açabilir.

Bebeklerin yaşamını ciddi şekilde etkileyen bu nörotoksik etkilerin önüne geçebilmek için fototerapi ve kan transfüzyonu gibi tedavi yöntemleri kullanılıyor olsa da bu tedavi yöntemleri geçici çözüm sunar ve olası bazı riskleri barındırmaktadır. Bu nedenle, yeni tanı ve tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır. Zebrabalığı (*Danio rerio*) gelişimsel nörotoksisite modelini oluşturmak için uygun bir model olabilir. Literatürde zebrabalığında geliştirilen bir hiperbilirubinemi modeli bulunmamaktadır. Geliştirilen bu model sayesinde bilirubinin neden olacağı nörotoksik etkileri önlemek için yeni tedavi stratejileri geliştirilebilir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada, zebrabalığı nörotoksisite modeli kullanılarak hastalık mekanizmaların anlaşılması ve yeni tedavi yöntemlerinin *in vivo* koşullarda test edilmesi amaçlanmıştır. Zebrabalığı, rodent modellere göre daha basit sinir sistemine sahip olması, gelişen memeli beynine ait aşamaların gözlemlenmesi, beyin bölgelerinin ve hücre tiplerinin korunmuş olması, spontan yüzme/irkilme tepkileri ve öğrenme gibi birçok nörodavranış göstermeleri nörotoksisite araştırmalarının yapılmasına fırsat sağlamaktadır. Zebrabalığının pigmentsiz yapısından faydalanmak

için Casper hattı kullanılarak, karaciğer ve bağırsak organ gelişimlerinin devam ettiği ve kan-beyin bariyer yapısını oluşturan sıkı bağlantıların henüz gelişmediği 48-72-96 saatleri arasında bilirubin uygulanması amaçlanmaktadır. Bu modelde bilirubin düzey ve maruziyet süresine bağlı olarak bilirubinin biriktiği dokuların tespit edilmesi, morfolojilerinin incelenmesi ve sonuç olarak gelişebilecek bilirubin nörotoksisitesinin neden olabileceği davranış sorunlarının test edilmesi yolu izlenmiştir.

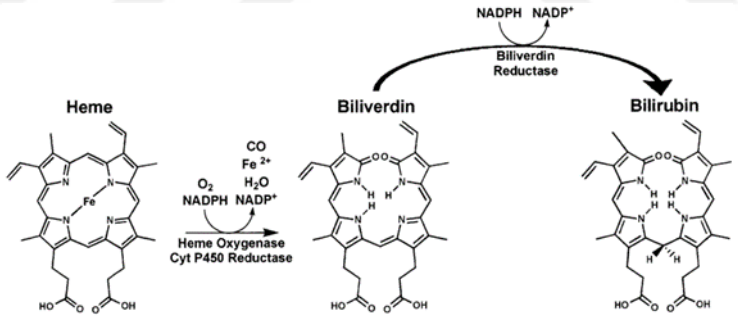
1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Zebrabalığının koryon zarından çıktıktan sonraki gelişimsel döneminde 120. saate kadar yenidoğan dönemine eşdeğer olabileceği düşünülmektedir. Bilirubin metabolizması için önemli olan karaciğer ve bağırsak organogenezinin henüz tamamlanmadığı 48-72-96 saatleri arasında bilirubinin karaciğerde metabolize edilememesine ve bağırsak sisteminden atılamamasına bağlı olarak bilirubinin vücutta birikeceği hipotezi kurulmuştur. Vücutta biriken bilirubinin kan beyin bariyerini geçerek beyinde birikmesiyle nörotoksisiteye sebebiyet vereceği öngörülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

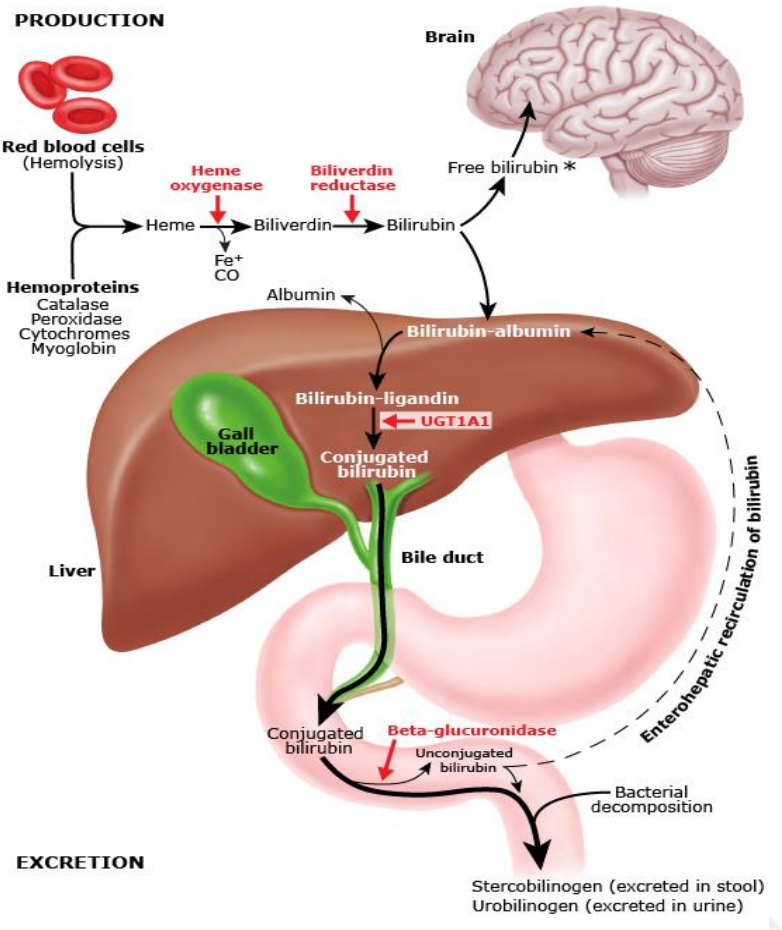
2.1. Bilirubin

Bilirubin, eritrosit yıkımı sonucunda oluşan bir son üründür. Eritrositlerin parçalanması ile açığa çıkan hemoglobinin yıkımı ile hem açığa çıkar, hem oksijenaz ve biliverdin redüktaz enzimleri aracılığıyla bilirubine indirgenir (Şekil 1 ve 2). Yenidoğanlarda eritrosit miktarı fazla ve ömrü kısadır. Zamanında doğmuş yenidoğanlarda bilirubin seviyesi ortalama 5-6 mg/dL (86-103 µmol/L) olup "fizyolojik sarılık" olarak adlandırılır (1, 2). Bu durumda, serum bilirubinin antioksidan özelliği nedeniyle hücre zarını koruyarak hücre savunmasında rol aldığı yapılan araştırmalarda ortaya konulmuştur. Fizyolojik koşullarda doğal bir antioksidan olup hidroksil radikallerin yol açtığı lipit peroksidasyonu önleyerek hücre zarı stabilitesini koruyabilir ve böylece apoptozu önleyebilir. Bunlara ek olarak ROS'a etki ederek oksidatif hasarı ve oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önüne (3, 4). Ayrıca, yenidoğan bebeklerde immün sistemde yer alan yardımcı T hücrelerine etki ederek Th2 bağışıklık sinyalinin Th1'e dönüşmesine yardımcı olabilir (5).



Şekil 1. Hem-bilirubin metabolizması (3)

Bilirubinin patolojik düzeylere ulaşması sonucunda nörotoksik etkiler ortaya çıkabilir. Bilirubinin toksik etkilerinin anlaşılması için mekanizmalarının ayrıntılı olarak araştırılması önemlidir.



Şekil 2: Bilirubin metabolizması şematik gösterimi (6)

Suda çözünemeyen bir molekül olan bilirubin serumda serum albümin proteinine bağlı olarak dolaşım sistemi ile karaciğere taşınır. Karaciğerde hepatositlere, Organik Anyon Transport Proteinleri (OATP1B1ve OATP1B3) sayesinde aktif transport ile gerçekleşir (7). Unkonjuge bilirubin karaciğerde glutatyon-s-transferaz proteinlerine tutunur ve 5'-difosfo glukuronosiltransferaz 1A1 (UGT1A1) enzimi bilirubini glukuronik asite konjuge ederek suda çözünürlüğü yüksek olan bilirubin mono- ve diglukuronit asite dönüştürür (8). Bu konjuge formlar, MRP2 tarafından aktif transport ile safraya taşınarak gastrointestinal sisteme geçer (Şekil 2).

Erişkinlerde bağırsakta ki bakteriyel enzimler tarafından ürobilin ve sterkobiline indirgenirken, yenidoğan bebeklerin bağırsak floralarının yetersiz olması nedeniyle atılımı yeterli olmaz. Ayrıca, yenidoğanın bağırsak mukozasındaki yüksek

beta-glukuronidaz enzim aktivitesi nedeniyle dekonjuge edilerek dolaşıma tekrar katılır (Şekil 2) (9, 10).

2.2. Hiperbilirubinemi

Hiperbilirubinemi total serum bilirubin seviyelerinin artması sonucu gelişen bir durumdur. Zamanında doğmuş (term) bebeklerde %60 oranında görülürken erken doğmuş bebeklerin neredeyse tamamında görülür (11). Bilirubin metabolizmasında meydana gelen fizyolojik veya patolojik sorunlar nedeniyle toplam serum bilirubin (TSB) seviyesinin normal seviyenin (5-6 mg/dL veya 86-103 μmol/L) üzerine çıkması durumunda ise yenidoğan hiperbilirubinemisi gelişebilir.

Yenidoğan bebeklerde serum bilriubin seviyeleri hızla değiştiği için bu serum bilirubin seviyeleri bebeğin doğum zamanına (term veya preterm), risk faktörlerinin (enfeksiyon, kan grubu uyuşmazlıkları, enzim eksiklikleri, genetik faktörler gibi) olup olmamasına bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Bilirubin seviyesinin 17 mg/dL'yi geçmesi durumunda ise hastalık belirtileri gösteren "**patolojik sarılık**" görülmektedir (1, 2). TSB seviyesinin ciddi artışı sonucu ise bilirubin kan beyin bariyerini geçebilir. Bilirubin nörotoksisitesi gelişerek, "**akut bilirubin ensefalopatisi**" ve "**kronik bilirubin ensefalopatisi (kernikterus)**" olarak adlandırılan beyin hasarlarına yol açabilir (12). Hiperbilirubineminin neden olacağı erken ve uzun dönemdeki nörolojik problemlerin önlenmesi ve uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla uygun modellerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

2.3. Hiperbilirubineminin (Sarılık) Nedenleri

Yenidoğanlarda bilirubin metabolizmasında ortaya çıkan bazı sorunlar (bilirubin yapımının artması, konjugasyonun yetersizliği veya artmış enterohepatik dolaşım gibi) serbest bilirubinin artmasına ve nörotoksisiteye neden olmasına yol açabilir (7, 13, 14).

Hiperbilirubineminin ortaya çıkmasındaki 3 temel sorun detaylı bir şekilde açıklanmıştır:

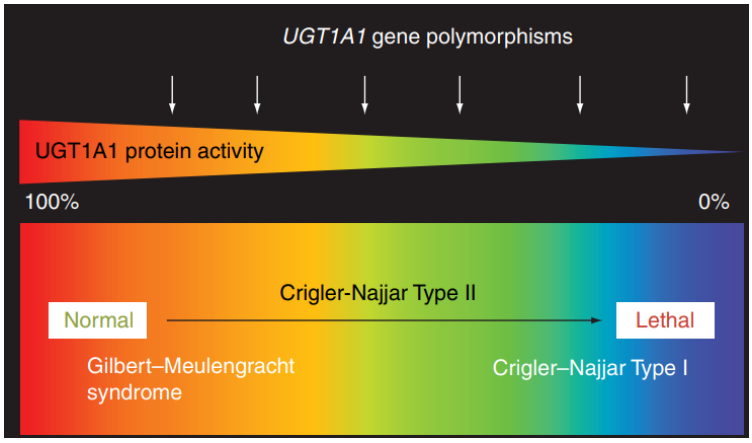
I. Bilirubin Yapımının Artması

Klinikte unkonjuge hiperbilirubineminin en yaygın nedeni hemolitik hastalık süreçlerine bağlı olarak artan bilirubin üretimidir. ABO/Rh kan uyuşmazlığından ortaya çıkan izoimmün aracılı hemoliz, kırmızı kan hücrelerinde görülen kalıtsal sorunlar, eritrosit enzim kusurları (G6PD eksikliği), sepsis veya yenidoğanlarda kırmızı kan hücrelerinin artması sonucu bilirubin yapımı artar (15, 16, 17). Bu artışa bağlı olarak serbest bilirubinin dokulara geçişi ve birikimi artmaktadır. Karaciğer işlevi normal olan bireylerde bilirubin seviyesi normalleştirilebilirken, yenidoğanlarda karaciğer işlevlerinin tam kapasite çalışamamasına bağlı olarak şiddetli düzeyde hiperbilirubinemi gözlemlenebilir (2).

II. Bilirubin Klirensinin Azalması

Bilirubinin glukuronik asit ile konjügasyonununu sağlayan UGT1A1 enzim aktivitesindeki düşüş ya da aktivite kaybı sonucunda bilirubin konjugasyonunun azalır. Bunun sonucunda hepatik bilirubin klirensi azalır ve toplam serum bilirubin düzeyini artar (18).

UGT1A1 geninde aktivite azaltan polimorfizm veya mutasyonlara bağlı olarak ömür boyu hiperbilirubinemi oluşmasına neden olan kalıtsal anomaliler aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır (19).



Şekil 3: Gilbert sendromu, Crigler Najjar Sendromlarında UGT1A1 enzim aktivitesinin karşılaştırılması (20)

Crigler-Najjar sendromunda, UGT1A1 genindeki ekson bölgelerinde gerçekleşen mutasyonlar sonucu gelişen otozomal çekinik bir hastalık olup tip I ve tip II olarak ikiye ayrılmaktadır (21).

Tip I Crigler-Najjar sendromu (CN-I), genellikle UGT1A1 geninde bulunan 2-5 ekson bölgelerinde önemli aminoasit dizilerinin silinmesi sonucu ortaya çıkan bir durumdur (Şekil 3 ve Tablo 1). Ek olarak, intronda meydana gelen mutasyonlar, çerçeve kaymaları (frameshifts) veya sonlanma kodonu (stop codon) ile sonuçlaranarak belirtilen hastalığın ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu hastalıkta, UGT1A1 enzim aktivitesi görülmemesine bağlı olarak doğumdan sonraki 2-3 gün içerisinde şiddetli hiperbilirubinemi görülür. Karaciğer nakli yapılmadıkça bilirubin kaynaklı nörolojik işlev bozukluğunun (BIND) gelişimini önlemek için ömür boyu fototerapi gereklidir. Müdahale edilmediği takdirde, nöbet, kasların gerilmesi sonucu gövdenin geriye doğru kıvrılması (opistotonus) ve şiddetli nörotoksisite sonucu ölüme sebebiyet verebilir (2).

Tip II Crigler-Najjar sendromu ise (CN-II), genellikle tek bir amino asiti etkileyen nokta mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (Şekil 3 ve Tablo 1). Literatürde 113 varyant tespit edilmiştir: UGT1A1*1-UGT1A1*113 (22). UGT1A1 enzim aktivitesi normalin altında (%10'undan az) görülmektedir ancak enzim aktivitesini tamamen ortadan kaldırmayan orta şiddette hiperbilriubinemiye neden olan bir hastalıktır (23, 24). Sadece yenidoğan döneminde fototerapiye ihtiyaç duyarlar ve hayatlarının geri kalanından tedaviye gereksinim duymadan normal yaşantılarına devam edebilirler (12).

Gilbert sendromu, UGT1A1 geninde görülen homozigot veya bileşik heterezigot (bir lokusta iki farklı resesif alel) mutasyonlar sonucu gelişen otozomal çekinik bir hastalıktır (Şekil 3 ve Tablo 1). Etnik gruplara göre mutasyonlar değişiyor olup 100'den fazla farklı mutasyon olduğu bilinmektedir. Bunlardan en yaygın olanı UGT1A1*28 olarak bilinen, promotör bölgesinde bulunan TATAA kutu dizisinde iki bazın (TA) homozigot polimorfizmidir (12). Bu mutasyona sahip olan bireylerde UGT1A1 enzim aktivitesi %10-30 aralığında olup bilirubin metabolizmasının azalmasına neden olur. Bunun sonucunda, orta derecede hastalık seyri gösteren

unkonjuge hiperbilirubinemi gözlemlenir (25). Başka hemolitik hastalıkları yoksa genellikle tedaviye ihtiyaç duymadan yaşamlarını sürdürebilirler (12).

Tablo 1: Bilirubin klirensinin azaldığı kalıtsal hastalıkların özellikleri (12)

Kalıtsal Hastalıklar	Kalıtım	Hastalığın ortaya çıktığı dönem	Hiperbilirubinemi Tipi ve Derecesi	Tedavi
Gilbert sendromu	Otozomal resesif	Erken yetişkinlik	Unkonjuge; düşük-orta seviye	Genellikle tedavi gerekmez; yenidoğan döneminde özellikle hemolitik bozuklukta fototerapi;nadiren ilaç
CN-I	Otozomal resesif	Yenidoğan	Unkonjuge; şiddetli	Agresif fototerapi; kan değişimi; Karaciğer nakli
CN-II	Otozomal resesif	Yenidoğan	Unkonjuge; orta-şiddetli	Yenidoğan döneminde fototerapi; ilaç

III. Bilirubinin Artmış Enterohepatik Dolaşımı

Enterohepatik dolaşımda artan bilirubine bağlı olarak gelişen hiperbilirubineminin nedenleri; erken ve geç anne sütü sarılığı ve anatomik veya değişik nedenlere bağlı olarak intestinal sistemdeki obstrüksiyonlardır. Erken anne sütü sarılığı anne sütünün yetersizliğine, geç anne sütü sarılığı ise bazı annelerin sütünde yer alan faktörlere (FFA, pregnandiol, beta-glukuronidaz, EGF gibi) bağlı olarak gelişir.

Geç anne sütü sarılığı, süt yoluyla bebeğe geçen artan bilirubin miktarına bağlı olarak yaşamın ilk 3-5 gününden sonra gelişir, ve fizyolojik hiperbilirubineminin 2-3 haftadan uzun sürmesi sonucu anne sütü sarılığı olduğu doğrulanır (26, 27).

Erken anne sütü sarılığında, yetersiz süt alımına bağlı artan bilirubin, doğumdan sonraki ilk hafta boyunca sıklıkla görülen emzirmedeki sorunlardan kaynaklı olarak ortaya çıkan bir durumdur. Bu sorunlar, yetersiz kalori ve sıvı alımına bağlı olarak bebeklerde kilo kaybına neden olur. Bunun sonucunda hiperbilirubinemi ve bazı durumlarda sodyum hemostaz bozukluğu ortaya çıkar. Yetersiz beslenmeye

bağlı olarak bilirubin eliminasyonu azalacağından bilirubinin enterohepaitk dolaşımı artar ve böylece kanda serbest bilirubin seviyesi artar (28, 30).

Bağırsak tıkanıklığı (ileus), bağırsaklardaki besinlerin atılımının gerçekleşememesine bağlı olarak artan enterohepatik dolaşım ile hiperbilirbineminin görüldüğü bir durumdur (29).

2.4. Bilirubinin Neden Olduğu Nörolojik Hastalıklar:

Şiddetli neonatal hiperbilirubinemi sonucu, serbest bilirubinin kan-beyin bariyerini aşarak beyin dokusuna geçtiği durumda bilirubin nörotoksisitesi ortaya çıkar. Bilirubin nörotoksistesi birçok epidemiyolojik faktöre bağlı olarak değişiklik gösterdiği için hastaların insidansı net olarak bilinmemektedir. Zamanında ve erken dönemde yenidoğanlarda, şiddetli hiperbilirubinemi (TSB≥30mg/dL) görülme sıklığı yaklaşık olarak %10-30 olarak rapor edilmiştir (21, 32).

Bebeklerde ve çocuklarda bilirubin nörotoksisitesine bağlı olarak genellikle okülomotor ve işitsel işlevler için önemi olan bazal gangliyonlar ve beyin sapı gibi beyin bölgeleri etkilenir (33). Nöral dokularda bilirubin birkimi sonucunda beyin hücrelerinin moleküler ve hücresel boyutta zarar görmesi sonucu hücre ölümü gözlemlenir (34).

Klinik spektrum

Bilirubin nörotoksisitesi sonucu hafif semptomlardan ciddi sakatlıklara kadar şiddeti değişen çeşitli nörolojik bozukluklar görülebilir (33). Kernikterus, bilirubin nörotoksisitesinin en şiddetli formudur ve ortaya çıktığı durumda oküler felçler, koreatetoit serebral palsi, ve sensörinöral işitme kaybı gibi kalıcı nörolojik sekeller gözlemlenir (34). Bilirubin nörotoksisitesinden daha az etkilenen yenidoğanlarda ise (TSB<25mg/dL), bilişsel gecikmeler, konuşma ve dil becerilerinde azalma, yürüme bozuklukları, sensorinöronal işitme kaybı, görsel kortikal yolaklarda sorunlar gibi daha hafif klinik nöromotor semptomlar gözlemlenir (35, 36, 37, 38).

2.4.1. Akut Bilirubin Ensefalopatisi

Akut Bilirubin Ensefalopatisi (ABE), yenidoğanlarda görülen şiddetli hiperbilirubinemide görülen nörotoksik etkilerin akut olarak gözlemlenmesidir.

Hastalık gelişme oranları

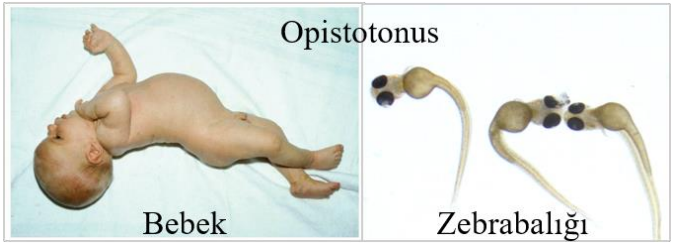
Yüksek gelirli ülkelerden elde edilen verilere göre 100.000 doğumdan 0,5-1 oranında ABE geliştiği raporlanmıştır. Toplam serum bilirubin seviyelerinin TSB> 30 mg/dL olduğu gözlemlenen yenidoğanlarda, bildirilen ABE oranlarının % 2-10 arasında olduğu raporlanmıştır (31, 32, 39). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir kohort çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, 1995-2011 yılları arasında yenidoğanlarında %0,01'inde TSB seviyesi >30mg/dL olarak gözlemlenmiştir (31). Danimarka'da yapılan bir çalışmaya göre ise TSB > 30mg/dL olan yenidoğanların %2'sinde ABE geliştiği gözlemlenmiştir. Şiddetli ABE gözlemlenen üç hastada TSB seviyelerinin 38-57.7 mg/dL aralığında olduğu ve kernikterus geliştiği raporlanmıştır (32, 40). Birleşik Krallık ve İrlanda'da yapılan başka bir popülasyon temelli çalışmada, TSB > 30mg/dL olan yenidoğanların %13'ünde ABE geliştiği gözlemlenmiştir (39).

Düşük gelirli ülkelerde, kısıtlı kaynağa sahip olan sağlık sistemlerinden kaynaklı olarak hastalık riski daha yüksek olabilir. Mısır'dan elde edilen vaka sonuçlarına göre, yenidoğanların %18'inde orta ve şiddetli seviyelerde ABE gözlemlenirken %22'sinde hafif seyreden ABE gözlemlenmiştir (41). Türkiye de yapılan bir araştırmaya göre ise, şiddetli hiperbilirubinemi görülme sıklığının 100.000 canlı doğumda 191 olduğu rapor edilmiştir. ABE görülme sıklığı ise, 100.000 canlı doğumda 71 olduğu tahmin edilmektedir (42).

Klinik özellikler

ABE tipik olarak üç fazda ilerler (33) :

***Hafif*:** Bu aşamada, klinik belirtiler belirgin olmayabilir. Bebek uykulu olabilir ancak uyandırılabilir ve uyandırıldığında hafif/orta derece hipotoni gözlemlenebilir. Bu aşamada ABE'yi teşhis etmek zordur (Tablo 2).



Şekil 4: Opistotonus fenotipi

Orta: Erken dönemde müdahale edilmediğinde hiperbilirubinemi ilerleyerek orta düzeye ulaşır ve kalıcı aşamaya ilerler. Yenidoğanda, uyuşukluk, ateş ve emme de azalma veya fazla artış gözlemlenebilir. Kas tonusunun arttığı retrokollis ve opistotonus olarak adlandırılan hafif/orta seviyede hipertoni gelişebilir (Şekil 4 ve Tablo 2). Bu aşamada kan transfüzyonu yapılarak bilirubin nörotoksisitesinin kalıcı etkilerinin önüne geçilebilir.

Ağır: Hiperbilirubineminin çok ilerlediği durumda, retrokollis ve opistotonus gibi hipertoni durumları, beslenmede güçlük, apne, ateş, nöbet ve koma gözlemlenebilir. Solunum yetmezliği veya inatçı nöbetler nedeniyle ölüm meydana gelebilir (Tablo 2).

Tablo 2: ABE hastalık seyirlerindeki semptomlar (33)

Hafif seyir	Orta seyir	Ağır seyir
• Letarji • Hipotoni	• Letarji • Hipertoni • Retrokollis ve Opistotonus • Beslenmede artış veya güçlük • Ateş	• Hipertoni • Retrokollis ve Opistotonus • Beslenmede güçlük • Apne • Ateş • Nöbet • Koma • Ölüm

2.4.2. Kronik bilirubin ensefalopatisi

Kernikterus diye de bilinen kronik bilirubin ensefalopatisi, şiddetli hiperbilirubinemide görülen nörotoksik etkilerin kronikleştiği ve kalıcı beyin hasarına neden olduğu durumdur.

Danimarka, Kanada, İsveç ve ABD gibi yüksek gelirli ülkelerde, oran olarak 100.000 yenidoğan bebekten 0,4-2,3'ünün kernikterus olduğu bildirilmiştir (43, 44, 45, 46, 47).

Tablo 3: Yüksek gelirli ülkerden elde edilen verilere göre kernikterus gelişme sıklığı

Total serum bilirubin seviyesi	Görülme sıklığı
20<TSB≤25 mg/dL (342-428 µmol/L)	Son derece nadir
25<TSB≤30mg/dL (428-513 µmol/L)	Yaklaşık olarak %5'inde
30<TSB≤35 mg/dL (513-599 µmol/L)	Yaklaşık olarak % 10-25
35 mg/dL <TSB (599 µmol/L)	Hemen hemen tüm bebeklerde

Yenidoğanlarda hiperbilirubinemi olduğu durumda kernikterus gelişme riski hiperbilirubineminin seviyesine ve süresine bağlıdır. Yüksek gelirli ülkelerden elde edilen bilgilere göre Tablo 3'de kernikterus gelişme oranları rapor edilmiştir (46, 48, 49).

Tedavi yöntemlerinin uygulanmaya başlandığı 1950-1970 yılları sonrasında kernikterus'un nörotoksik sonuçları azaltılmış olsa da kernikterus vakalarının önüne tamamen geçilememiştir (50). Bilirubin taraması yapılmaya başlandıktan sonra ise vaka sayılarında azalma olsa da kernikterus geçiren bebeklerde hala ölüm riski vardır. ABD'de 1979-2006 arasında kernikterus gelişmesi sonucu 31 ölüm rapor edilmiştir (51, 52).

Klinik Özellikler

Kernikterus genellikle doğumdan sonraki ilk iki yıl içinde gelişmektedir (33, 53). Kernikterusun şiddeti, beynin serbest bilirubine maruz kalma miktarına, süresine ve gelişimsel zamanlamasına bağlı olarak değişmektedir (54). Klinikte, yukarıya bakış kısıtlılığı, koreotetoid serebral palsi (duruş ve hareket ile ilgili sorunlaar), işitsel nöropatiye bağlı olarak sensörinöral işitme kaybı ve diş minesi hipoplazisi (az gelişimi) gibi bazı fenotipik etkiler görülmektedir (55).

Bilişsel işlev genel olarak korunsa da ciddi nörolojik etkiler gözlemlenebilir. Beyinde, okülomotor ve işitsel fonksiyonların bazal gangliyonları ve beyin sapı çekirdekleri büyük ölçüde etkilenir. Manyetik rezonans kullanılarak alınan beyin görüntülerinden elde edilen verilere göre beyin sapı, serebellum ve hippokampal beyin bölgelerinde işlev bozuklukları gözlemlenmiştir (56, 57).

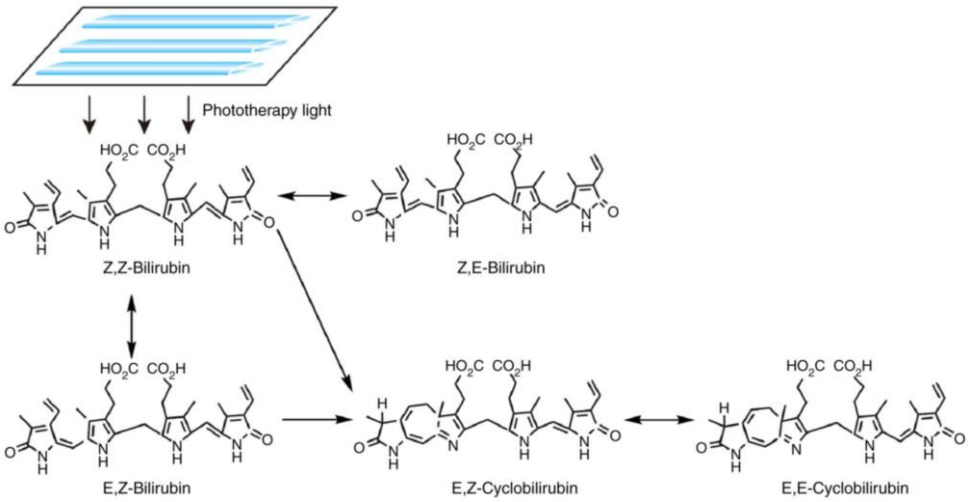
Kernikterus gelişen bebeklerin birçoğu yenidoğan döneminde akut bilirubin ensefalopatisinde rapor edilen benzer belirtileri göstermiştir. İlginç bir şekilde, akut bilirubin ensefalopatisi görülmeyen veya hafif görülen bebeklerde de kernikterus geliştiği rapor edilmiştir (58, 59).

2.5. Tedavi Yöntemleri

Unkonjuge bilirubinin sinir sisteminde neden olduğu ciddi hasarı önlemek için erken teşhis ve zamanında müdahale çok önemlidir. Başlıca tedavi yöntemleri fototerapi ve kan değişimidir. Ek olarak adjuvan tedaviler ise; intravenöz immunoglobulin, karaciğer enzim indükleyicileri ve enterohepatik dolaşımı azaltan ama klinik rutin kullanıma girmeyen stratejilerdir.

2.5.1. Fototerapi:

Fototerapi birçok ülkede yenidoğan sarılığını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan, yenidoğan bebeklerinin cildini mavi-yeşil spektrumdaki (460-490 nm) ışığa maruz bırakma işlemidir (60, 61).



Şekil 5: Fototerapi sonrası oluşan bilirubinin suda çözünen izoformları (60)

Fototerapide, 460-490 nm dalgaboyundaki ışığa maruz bırakılan bebeklerde bulunan yüksek seviyelerdeki bilirubin, suda çözünen izomerlerine dönüşerek bebekteki toksik etkilerın azaltılması amaçlanmaktadır (Şekil 5). Bu sayede bilirubin idrar ve dışkı yoluyla vücuttan bir miktar uzaklaştırılabilir (60, 61)**.**

Fototerapi, tedavi için başvurulan kolay ve etkin bir yöntem olarak bilinse de, yapılan son çalışmalar ile fototerapinin derinin koruyucu tabakasını tehlikeye atabileceği ve ciddi olumsuz reaksiyonlara sebebiyet verebileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalara göre akut yan etkiler ve fototerapi sonrası geç ortaya çıkan yan etkiler rapor edilmiştir. Akut yan etkiler, sirkadiyen ritim değişikliği, dehidrasyon, hipokalsemi, döküntü, bronz bebek sendromu, hemoliz, hemodinamik sorunlar ve retinal hasardır (62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69).

Fototerapi sonrası bilirubin seviyesinin düşmesi sonucu ise; hücre zarının koruyucu sistemi etkilenebilir, serbest oksijen radikallerinin üretimi tetiklenebilir, ve cilteki sitokinlerin etkilenmesiyle Th2'den Th1'e geçişte sorunlar yaşanabilir ve bunun sonucu alerjik hastalıklar ortaya çıkabilir (60). Buna ek olarak DNA hasarı, tümör ve bebek ölümleri gibi çok ciddi yan etkilerinde görüldüğü bilinmektedir (60, 70).

2.5.2. Fototerapinin Ciddi Yan Etkileri:

DNA hasarı

Fototerapide kullanılan mavi-yeşil ışığa maruz bırakılan kandaki lenfosit hücre DNA'sında mutasyonların görülmesi fototerapi kaynaklı DNA hasarı riskine işaret etmektedir (70). Fototerapi uygulanana bebeklerde antioksidan mekanizmasının henüz gelişmemiş olmasına bağlı olarak serbest oksijen radikallerinin oluşumunun tetiklendiği ve bunun çekirdek ve mitokondri DNA'sını etkileyebileceği gösterilmiştir (67). Yapılan bir başka araştırmaya göre ise, fototerapi uygulandıktan sonra tümör baskılayıcı ve apoptozu indükleyen p53 gen ifadesinin arttığı gösterilmiştir (71). Ayrıca, apoptozun ve DNA hasarının, apoptozu inhibe eden BCL-2 gen ifadesinin azaltılması ve apoptozu tetikleyen BAX gen ifadesinin artması ile bağlantılı olabileceği gösterilmiştir (60, 70).

Kanser:

Fototerapi ayrıca kanser riskini arttırabilir ve ileriki yaşlarda kanserin ortaya çıkması ile sonuçlanabilir (72). Fototerapi uygulanan ve uygulanmayan çocuklarda yapılan bir araştırmaya göre, fototerapi alanlarda katı tümör gelişme olasılığının daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır (73). Başka bir çalışmada ise lenfotik olmayan löseminin görülme sıklılığının arttığı bir retrospektif kohort çalışmada gösterilmiştir ancak çok fazla değişken olmasından kaynaklı olarak elde edilen sonuçlar doğrulanamamıştır (74). Buna ek olarak, fototerapinin nevüs (ben) oluşumunu arttırabileceği ve bunun melanom oluşumunu teşvik edebileceği düşünülmektedir Bu nedenle fototerapi sırasında ciltte meydana gelen benler dikkatli olarak takip edilmeli ve melanom gelişip gelişmediği incelenmelidir (75).

Ölüm

Fototerapinin yan etkilerinin araştırılması sonucu farklı miktarlarda fototerapi uygulanan bebekler kıyaslandığı zaman aralarında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak düşük kilolara sahip olan bebekler kıyaslandığı zaman şiddetli fototerapi gören bebeklerde ölüm gözlemlenmiştir. Bu nedenle fototerapi

süresinin artması ve buna bağlı olarak oksidadif stresin indüklenmesi sonucu bebek mortalitesinin etkilenebileceği düşünülmektedir (76, 77).

2.5.3. Kan Değişimi:

Fototerapinin yetersiz kaldığı, hızla artan bilirubin seviyelerinin gözlemlendiği ve akut bilirubin ensofalopati belirtilerinin olduğu durumlarda kalıcı hasarın önüne geçmek için kan değişimi yapılması gerekmektedir. Bu yöntem ile vücutta sarılığa neden olan bilirubini azaltmak için, bebeğin kanı ile donörün kanının değişimi sağlanır (78). Ancak bebeklerde ciddi yan etkilere sebebiyet verebilir. Yan etkilerin gelişme oranları her çalışma için farklılık gösterse de %15-74 aralığında olduğu gösterilmiştir (79, 80). Bunlar; elektrolit dengesizliği, hava embolisi, portal ven trombozu, kardiyak aşırı yükelenme, sepsis, nekrotizan enterokolit ve hatta ölüm gözlemlenebilir (81).

2.6. Literatürdeki *in Vitro* ve *in Vivo* Hiperbilirubinemi Modelleri:

Hiperbilirubinemi için daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve biyobelirteçlerin keşfedilmesi için, hastalığın ortaya çıkışı ve ilerleyişinin mekanizmalarını anlamak önemlidir.

2.6.1. *In Vitro* Modeller:

Yapılan çalışmalarca unkonjuge bilirubine maruz bırakılan primer ve immortalize hücre hatlarındaki nörotoksik etkiler incelenmiştir. Yapılan çalışmalarca, bilirubinin toksik etkilerini araştırmak için nöronal fonksiyon ve farkılaşmanın, sitotoksisitenin, ER stresinin ve enflamasyonun araştırılması için insan farklılaşmamış SH-SY5Y nöroblastom hücresi, farklılaşmış GI-ME-N nöronal hücresi ve U87 astrositom hücreleri kullanılmıştır (82, 83). Bilirubin toksisitesine bağlı olarak DNA hasarı, oksidatif stres, otofaji, ve bilirubinin temizlenmesi sürecindeki çeşitli mekanizmalar *in vitro* da araştırılmıştır (84).

Sıçan ve fareden alınan nöron, astrosit, mikroglia ve oligodentritler gibi primer hücre hatları kullanılarak hiperbilirubinemi nörotoksisitenin araştırılması amaçlanmıştır (84). Yapılan bir çalışmada Primer hipokampus nöron hücreleri

kullanılarak bilirubin toksisitesinin nöron hücrelerindeki etkisi araştırılmıştır. Bilirubin maruziyeti sonucunda bazı morfolojik, biyokimyasal/metabolik ve moleküler değişimler gözlemlenmiştir: akson ve dendtrilerde azalma, oksidasyon artışı, mitokondriya işlevi bozukluğu ve detoksifikasyon, inflamasyon ve aktif taşıma gibi koruma mekanizmalarında görev alan yapıların ifadelerinin artışları gibi değişimler örnek verilebilir (85). Ayrıca farklılaşmış yaşlı nöron hücre tiplerinin, daha az farklılaşmış hücrelere kıyasla bilirubinden daha az etkilendiği de yapılan bir başka çalışma sonucu elde edilen bilgiler arasındadır (86).

Birkaç çalışmadan elde edilen bulgulara göre kernikterustan etkilenen hastalar ile bilirubine maruz kalan hayvan modelleri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda, bilirubin toksisitesinin beynin belirli alanlarına etki ettiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin; farklı nöron hücrelerinin bilirubini dokulardan temizleme kapasitelerinin ve farklılaşma düzeylerinin farklı olması olarak düşünülse de bunun sebebi tam olarak anlaşılamamıştır (87, 88). In vitro da yapılan bu çalışmalar hücrenin doğal ortamındaki koşulları tamamen sağlayamadığı için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin ve hücreler arası iletişimin incelenmesi sınırlıdır, ve hücrelerin sınırlı yaşam süreleri ve kontaminasyon riskleri gibi bazı dezavantajları vardır (84).

2.6.2. ***Ex-Vivo* Modeller:**

Ex-vivo olarak adlandırılan, izole edilmiş dokunun in vitro ortamda büyütüldüğü organotipik kültürlerde hiperbilirubinemi modellemesi yapılmıştır. Beynin hipokampus bölgesinden alınan kesitler kullanılarak yapılan deneylerde bilirubin nörotoksisitesi araştırılmıştır. Nörotoksistede en büyük etmenin mikrogliaların etkilenmesi olduğu ve bilirubinin sinaptik plastisiteyi bozduğu ortaya konmuştur (89, 90). Başka bir araştırmadan elde edilen bulgulara göre hipokampustan türetilen organotipik kültüler, serebelluma kıyasla bilirubine karşı daha hassastır (91). Olgunlaşmamış kesitler bilirubine daha dirençlidir (89). Ancak bu bulgular *in vivo* ve *in vitro*'dan elde edilen sonuçlar ile tutarsızdır (84, 92). Bu tür tutatsızlıklar, hiperbilirubinemi hastalığının *ex-vivo* olarak modellenmesinin önünde sorun teşkil etmektedir.

2.6.3. *İn Vivo* Modeller:

İn vivo modeller fizyolojik koşulları ve doku mikro ortamı barındırması ile insanda gerçekleşen metabolik süreçlerine taklit edilme imkanı sunar. İn vitro çalışmalarda kültür ortamının sınırlılıklarından kaynaklı olrak hiperbilirubinemimin modellenmesinde patolojik ve fizyolojik süreçleri daha iyi anlamak için *in vivo* modellere ihtiyaç vardır (84).

Genetik in vivo modelleri:

Mutant Wistar sıçanlarından doğan, genetik olarak UGT1A1 geninin 4. eksonunda meydana gelen homozigot mutasyona (doğal olarak meydana gelen mutasyon) sahip olan Gunn sıçanları hiperbilirubinemi araştırmaları için tarihte önemli bir gelişmedir. Gunn sıçanlarında oluşturulan bu model tip I Crigler-Najjar sendromunun modellemesidir. Bu model yardımıyla bilirubin toksisitesinin ve metabolizmasının aydınlatılması için önemli araştırmalar yapılmış olup UGT1A1 enzim aktivitesinin düşüşüne bağlı olarak unkonjunge hiperbilirubinemisi incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, serebellar hipoplazi (az gelişmesi) ve beyin sapı işitsel potansiyellerindeki değişikler gibi bilirubinin beyin gelişimini etkilediği raporlanmıştır (93, 94, 95).

Bunun yanı sıra, indüklenmiş mutasyonlar ile fare genomu manipüle edilerek Knock-out, Knock-in ve transgenik hatlar üretilerek şiddetli yenidoğan hiperbilriubinemisinin temelleri araştırılmıştır (84). Şiddetli unkonjuge hiperbilriubinemisinin oluşturulduğu ilk model; UGT1A1 geninin 4. eksonundaki mutasyondan kaynaklı olarak UGT1A1 enziminin eksprese edilmediği tip I Crigler-Najjar sendromu modelidir (96). Bu model doğumdan hemen sonra öldüğü için hiperbilirubinemi mekanizmasını daha yakından incelemek için bu mutant suşa farklı allellerin eklenmesi ile üretilen yeni mutant fareler sayesinde fareler iki hafta yaşatılarak bilirubinin sebep olduğu toksik etkiler gözlemlenebilmiştir (97). Araştırmacılar bu çalışmada kernikterusu başarılı bir şekilde gözlemleyememiştir, bu yüzden karaciğere özgü UGT1A1 geninde mutasyon (Knock-out) yaparak şiddetli yenidoğan hiperbilirubinemisi geliştirmeyi başarmışlardır (98, 99). Bunun yanı sıra, bağırsağa özgü UGT1A1 geninde mutasyonlar yaparak doğumun ilk günlerinde

karaciğerin ve bağırsakların bu hastalıktaki rolleri incelenmiştir (100). Buna paralel olarak, ugt1 lokusunun 4. eksonunda tek-baz-delesyonu yapılarak Gunn sıçan hiperbilirubinemi modeli geliştirilmiştir, ve bu sayede karaciğerdeki UGT1A1 proteininin ekspresyon aktivitesi ve bilirubin glukuronidasyon aktivasyonu ortadan kaldırılmıştır. Bu mutasyon farklı genetik arka plana sahip olan suşlara aktarılarak (FVB/NJ ve C57Bl/6J), bilirubin nörotoksisitesi, serebellar anormallikler ve ölüm gibi sonuçlar ile şiddetli neonatal unkonjuge hiperbilirubinemi geliştirilmesi sağlanmıştır (101, 102). Bunlara ek olarak, UGT1A-null fare modelleri geliştirilmiş olup şiddetli nörolojik hasar ve ölüm gözlemlenmiştir ve Gunn sıçan modellerinden daha şiddetli bir fenotipe sahip olduğu ve bunun nedeninin bilirubin toksisitesinin türe özgü olabileceği ihtimali düşünülmektedir, ancak henüz tamamen açıklığa kavuşturulamamıştır (96, 101, 102).

Farmakolojik *in vivo* modelleri:

Genetik müdahalede bulunmadan, serum bilirubin seviyesini arttırmak için unkonjuge bilirubin fare veya sıçan yavrularına doğrudan enjekte edilmesiyle in vivo modeller geliştirilmiştir (103). Aynı şekilde, intraventrikül veya sisterna magna (beyin boşluğu) gibi farklı beyin bölgelerine enjeksiyonlar yapılarak kernikterus modeli geliştirilmesi amaçlanmıştır. İntraventrikül enjeksiyonu sonucu geçici olarak hiperbilirubinemi meydana gelirken sisterna magna enjeksiyonu sonucu kernikterus modeli geliştirilebilmiştir (104, 105). Bu yöntemler, doz ve zamanı kontrol edebilmek açısından avantajlı olsa da hastalığın oluşumunun doğrudan modellenmesine izin vermemektedir.

Diğer bir farmasötik yöntem ise akut hemolitik anemisini arttırarak hiperbilirubinemi modeli geliştirmek için fenilhidrazin maruziyetini içerir. Bu kimyasal kullanılarak yapılan deneylerde, Gunn sıçanlarında sarılık gelişerek bilirubin ensefalopatisi ve beyin sapı işitsel potansiyellerindeki değişikliklerin gözlemlenebildiği insandakine benzer bir kernikterus modeli geliştirilmiştir (106).

Son olarak, albümine bağlanarak bilirubinin taşınmasını önleyen sülfadimetoksin kimyasalı kullanılarak in vivo olarak hiperbilirubinemi modeli geliştirilmiştir (107, 108). Bu kimyasal uygulamasıyla, artan unkonjuge bilirubinin

beyin gibi lipofilik dokularda biriktiği gözlemlenmiştir, ve bu da bilirubin toksisitesinin çeşitli yönlerinin ve diğer tedavilerle kombinasyon halinde araştırılmasına olanak sağlamıştır (109).

Fare ve sıçan gibi kemirgen deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler zaman alıcı, pahalı ve etik problemleri beraberinde getirmektedir. Genetik *in vivo* modellerin temini ve barındırma koşullarındaki güçlükler, indüklenmiş modellerin oluşturulmasındaki teknik zorluklar ve farmakolojik *in vivo* modellerinin hastalığın ortam koşullarını tamamen sağlayamaması gibi önemli sorunlar söz konusudur. Buna bağlı olarak, alternatif *in* vivo modeller geliştirilmesi için araştırmalar yapılmaktadır.

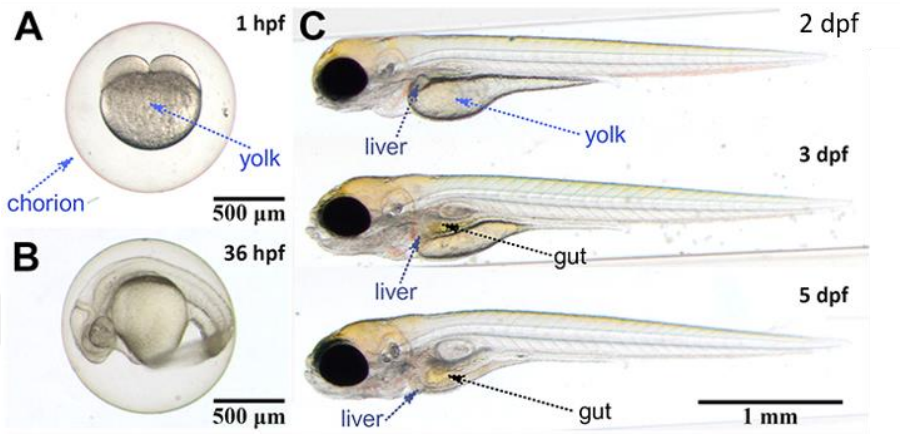
2.7. Zebrabalığı Modeli:

Zebrabalığı, *Danio rerio*, ilk olarak Güney Asya'da bulunmuş tropikal tatlı su balıklarıdır (110). Zebrabalığı, yüksek düzeyde insan genomuna benzerliği ve insanda hastalık ile ilişkilendirilmiş genlerle % 71,4 benzerlik göstermesi açısından önemli bir model organizma olarak bilinmektedir (110, 111). Bu yüzden, omurgalı gelişimi, fizyolojisi, hastalık modelleme ve tedavi çalışmaları için yaygın olarak kullanılan bir model organizmadır (112). Zebrabalığı; küçük boyutta olması (erişkin 2.5 - 4 cm), dış döllenme ile üremesi ve döl sayısının fazla olması gibi özelliklerinde dolayı çalışmalarda örneklem büyüklüğünün kolaylıkla arttırılması için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Diğer avantajları ise erken gelişim sürecine sahip olması ve embriyo veya larvaların şeffaf yapısı sayesinde organ gelişimini rahatlıkla incelenmesiyle gelişimsel biyolojinin araştırılmasına katkı sağlamaktadır (Şekil 6) (112, 113, 114).

2.7.1. Zebrabalığı Gelişim Aşamaları

Zebrabalığı embriyonu koruyucu koryon zarı içinde dış ortamda gelişir. Embriyonik gelişimini 48. saatin sonunda tamamlayarak koruyucu zardan çıkarak larval döneme geçiş yapar (Şekil 6). Sıklıklıkla embriyonal veya larval dönemde kullanılan bu model organizma küçük moleküllerin ortam suyundan vücuduna kolayca geçebilmesi sayesinde bir dizi ilaca veya kimyasal maddelere maruz bırakılarak toksikoloji çalışmaları yapılabilmektedir (110, 115, 116). Erken larval dönem 48 saat-

120 saat arası devam ederken bu süre zarfında besin kesesinden besinini sağlar, dışarıdan besin yemeye 120. saatten sonra başlar. Ayrıca karaciğer, bağırsak ve pronefron gibi organların gelişimi bu süre zarfında devam eder ve 120. saatin sonunda organları işlevsel hale gelir (113, 114, 117, 118).



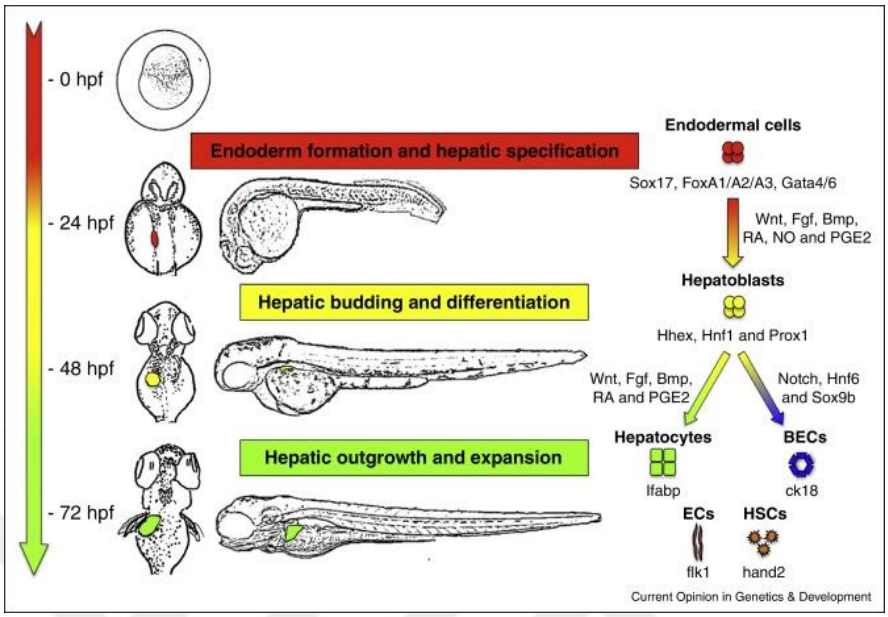
Şekil 6: Zebrabalığı gelişim şeması gösterimi (113)

Zebrabalığı embriyonik ve larval dönemlerinde bilirubin metabolizması bugüne kadar çalışılmamış bir alan olmakla birlikte, ilgili organların gelişimi ve önemli enzimleri kodlayan genler incelendiğinde döllenmeden sonraki ilk 5 gün içerisinde bilirubin metabolizmasının bütün bileşenlerinin aktifleştiğini görmekteyiz. Bu kısımda öncelikle ilgili organların gelişim süreçleri ardından önemli enzimler kodlayan zebrabalığı genlerinin ifade patternleri tartışılmıştır.

2.7.2. Karaciğer Gelişimi ve aktivasyonu:

Bilirubin metabolizmasında anahtar rol oyanayan karaciğer gelişimi döllenmeden sonra 44-48. saatler arasında ortaya çıkan hepatoblast hücrelerinin, 50.-70. saatler arasında farklılaşarak hepatosit veya biliar epitel hücrelerini meydana getirmesi ile devam eder. 72. Saatten itibaren hepatosit raportör (*fabp:mcherry*) transgenik hattı ile gözlemlenebilen karaciğer (Şekil 7) 72-120. Saatler arası

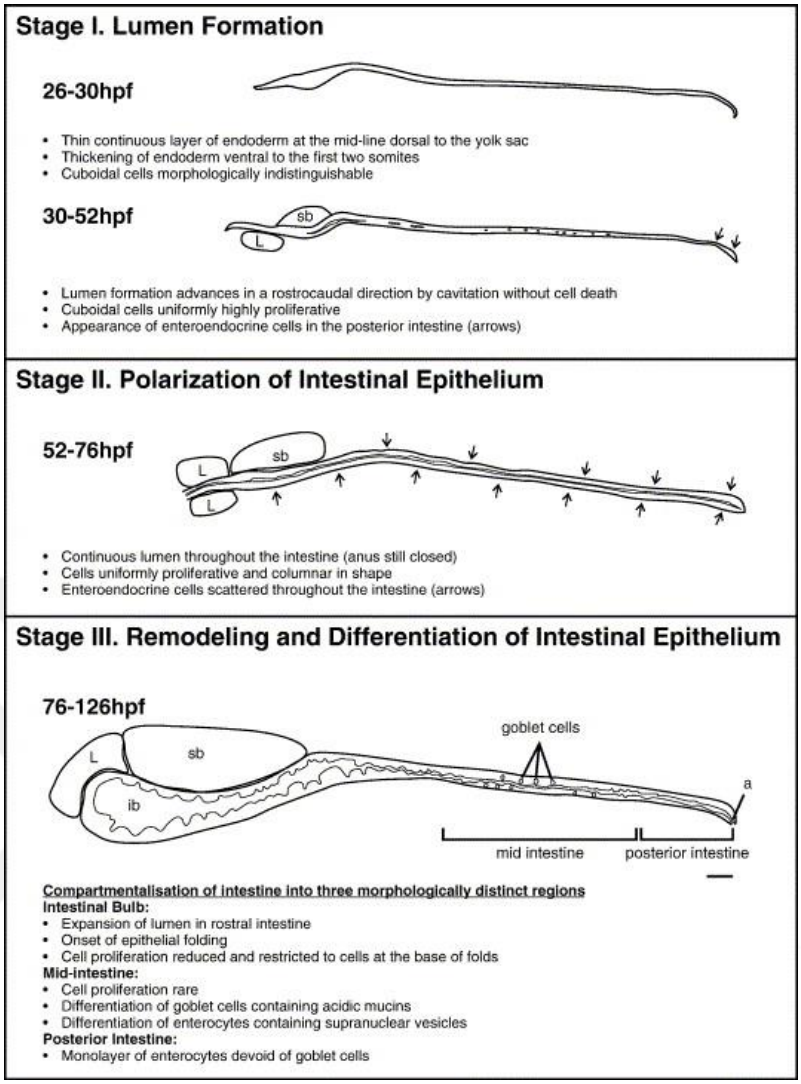
büyümeye ve gelişmeye devam eder ve nihayet 120. Saatin sonunda organ gelişimini tamamlayarak işlevsel hale gelmektedir (113, 114, 119).



Şekil 7: Karaciğer gelişim şeması gösterimi (119)

2.7.3. Gastrointestinal Sistem Gelişimi

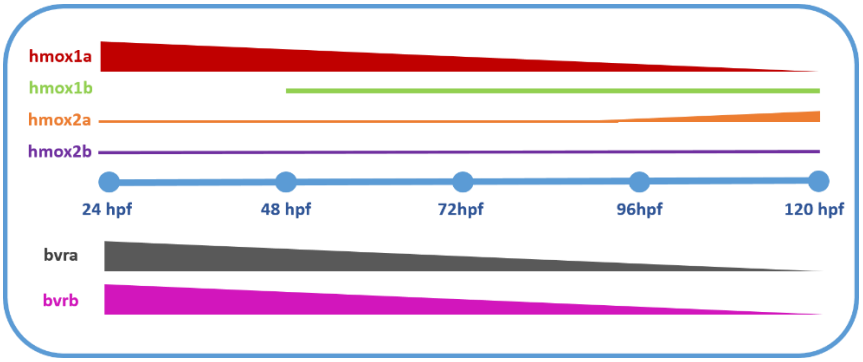
Zebrabalığı bağırsak sistemi gelişimi ise üç aşamada gerçekleşiyor olup 120. saatin sonuna kadar gelişimi devam eder. İlk aşamada 26-56 saatleri arasında ince bir endoderm yapısı gelişerek bir lümen yapısı oluşur. İkinci aşamada 52-76 saatleri arasında, bağırsak epitel proliferasyonu ve polarizasyonu ile lümen gelişimi tamamlanır. Son aşamada 76-126 saatleri arasında ise besin kesesi kaybolmaya başlar, ve bağırsak epitelinin yeniden şekillenmesi, farklılaşması ve bağırsak bölümlerinin belirginleşmesi görülmektedir (Şekil 8). Bağırsak bölümleri bulb, orta ve posterior olmak üzere üç bölüme ayrılmaktadır. Alınan besinler mide görevi göre bulb bölümünde birikerek orta ve posterior bölgesine ilerleyerel vücuttan atılımı sağlanır (120). Zebrabalığının şeffaf özelliğine bağlı olarak alınan besinlerin veya pigmente sahip olan kimyasalların atılımı kolaylıkla gözlemlenebilir.



Şekil 8: Gastrointestinal sistemin gelişim şemasının gösterimi (120)

2.7.4. Bilirubin metabolizmasında rol alan genler

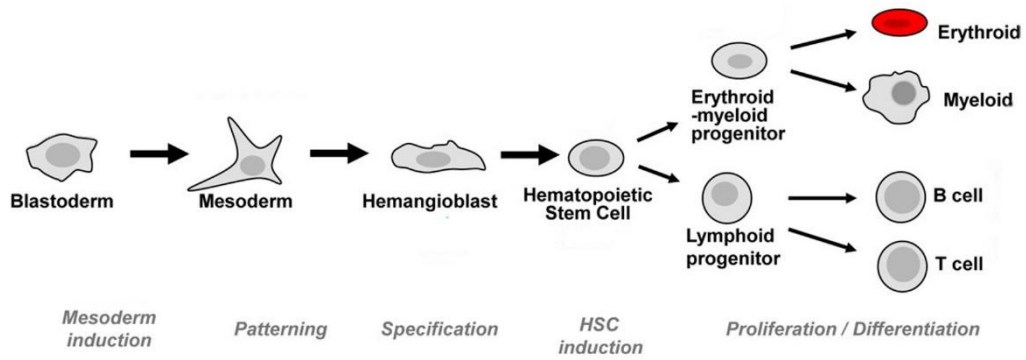
Bilirubin metabolizmasında önemli role sahip hem oksijenaz, biliverdin redüktaz ve UGT genleri ortologlarının zebrabalığında var olduğu yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır. Zebrabalıklarında UGT enzimini kodlayan *Ugt1*, *Ugt2* ve *Ugt5* olmak üzere üç gen ailesi bulunmaktadır. Tıpkı memelilerdeki gibi *Ugt1* ve *Ugt2* genleri sabit ve değişken ekson bölgelerini ile fazla sayıda varyantı oluşturduğu bilinirken; *Ugt5* geni ise memelilerde bulunmuyor olup 18 çeşidi bulunmaktadır. Tüm bu *Ugt* genleri göz önüne alındığında zebrabalığında 40 çeşit varyantı olduğu bilinmektedir (121).



Şekil 9: Zebrabalığı gelişimsel döneminde *hmox* ve *bvr* gen ifadelerinin gösterimi

Zebrabalığında bulunan hem oksijenaz ve biliverdin redüktaz enzimlerini ifade eden *hmox* ve *bvr* genleri 24 saatten 120. Saate kadar erken gelişim döneminde ifade edilmektedir. Zebrabalığında *hmox* geninin; *hmox1a*, *hmox1b*, *hmox2a* ve *hmox2b* olmak üzere dört paralogu bulunmaktadır. Şekil 9'da gen ifadelerinin gösteriminden de yola çıkarak, *hmox1a* geni en çok 24. saatte ifade edilirken *hmox2b* 48-120. saatler arasında ifade edilmektedir. Ancak *hmox1a* geninin *hmox1b* genine kıyasla zebrabalığı gelişiminde anlamlı düzeyde daha fazla ifade edildiği ve hmox1a'nın memeli hem oksijenaz 1'in korunmuş fonksiyonlarıyla daha tutarlı olduğu hmox1b'nin ise daha bölünmüş bir rolü olduğu düşünülmektedir (122). *Hmox1a* geni 36. saatte kan hücrelerinin farklılaştığı bölge olan posteriyor kan adası (PBI, *posterior blood island*)'nda ifade edildiği tespit edilmiştir. *Hmox2a* seviyeleri ise gelişim boyunca 24-72 saatleri arasında ifadesi düşük olup 96-120 saatleri arasında gen ifadesi artmaktadır. *hmox2b* ise *hmox2a*'ya kıyasla daha fazla ifade edilmektedir ve 24-120 saatleri arasında ifade seviyelerinin sabit olduğu bulunmuştur (123). Biliverdin redüktaz enziminin ifadesini sağlayana *bvra* ve *bvrb* genleri ise 24-120 saatleri arasındaki gelişimsel dönemde ifade ediliyor olup en fazla ifade düzeyine 24. saatte rastlanmıştır. *bvrb* geni *bvra*'ya kıyasla daha fazla ifade ediliyor olup eritrsoit hücrelerinin üretildiği ara hücre kütlesi (ICM, *intermediate cell mass*) bölgesinde ifade edilmektedir (123).

İnsanda bilirubinin enterohepatik dolaşıma katılmasını sağlayan beta-glukuronidaz enzimini ifade eden *GUSB* geninin ortologu zebrabalıklarında *gusb* olarak bilinmektedir. İnsandakine benzer olarak glukuronoside ait katabolik süreçlere dahil olduğu tahmin edilmektedir (124).



Site in Zebrafish (Timepoint)	Lateral mesoderm/ICM (15 hpf/18 hpf)	Dorsal aorta/AGM (36 hpf)	CHT (3 dpf)	Kidney Marrow (4 dpf)
Site in Humans (Timepoint)	Yolk sac mesodermal cells (19 dpf)	Dorsal aorta/AGM (27 dpf)	Fetal Liver/ Placenta (35 dpf)	Spleen/Thymus/Bone Marrow

Şekil 10: Zebrabalıklarında ve insanlarda görülen hematopoez süreci (127)

Zebrabalıklarında hematopez memelilerdekine benzer olarak ilkel ve kesin olmak üzere ardışık süreçler ile gerçekleşir. İlkel hematopez sürecinde eritrositler ve makrofajlar üretilirken; kesin hematopoez sürecinde ise kan hücreleri farklılaşarak eritrositler, granülositler, lenfositler ve trombositler gibi hematopoietik kök hücreler (*Hematopoietic stem cell, HSC*) meydana gelmektedir gelmektedir (125). İlk olarak, ilkel hematopoietik hücreleri 12-24 hpf zaman diliminde zebrabalıklarının ara hücre kütlesinde (*intermediate cell mass, ICM*) üretilirken insanda ise doğumdan sonraki 19. günde besin kesesinde üretildiği bilnmektedir (125, 126). 24. saatte kan dolaşımı ile birlikte dolaşıma katılan hematopoietik hücreler 26-48 hpf aralığında AGM benzeri bölgede hematopoietik öncül hücreler (*Hematopoietic progenitor cells, HPC*) oluşumuyla kesin hematopoez süreci başlar (125, 127). İnsanlarda ise bu süreç 27 dpf'de başlamaktadır (128). *HSC* ve *HPC*'lerin artışı kaudal hemapoetik dokuda (3 dpf) devam edererek böbrek (4 dpf) ve timüs (3 dpf) dokularına göç eder; insanlarda ise kesin hematopoez 35 dpf'de fetal karaciğerinde ve plesantada sonrasında ise dalak, timüs ve kemik iliğinde görülmektedir (Şekil 10) (125, 129, 130).

2.7.5. Nörolojik bir model olarak zebrabalığı

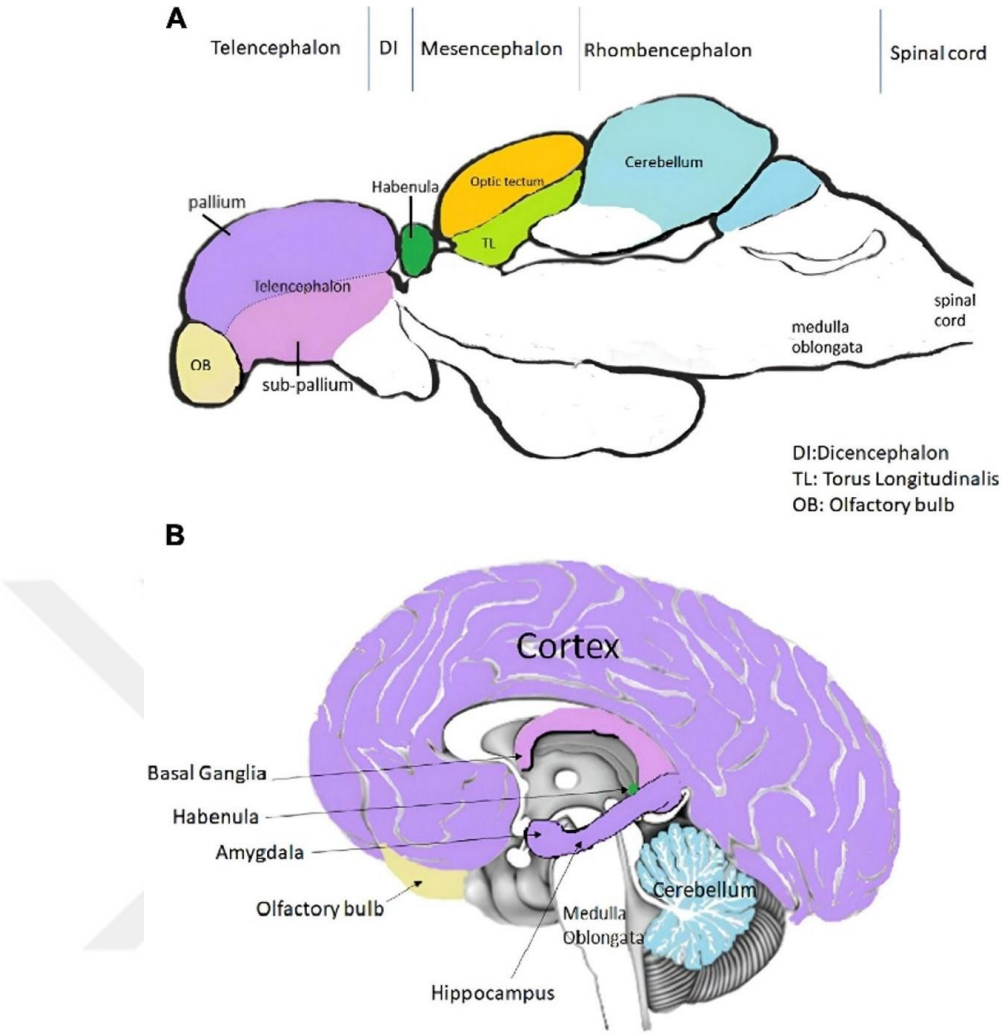
Zebrabalığı beyni yapısal olarak yakından incelendiğinde ön beyin (*forebrain*), orta beyin (*midbrain*), arka beyin (*hindbrain*) ve omurilik (*spinal cord*) bölgelerine ayrılıyor olup yapıların bulunma sırası insandakine benzemektedir (131). Bu beyin

yapıları 24. saatte embriyogenez döneminden itibaren tespit edilebilmekte olup yapısal özellikleri Şekil 11'de detaylı olarak gösterilmiştir.

Zebrabalığında ön beyin telensefalon, diensefalon, hipotalamus ve retinadan ibarettir (132). Zebrabalığında insandakine benzer olarak hipokampüs, amgidala ve substantia nigra beyin bölgeleri bulunmasa da zebrabalığı beyninde benzer işlevlere sahip beyin yapıları bulunmaktadır (133). Ön beyinde bulunan telensefalon hafızayı, duyguyu ve sosyal davranışı düzenlerken; diensefalon uyanıklık, dikkat ve periyodik biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal süreçleri ele almaktadır (134).

Zebrabalığında orta beyin (*mezensafalon*) görme ve işitme için önemli bir bölge olup optik tektum, *torus semicircularis, torus longitudinalis* ve orta beyin tegmentumunu içermektedir (132, 135). Optik tektum bölgesi zebrabalığında görmeyi sağlıyor olup insanda üstün kollikulu *(superiror colliculus*) olarak bilinmektedir. Zebrabalıklarında işitsel sistemden sorumlu olan *torus longitudinalis* bölgesi ise insanda *inferior colliculus* ile benzer olduğu düşünülmektedir (136).

Zebrabalığında arka beyin (rhomensefalon) ise *medulla oblongata, pons* ve serebellum bölgelerinden oluşmaktadır (137). Serebellum zebrabalıklarında motor refleksleri kontrol eder ve duygusal öğrenme ve uzamsal bilişte (mekanı algılamada) rol oynadığı bilinmektedir (138). *Medulla* ve *pons* beynin dördüncü ventrikülünü oluşturur ve orta beyin ile birlikte genellikle beyin sapı olarak adlandırılmaktadır. Beyin sapı, dolaşım, solunum ve uyanıklık gibi davranışlardan sorumludur. Ek olarak nöronların beyin omuriliği ile iletişim kurduğu bölge olduğu bilinmektedir (137).



Şekil 11: Zebrabalığı ve insan beyin anatomilerinin karşılaştırmalı gösterimi (139)

Zebrabalıklarında nörolojik hastalık süreçlerini modellemek için yapılan toksikoloji çalışmalarında küçük boyuttaki moleküllerin sinir sistemine geçirgenliğinin bilinmesi önemlidir. Bu yüzden araştırmacılar kan beyin bariyerini araştırmaya odaklanmıştır. Araştırmalar sonucu, insanda kan-beyin bariyerinde geçişi önleyen sıkı bağlantı yapılarının (tight junction) zebrabalığında 72 saatten sonra geliştiğini tespit etmişlerdir. Buna ek olarak, insanda bilirubinin beyinden aktif taşımayla atılımını sağlayan en önemli proteininin ABCB1 olduğu bilinmektedir. Bu taşıyıcı proteini ifade eden genin zebrabalıklarında abcb4 ve abcb5 genleri ile homolog olduğu düşünülmektedir (140). Yapılan bir araştırmada, 3. günde serum proteinleri ve 69 kDa boyutundaki albümin proteini kan beyin bariyerini geçemezken, 5. Ve 10. günlerde sırasıyla 961 Da ve 376 Da boyutlarındaki molekülleri geçiremeyecek kadar

gelişmişlik göstermiştir Son olarak, zebrabalığındaki kan beyin bariyer geçirgenliğinin memelilerdekine benzer olduğu gösterilmiştir (140).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu tez çalışmasının araştırma türü deneyseldir.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Tüm deneyler Haziran 2022 ve Mayıs 2023 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi bünyesindeki İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi'ndeki Çakan Zebrabalığı Modelleme Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Haziran-Ekim 2021	Tez önerisi hazırlanması
	Tez önerisi sunumu ve kabulü
Haziran 2021-Ocak 2022	Etik kurul onayı
	Proje önerisinin hazırlanması
Ocak-Nisan 2022	Literatür taraması
Nisan-Haziran 2022	Projenin Kabul edilmesi
	Malzeme alımları
Mayıs-Aralık 2022	Bilirubinin balıklardaki etkisinin araştırılması için yapılan ön çalışmalar
	Bilirubinin maruziyet sürelerinin ve dozlarının optimize edilmesi için yapılan çalışmalar
Ocak-Mart 2023	Belirlenen dozlar ve zaman dilimlerinde balıklarda toksikoloji deneylerinin yapılması ve görüntülenmesi
	Toksikoloji deney sonuçlarının analizi
Mart-Haziran 2023	Toksikoloji deneyi sonucu fenotipik etkilerin takibi
	Fenotipik etkilerin sayısal olarak değerlendirilmesi
	Dorsal beyin görüntülerinin kantitatif analizi
Haziran-Temmuz 2023	DAPI boyaması çalışması
	DAPI boyaması sonrası dorsal beyin görüntülerinin analizi
Temmuz-Eylül 2023	Histoloji çalışması
	Histolojik kesitlerin görüntülenmesi
Eylül-Kasım 2023	Serbest yüzme davranış testi
	Serbest yüzme davranış testinin analizi
Kasım 2022-Ocak 2023	Bakış kısıtlılığı testi
	Bakış kısıtlılığı testinin analizi
Nisan-Mayıs 2023	Tez yazım aşaması

3.3. Çalışma Materyali

Kimyasallar	Markası/Kod	Kullanım Amacı
Agaroz (Düşük erime sıcaklığına sahip)	Gold Bio, A-204-25	Görüntü plakalarına gömmek için
Bilirubin	Sigma, B4126-1G	Sarılık oluşturmak için
Biomax Agaroz	Prona, HS-8000	Görüntüleme plakası oluşturmak için
Boncuk Parafin	Tekkim, TK.200661.05004	Balıkları histopatolojik kesitlere hazırlamak için
Bovin Serum Albümin	Gold Bio, A-420-100	Bilirubini taşıyıcısı olarak
CaCl2.2H2O	Carlo Erba, 327607	E3 balık suyu bileşeni olarak
Eosin Y	Sigma-Aldrich, 1.17081.1000	Histoloji analizi için boyama
Etanol	Merck, 1.00983.2500	Sterilizasyonu sağlamak için
Hematoksilen	Sigma-Aldrich, 1.05174.0500	Histoloji analizi için boyama
Ksilen	Merck,1.08297.2500	Histoloji analizi için yıkama
Metilen Mavisi	Merck, 1592700010	E3 balık suyu sterilizasyonu için
MgSO4.7H2O	Sigma-Aldrich, M2773	E3 balık suyu bileşeni olarak
Paraformaldehit	Merck, 1.04005.1000	Balıkları fikse etmek için
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck, 1.04873.1000	PBS bileşeni olarak
Potasyum klorür (KCl)	Merck, 1.04936.1000	E3 balık suyu ve PBS bileşeni olarak
Sodyum fosfat dibazik dihidrat ($Na_2HPO4.2H_20$)	Sigma-Aldrich, 04272-1KG	PBS bileşeni olarak
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck	Bilirubin çözgeni olarak
Sodyum klorit (NaCl)	Merck, 1.06404.1000	E3 balık suyu ve PBS bileşeni olarak
Trikain metansülfonat	Sigma-Aldrich, E1052	Balıklar için anestezi olarak

Ekipmanlar	Markası/Kod	Kullanım Amacı
-20°C Buzdolabı	Bosch, GSN51AW30	Örnekleri saklamak için
24-kuyucuklu plaka	SPL LifeScience, ISO 13485	Toksikoloji testi için kuyu
28°C İnkübatör	Witeg, WibeCube	Balıkların büyüme ortam sıcaklığını sağlamak için
4°C Buzdolabı	Bosch, KSV36AI31	Örnekleri saklamak için
65°C İnkübatör	FN400	Parafinin donmasını önlemek için
6-kuyucuklu plaka	SPL LifeScience, ISO 13485	Toksikoloji testi için kuyu
Boyama cihazı	Leica ST5010 auto stainer XL	Histoloji kesitlerini boyamak için
Cam Pastör Pipeti	Marienfeld	Balık larvalarını seçmek için
Floresan Kaynağı	Olympus Corporation, U-RFL-T	DAPI boyanan balıkları görüntülemek için
Floresan Mikroskobu	Olympus Corporation, SZX2-ILLB	
Gömme Sistemi	Zenon Diagnostic	Balıkları histolojik kesitlere hazırlama
Hassas Terazi	Sartorius, 32908543	Örnekleri tartmak için
Isı Bloğu	Stuart, SBH130D	Düşük sıcaklık agarozu eritmek için
Mikroskop	Olympus BX53 (camera / DP27)	Histoloji kesitlerini görüntülemek için
Mikroskop	BX61 (camera/DP72)	Histoloji kesitlerini görüntülemek için
Mikrotom	Leica RM2245	Histolojik kesitleri almak için
Pastör Pipet	Citotest, 4320-0511	Balık larvalarını seçmek için
Stereo Kamera	Olympus Soft Imaging Solutions, SC50	Balıklardaki bilirubin birikimini görüntülemek için
Stereo mikroskop_SZX10 (SC50 Kamera)	Olympus Corporation, SZX2-ILLB	
Su banyosu	Leica HI1210	Histolojik parafin kesitleri için
Vakum infiltrasyon doku işlemcisi	Olympus, VIP6_E2	Histoloji doku takibi için

10X PBS (pH: 7.4) (1L)	
Bileşen	**Miktar (gr)**
NaCl	80,00
KCl	2,00
Na2HPO4.2H20	17,80
KH2PO4	2,40
dH2O	1L'ye tamamla

0,25 M (N) NaOH (100 ml)	
Bileşen	**Miktar**
NaOH	0.0975 gr
dH2O	100 ml'e tamamla

2,5% Agarose	
Bileşen	**Miktar**
Agaroz	2 gr
E3	80 ml'e tamamla

4% PFA (ph:7.5) (100ml)	
Bileşen	**Miktar**
Paraformaldehit	4gr
1X PBS	100 ml'e tamamla

%1 Agaroz (Düşük erime sıcaklığına sahip) (10ml)	
Bileşen	**Miktar**
Agaroz	0.1gr
E3 medium	10ml

50mg/ml Stok Trikain (50ml)	
Bileşen	**Miktar**
Trikain metansülfonat	2.5gr
dH2O	50ml

E3 balık suyu (60X stok (1L)	
Bileşen	**Miktar**
NaCl	17.2gr
KCl	0.76gr
CaCl2.2H2O	2.9gr
MgSO4.7H2O	4.9gr
dH2O	1L'ye tamamla

E3 balık suyu (1X) (9L)	
Bileşen	**Miktar**
60X stok E3 Medium	150ml
%0.3 Metilen Mavisi	180ul

85.5 mM Bilirubin Stok (1 ml)	
Bileşen	**Miktar**
Bilirubin	50 mg
0,25 N NaOH	1 ml

6 mM BSA Stok (3 ml)	
Bileşen	**Miktar**
BSA	1,19 gr
dH2O	3 ml

900 µM Bil:BSA (3:1) Solüsyonu (1 ml)	
Bileşen	**Miktar**
85.5 mM Bilirubin	10,52 µl
6 mM BSA	50 µl
1X PBS	1 ml'ye tamamla

3.4. Araştırmanın Değişkenleri

Zebrabalığında hiperbilirubinemiden doğan toksik etkiler bağımlı değişken iken, bilirubin bağımsız değişken olarak ifade edilebilir. Bilirubin verilmeyen zebrabalığı ise kontrol değişkenidir.

3.5. Veri Toplama Araçları:

Zebrabalığı yetiştirilmesi

Yetişkin zebrabalığı, standart koşullar altında 28°C'de, 14 s aydınlık/ 10 s karanlık döngüsünde büyütüldü. Embriyo ve larvaların şeffaf özelliğinden yararlanarak daha kolay görüntüleme sağlamak için Casper zebrabalığı hattı (roy-/-; nacre/-/-) kullanıldı (141).

Toksikoloji testi

Casper zebrabalığı hattı kullanılarak yavru eldesi sağlandı. Elde edilen embriyolar E3 balık suyu ortamında 28°C'de büyütüldü. 48 s sonunda koryonlarından henüz çıkmayan embriyolar manuel olarak koryonlarından ayrıldı. Embriyolar, 24 veya 6 kuyucuklu plakalara yerleştirildi. 900 µM Bil:BSA solüsyonu kullanılarak nihai bilirubin konsantrasyonuna E3 balık suyunda seyreltrildi. Seyreltilen bilirubin solüsyonu plakalara aktarılarak 24 s veya 48 s 28°C'de embriyoların inkübasyonu sağlandı inkübe edildi. Bu süreler sonunda, E3 balık suyu kullanılarak yıkama yapıldı. Olympus SZX10 stereo mikroskobu kullanılarak larvaların görüntüleri alındı. Gözlem süresinin sonuna kadar her gün E3 balık suyu değiştirilen larvalar 28°C'de tutuldu.

DAPI boyaması

Larvalar %4 PFA ile oda sıcaklığında 1 saat fikse edildi. 15 dakika boyunca oda sıcaklığında 1X PBS-T (%1 Triton-X ve 1X PBS içerir) içinde seyreltilmiş 1X DAPI ile inkübe edildi. 1X PBS-T ile 5 dakika üç kez yıkandı. Gömme işlemine kadar ışıktan koruyarak 4oC'de saklandı.

Gömme

E3 ortamı veya 1X PBS kullanılarak % 0.1 düşük erime noktalı agar (low melt agar) hazırlandı ve 42-46^{o}C'de eritildi. Daha sonra larvalar 10 mm cam petri kaplarına gömüldü. Floresan mikroskobu yardımıyla gömülen larvaların beyin görüntüleri alınmıştır.

Histopatolojik analiz

10 mg/mL trikan ile anestezi uygulanan 6 dpf larvalar uyutuldu ve fikse edildi. Ardından bir dizi yıkama aşamasına tabi tutuldu ve parafine gömüldü. Örnekler mikrotom kullanılarak 1 mikron dilimler halinde kesildi. Hematoksilen ve Eozin boyaması uygulandı. Parlak alan mikroskobunda 4x, 10x, 20x ve 40x objektif kullanılarak örnekler gözlemlendi.

Bakış kısıtlılığı testi

Göz refleks testi, 6 dpf larvalar kullanılarak yapıldı. Larvalar %3'lük hazırlanan metilselüloz içerisine anestezi uygulanmadan yerleştirildi ve daha sonra göz hareketlerinin izlenmesi için dorsal pozisyona getirildi. SZX10 stereo mikroskobu yardımıyla 6 saniye aralıklarla 5 kez karanlık/aydınlık döngüsüne tutularak 30 saniyelik videolar kaydedilmiştir.

Serbest yüzme davranış testi

Bilirubin maruziyeti sonrası 4 dpf ve 6 dpf ‘de, 24 kuyulu plakalar içinde olan larvaların serbest yüzme davranışları SZX10 stereo mikroskobu altında 3 dakikalık video kayıtları ile kaydedilmiştir. ImageJ programı ile analiz edilmiştir.

Görüntülerin analizi

Elde edilen görüntüler Imagej programı kullanılarak analiz edildi. Bilirubin birikiminin analizi için, beyin ventriküllerinde biriken bilirubinin yoğunluğu ortalama gri değeri (MGV, mean gray value) kullanılarak ölçüldü. Beyin kompartmanları, göz bölgesindeki yapılar, beyin uzunluğu, kafa genişliği, vücut uzunluğu, göz döndürme açıları ve serbest yüzme davranışları ImageJ kullanılarak analiz edilmiştir.

İstatistik Analiz

İstatistiksel analiz, kontrol ve bilirubine maruz kalan gruplar karşılaştırılarak %95'lik bir güven aralığı ile tek kuyruklu t-testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel sonuçlar yıldızlarla temsil edildi: *$P \leq 0.05$; **$P \leq 0{,}01$; ***$P \leq 0{,}001$;

****P ≤ 0,0001; NS, anlamlı değil. Sonuçlar, GraphPad Prism kullanılarak ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edilir.

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm deneyler için en az 20 larva kullanıldı ve sağkalım sayılarına göre analizler gerçekleştirildi ve veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz ve grafikler GraphPad Prism kullanılarak yapıldı. İki grubun karşılaştırılmasında tek kuyruklu t-testi kullanıldı. *P ≤ 0.05; **P ≤ 0,01; ***P ≤ 0,001; ****P ≤ 0,0001 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.7. Araştırmanın Kısıtlılıkları

Zebrabalığının suya ihtiyaç duyması ve ortam suyu ve ısı gibi çevresel koşullardan gelişimsel olarak kolayca etkilenebilmesi araştırmanın sınırlılıkları içerisinde yer alır. Ayrıca her ne kadar insan ve zebrabalığı beyni benzerlikler içerse de kompartmanlarının lokasyonlarının farklı olması biriken bilirubinin insanda eş değer olduğu bölgeleri araştırmak zorlayıcıydı.

3.8. Etik Kurul Onayı

İBG-HADYEK tarafından işleme alınan 2021-012 Protokol No'lu etik kurul kararınca projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına karar verilmiştir

4. BULGULAR

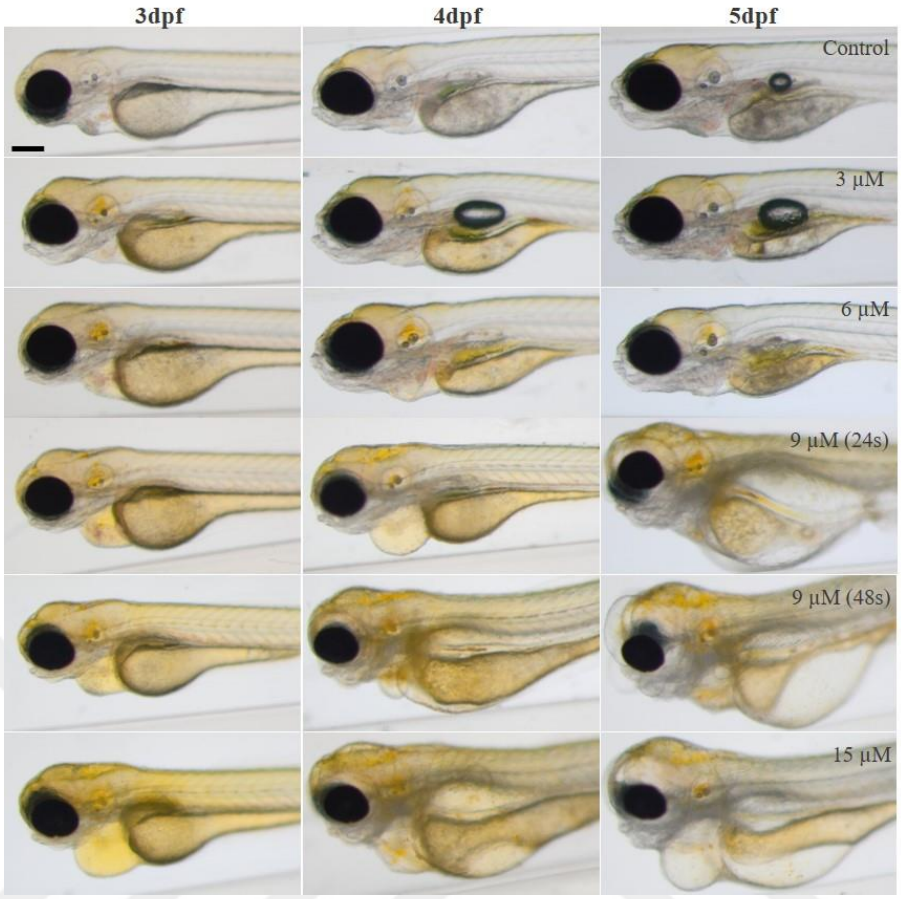
4.1. Erken dönem Zebra balığı larvalarının bilirubin maruziyeti:

Zebrabalığında 48. saatten sonra hemoglobin üretimi ve hem oksijenaz ve biliverdin redüktaz genlerinin ekspresyonu gerçekleşir (123, 125). 120. saatin sonunda ise karaciğer gelişimini tamamlanarak karaciğer hücreleri ve enzimlerin tam işlevselliğe ulaştığı bilinmektedir (114, 121). Bu bilgiler ışığında, döllenmeden sonra 48-72. saatler (2-3 dpf), ve 48-96. Saatler (2-4 dpf) arasında zebrabalığı larvalarını farklı dozlarda bilirubine maruz bırakarak yenidoğan hiperbilirubinemisi modellenmiştir (Şekil 12 ve 13).

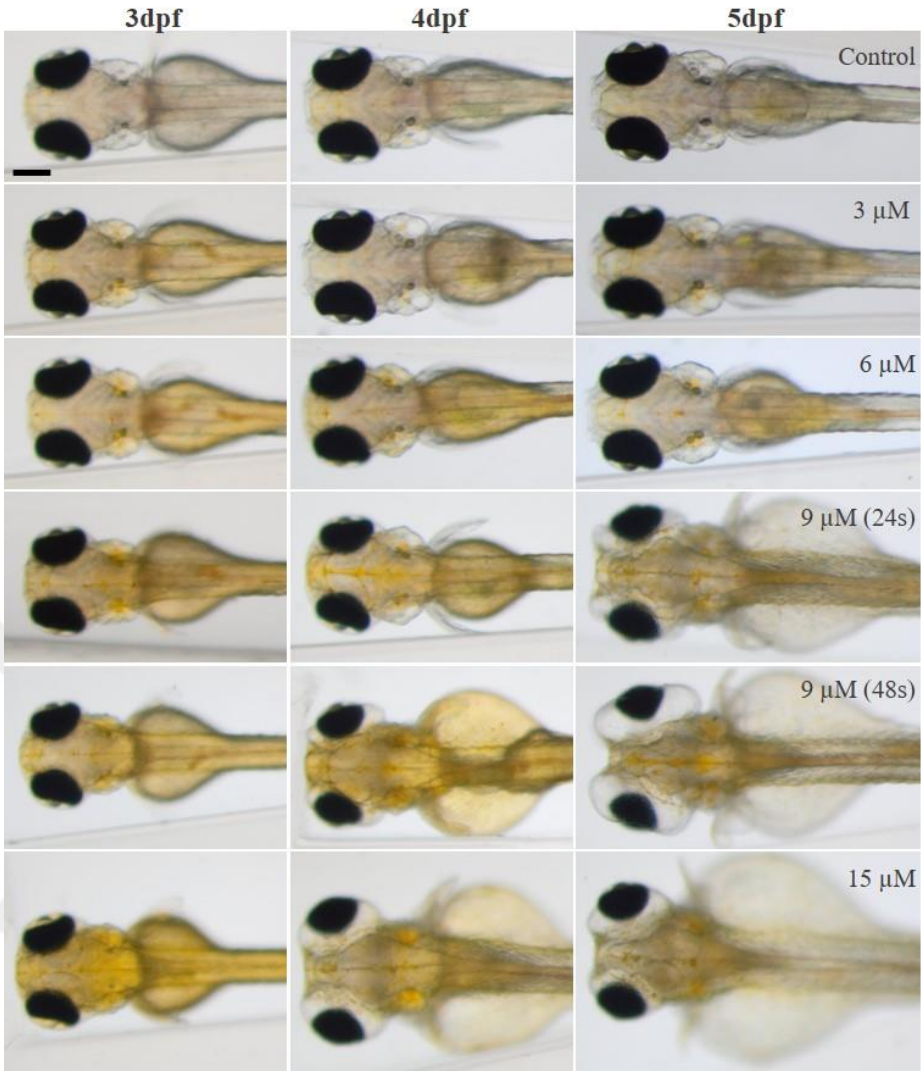
Bilirubine maruz kalan larvalarda vücuda alınan bilirubinin biriktiği dokuları ve eliminasyon sürecini yakından takip etmek için her 24 saatte bir gözlem yapılmıştır (Şekil 1 ve 2). 3, 6, 9 ve 15 µM bilirubin bovin serum albumin (BSA)'ye yüklenerek ortam suyuna eklenmiştir.

2-3 dpf arasında bilirubin maruziyeti

2-3 dpf arasında 24 saatlik bilirubin maruziyeti test edilmiştir (Şekil 12 ve13).

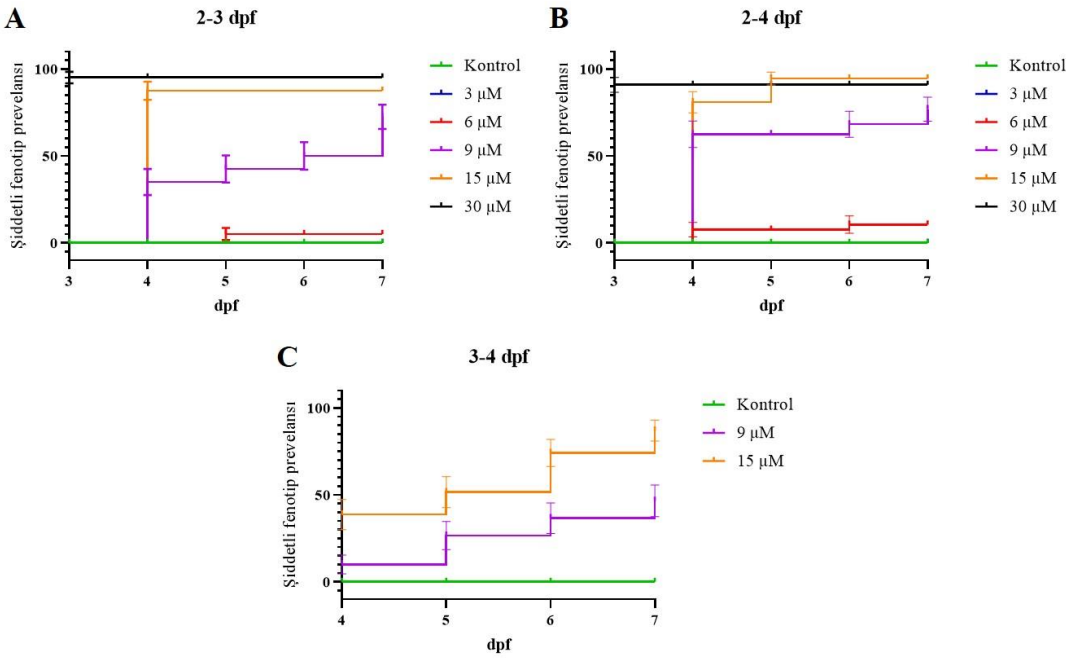


***Ş*ekil 12: Bilirubinin toksik etkilerinin zamana ve doza bağlı olarak gözlemlenmesi.** 3, 4 ve 5 dpf'de yıkandıktan sonra 3, 6, 9 (24 saat ve 48 saat) ve 15 µM dozlarında Casper balıklarının parlak alan yanal görüntüleri. Ölçek çubukları: 200 µm. (her grup için n=40).

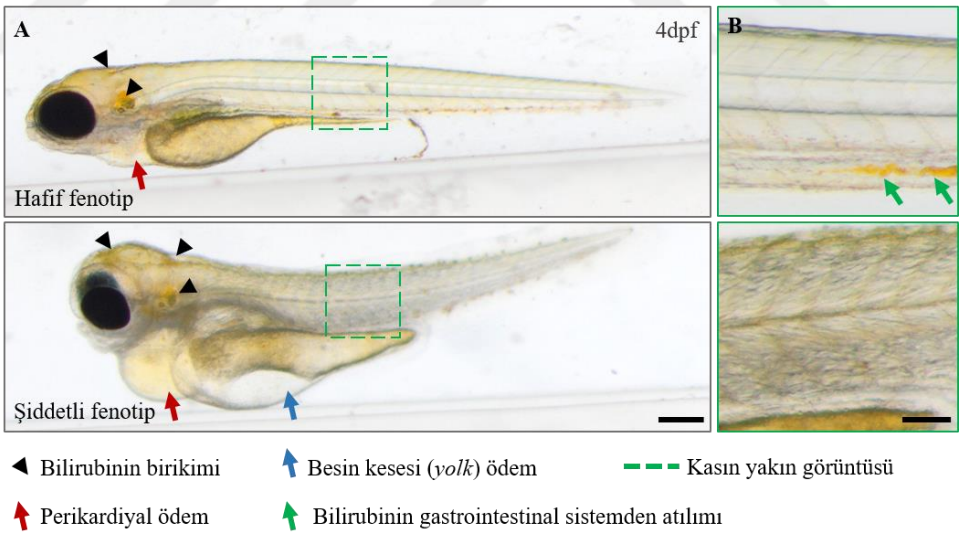


Şekil 13: Bilirubinin nörotoksik etkilerinin zamana ve doza bağlı olarak gözlemlenmesi. 3, 4 ve 5 dpf'de yıkandıktan sonra 3, 6, 9 (24 saat ve 48 saat) ve 15 µM dozlarında Casper balıklarının parlak alan dorsal görüntüleri. Ölçek çubukları: 200 µm. (her grup için n=40).

3 µM veya 6 µM biliriubine maruz kalan larvalarda bilirubinin balık dokularında hafif düzeyde biriktiği görülmüş ancak herhangi bir morfolojik kusur görülmemiştir. 7 dpf'e kadar gözlenen larvalarda bilirubin eliminasyonunun devam ettiği, herhangi bir morfolojik bozukluk olmadığı görülmüş olup 3-6 µM bilirubinin yenidoğan zerbabalığında tolere edildiği ve toksisiteye neden olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 14A).



Şekil 14: Bilirubine maruz kalan zebrabalığı larvalarının şiddetli fenotip prevelansı. (A) 2-3 dpf, (B) 2-4 dpf ve (C) 3-4 dpf arasında, 3-30 µM bilirubine maruz kalan Casper larvalarının şiddetli fenotipininin 7 dpf'e kadar takibi. Veriler Ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. (2-3 dpf, 2-4 dpf ve 3-4 dpf için sırasıyla n=40, n=40 ve n=30).



Şekil 15: 4dpf'de bilirubin maruziyetinin zebrabalığı larva fenotipi üzerindeki etkileri. A) 2-3 dpf arasında 9 µM bilirubine maruz bırakılan casper larvalarının iki paterninin 4 dpf'de aydınlık alan mikroskobu altında tespiti. Bilirubinin dokulardaki (özellikle beyindeki) birikimi siyah oklarla ve perikardiyal (kalp) ödemi kırmızı oklarla her iki patternde de görülmektedir. Şiddetli fenotipte besin kesesi (yolk) ödemi mavi ok ile gösterilmiştir. Yeşil kutu, kas yapılarının yakından görünümünü gösterir. B) Larvanın sırt bölgesindeki kaslarına ve gastrointestinal sistemine ait yakından görüntü. Şiddetli fenotipte kas yapısının şeffaflığının kaybolması belirgindir. Hafif fenotipte bilirubinin vücuttan atılımı yeşil oklarla gösterilmektedir. Ölçek çubukları: 200 µm (A) ve 100 µm (B)

9 µM bilirubine maruz kalan larvalarda, dokularda daha çok bilirubin biriktiği sarı rengin artmasından anlaşılmatadır. Dokularda artan bilirubin toksik etkileri 3 dpf'te perikardiyal ödem oluşumuna neden olmuştur (Şekil 12). Bu larvaların morfolojisi 4 dpf'te hafif ve şiddetli fenotip olmak üzere iki farklı tabloya neden olmuştur (Şekil 15). Hafif fenotip gözlemlenen balıklarda, bilirubinin dokularda hafif düzeyde birikimi, hafif perikardiyal ödem ve bilirubinin gastrointestinal sistemden eliminasyonu tespit edilmiştir. Şiddetli fenotip gözlemlenen balıklarda ise, bilirubinin beyin ve diğer dokularda yüksek oranda birikimi, şiddetli perikardiyal ödem, vücut postürünü bozan yolk kesesi ödemi, kas yapısının bozulması ve şeffaflığının kaybolması gibi fenotipik değişimler gözlemlenmiştir (Şekil 15). 4 dpf larvalar incelendiğinde hafif fenotip, ve şiddetli fenotip sırasıyla larvaların % 65,8 ve % 34,2'sinde (n=40) görülmüştür. 7dpf'e kadar bu oranların kademeli olarak arttığı Şekil 14A' daki grafikte gösterilmektedir.

15 µM bilirubine maruz kalan larvalarda, bilirubin birikimi artmış 3 dpf'te perikardiyal ödem ve besin kesesi ödemi ile kas yapısında bozulma görülmüştür. Bu larvalarda şiddetli fenotip görülme oranı % 90 (n=40) olarak gerçekleşmiş, 7 dpf'e kadar bu oran sabit kalmıştır. 30 µM bilirubine maruz kalan larvalar ise (n=40) ilk 24 saat içerisinde ölmüştür (Şekil 14A).

Bu bulgular 2- 3 dpf arasında 9 µM bilirubinin patolojik etkileri olan hiperbilirubinemiye neden olduğu ancak 15 µM bilirubinin şiddetli hiperbilirubinemiye neden olduğu, 30 µM bilirubinin ise akut ölüme neden olduğunu göstermektedir.

2-4 dpf arasında bilirubin maruziyeti

3 µM veya 6 µM biliriubine maruz kalan larvalarda, bilirubin dokularında hafif düzeyde birikim gözlemlenmesine rağmen, hemen hemen herhangi bir morfolojik kusur veya kayda değer bir toksisite gözlemlenmemiştir. Ek olarak, dokularda biriken bilirubinin eliminasyonunun 7 dpf'e kadar devam ettiği görülmüştür. 6 dpf'de sadece 6 µM dozunda az miktarda şiddetli fenotipe rastlanmıştır (Şekil 14B).

9 µM biliriubine maruz kalan larvalarda,bilirubinin artan maruz kalma süresi nedeniyle, şiddetli bilirubin birikimi gözlemlendi ve şiddetli fenotip prevalansı çok yüksek olup 6 ve 7 dpf'e kadar kademeli olarak artmaya devam etmiştir (Şekil 14B).

15 ve 30 µM biliriubine maruz kalan larvalardai şiddetli fenotipi takiben mortalite gözlemlendi (Şekil 14B).

2-4 dpf aralığında bilirubin maruziyeti ile 2-3 dpf karşılaştırıldığında, bilirubin maruziyet süresinin artmasıyla ciddi patolojik etkilerin fenotipte daha şiddetli bir şekilde ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır (Şekil 14A ve 14B).

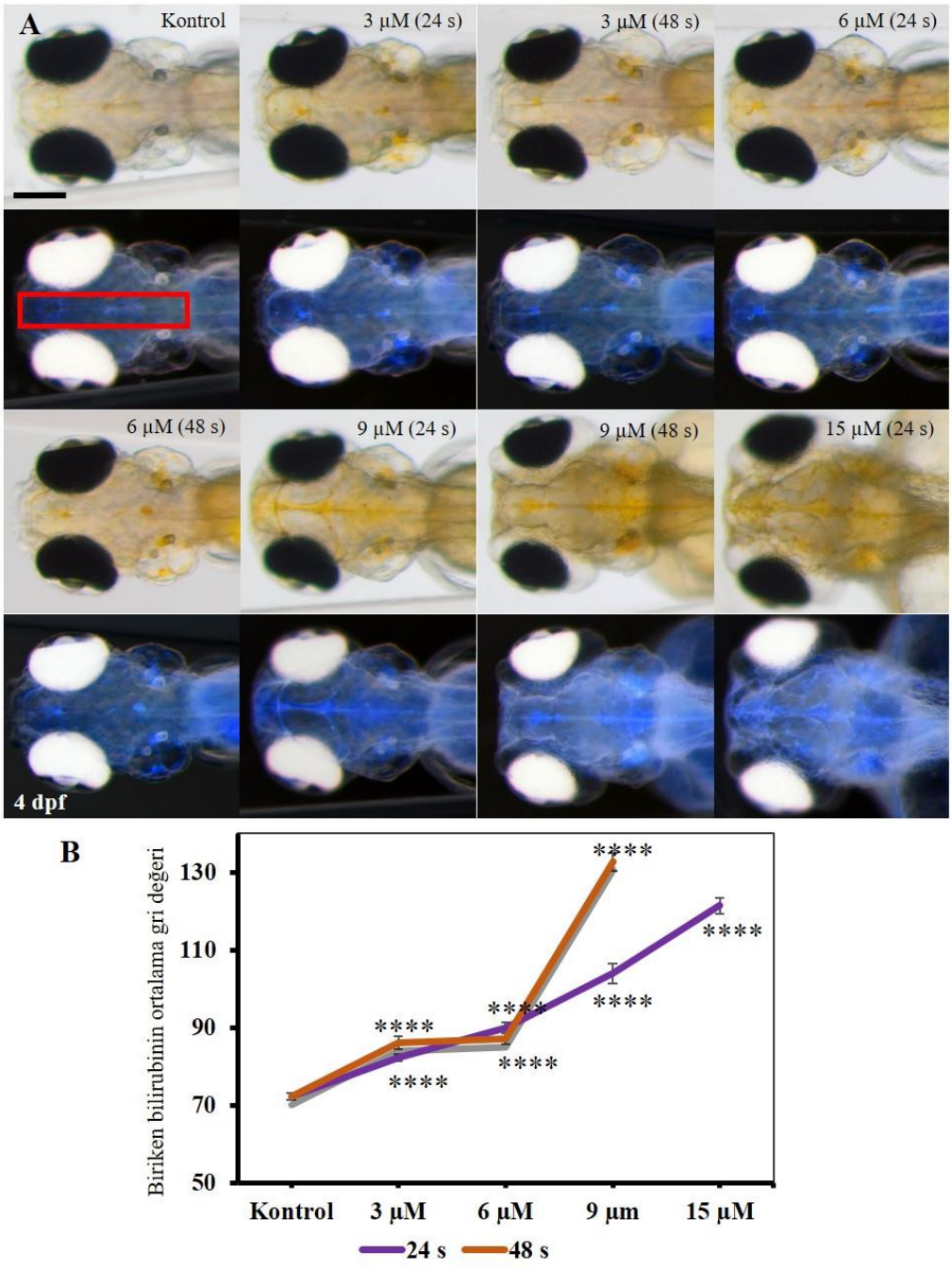
Bu bulgular, 2-3. günler arasında 9 µM bilirubin maruziyetinin toksik etkileri olan hiperbilirubinemiye neden olduğu, 15 µM'ın şiddetli hiperbilirubinemiye neden olduğu ve maruziyet süresinin 48 saate çıkarılması ile toksik etkilerin arttığı ve 9 µM bilirubinin şiddetli hiperbilirubinemiye 15 µM bilirubinin ise ölüme neden olduğu gösterilmiştir.

3-4 dpf arasında bilirubin maruziyeti

Bilirubinin vücuttan eliminasyonunda görev alan böbrek, bağırsak ve karaciğer dokularının larvada gelişimi 3-4. ve 5. günlerde tamamlanmaktadır (114, 117, 118, 119, 120). Bilirubin maruziyetini 3-4. günler arasında uygulayarak fazla bilirubinin bu organlardan eliminasyonu olup olmadığını test etmeyi amaçladık. Bu amaçlar 2-3. günler arasında patolojik hiperbilirubinemiye neden olan 9 µM ve 15 µM dozlarda bilirubin 3-4. günler arasında uygulandığında toksik etkiler çok daha az görülmüştür. Bu larvalar 4 dpf'te incelendiğinde 9 µM bilirubin maruziyetinin larvaların sadece % 10'unda (n=30), 15 µM bilirubin maruziyetinin larvaların %36,7'sinde (n=30) şiddetli fenotipe neden olduğu görülmüştür. 7. Güne kadar takip edildiğinde 9 ve 15 µM bilirubinin toksik etkilerinin larvaların yaklaşık olarak %43,3 ve %86,6'sında görüldüğü geri kalan larvaların ise sağlıklı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14C). Bu bulgular, 3. Günden sonra larvalarda bilirubin eliminasyonun kapasitesinin arttığını desteklemektedir. Larvalardan alınan parafin kesitlerinde bilirubinin bağırsak (Şekil 27 D ve E) ve karaciğer (Şekil 26 D ve E) dokularında görülmesi ve doku yapılarının sağlıklı olması da bunu desteklemektedir.

4.2. Sinir dokularında bilirubin birikiminin kantitatif analizi:

Yenidoğan hiperbilirubinemi hastalarında, bilirubinin kan-beyin bariyerini geçtiği, beyinde biriktiği ve ardından nörotoksik etkilere neden olduğu bilinmektedir (34). Zebra balığı yenidoğan hiperbilirubinemi modelinde gösterilen bilirubin birikimini ve bunun nörotoksik etkisini kantitatif olarak değerlendirmek için, 3, 4 ve 5 dpf'de beyinde biriken bilirubin larva beyninden dorsal görüntü alarak görüntülenmiştir (Şekil 17).



Şekil 16. 4 dpf larvaların beyin dokularında biriken bilirubin miktarının analizi. (A) Casper larvasına ait parlak alan görüntüleri ve belirtilen dozların beyin bölgelerine ait ters çevrilmiş görüntüler. Kırmızı kutu, B'de ölçülen bölgeyi gösterir. Ölçek çubukları: 200 µm. (B) Beynin orta kısmında biriken bilirubinin ortalama gri değeri ölçülerek (MGV) bilirubin miktarının belirlenmesi (A'da ters çevrilmiş görüntülerde kırmızı kutu bölgeleri içinde). Veriler Ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. (Kontrol, 3 µM (24 s), 3 µM (48 s), 6 µM (24 s), 6 µM (48 s), 9 µM (24 s), 9 µM (48 s) ve 15 µM (24 s) dozları için sırasıyla n=49, 16, 10, 13, 11, 28, 13 ve 13). ****P<0.0001 (tek kuyruklu t testi).

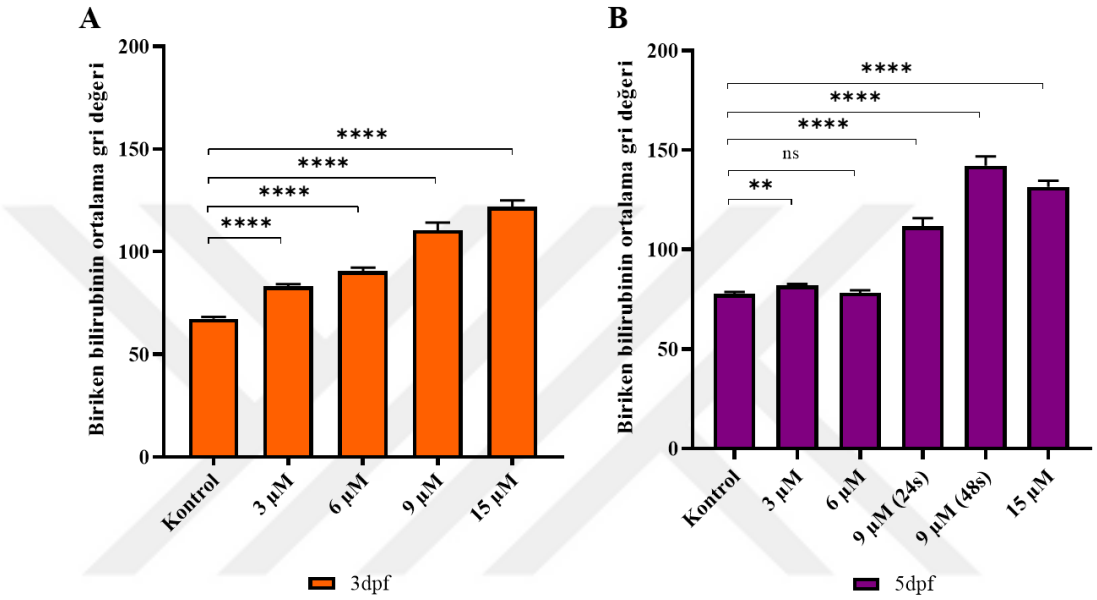
Beyin ve kulak yapılarında biriken bilirubin ve bu dokulardaki hasar uygulama dozuna bağlı olarak incelenmiştir. Düşük dozlarda bilirubinin (3 ve 6 µM) beyin ventriküllerindeki ve otik veziküldeki bölgelerde biriktiği tespit edilmiştir (Şekil 17A). Dozun 9 µM'a arttırıldığı durumda, beyin kompartmanlarının daha belirgin olduğu ve dokularda bilriubinin biriktiği belirgin bir şekilde görülmektedir. Özellikle arka beyin *(rhombensephalon)* bölgesinde birikim daha belirgindir. Yanal görüntüler (Şekil 12), bu birikimin yüzeye yakın olduğunu ve ventrikülden kaynaklandığını ancak arka beyin dokusunun derinliklerine nüfuz etmediğini göstermiştir.

Ayrıca, telensefalonda bilirubin birikiminin 9 µM dozunda daha belirgin bir şekilde görüldüğü tespit edilmiştir. Doz 15 µM'a arttırıldığı durumda ise, bilirubin beynin tüm kompartmanlarında aşırı derecede birikmiştir. Bu dozların maruziyet süreleri 48 saate çıkarıldığında ise düşük dozlarda bilirubin birikim düzeyleri artmış olsa da toksisite görülmemektedir. 9 µM dozda ise şiddetli toksik etkiye ek olarak bütün beyin kompartmanlarının ventriküllerinde ciddi bir şekilde bilirubin birikmiştir. 15 µM dozunda ise mortaliteye bağlı olarak gözlem yapılamamıştır (Şekil 17A).

Beyin ventriküllerindeki bilirubin artışını kantitatif olarak belirlemek için, 4 dpf larvalara ait parlak alan görüntüleri ImageJ yazılımı ile işlenmiş, negatif görüntüsü elde edilmiştir. Bu negatifler kullanılarak beyinde ventrikülleri içerisine alan orta alanda ortalama gri değerler (*MGV, mean gray value*) ölçülmüştür (Şekil 17B). Buna göre, kontrol ile karşılaştırıldığında, Şekil 6B'de belirtilen tüm bilirubin dozlarında önemli bir artış olduğu sonucuna varılmıştır ve artan dozlar ile birlikte bilirubinin beyinde birikiminin arttığı gözlemlenmiştir ($P<0.001$). Aynı dozların farklı maruziyet süreleri (24 saat ve 48 saat) kendi içlerinde karşılaştırıldığında, düşük dozlarda (3 ve 6 µM) belirgin bir fark gözlemlenmezken, 9 µM bilirubine 48 saat maruz kalan larvalarda beyinde bilirubinin ciddi düzeyde arttığı tespit edilmiştir ($P<0.001$). 48 saat 15 µM dozuna maruz kalan larvalar ise mortaliteden dolayı analiz edilememiştir. Özet olarak, artan dozlar ile (3, 6, 9 ve 15 µM) ve zamana bağlı olarak (24 saat ve 48 saat) beyindeki bilirubin birikimi artmıştır (Şekil 17).

4 dpf'de elde edilen bu sonuçlara ek olarak, 3 dpf ve 5 dpf' de bilirubinin beyindeki birikimi ölçülmüştür. Bilirubin maruziyetinin ilk günü olan 3dpf' de,

kontrole kıyasla her dozda bilirubin birikimine rastlanmıştır ve artan dozlara bağlı olarak artış gözlemlenmiştir (P<0.0001). 5 dpf' de ise 3 µM dozunda artıl anlamlıyken (P<0.01), 6 µM' da belirgin bir artış gözlemlenmemiştir. 9 ve 15 µM yüksek dozlarında ise şiddetli bilirubin birikimi gözlemlenmiştir (P<0.0001). Bu şiddetli dozlar kullanılarak 48 saat maruziyet yapıldığı durumda ise, 24 saate kıyasla, 9 µM dozunda ciddi bir bilirubin birikimi görülmüştür (Şekil 18).



Şekil 17. 3 dpf ve 5 dpf'de beyin dokularında bilirubin birikiminin analizi. Beynin orta kısmında biriken bilirubinin ortalama gri değeri ölçülerek (MGV) bilirubin miktarının belirlenmesi (A'da ters çevrilmiş görüntülerde kırmızı kutu bölgeleri içinde). Veriler Ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. (3 dpf serisi: Kontrol, 3, 6, 9 ve 15 µM dozları için sırasıyla n=20, 15, 12, 11 ve 11; 5 dpf serisi: Kontrol, 3, 6, 9 (24 s), 9 (48 s) ve 15 µM dozları için sırasıyla n=18, 14, 32, 11 ve 11). **p<0.01; ****p<0.0001; ns, anlamlı değil (tek kuyruklu t-testi).

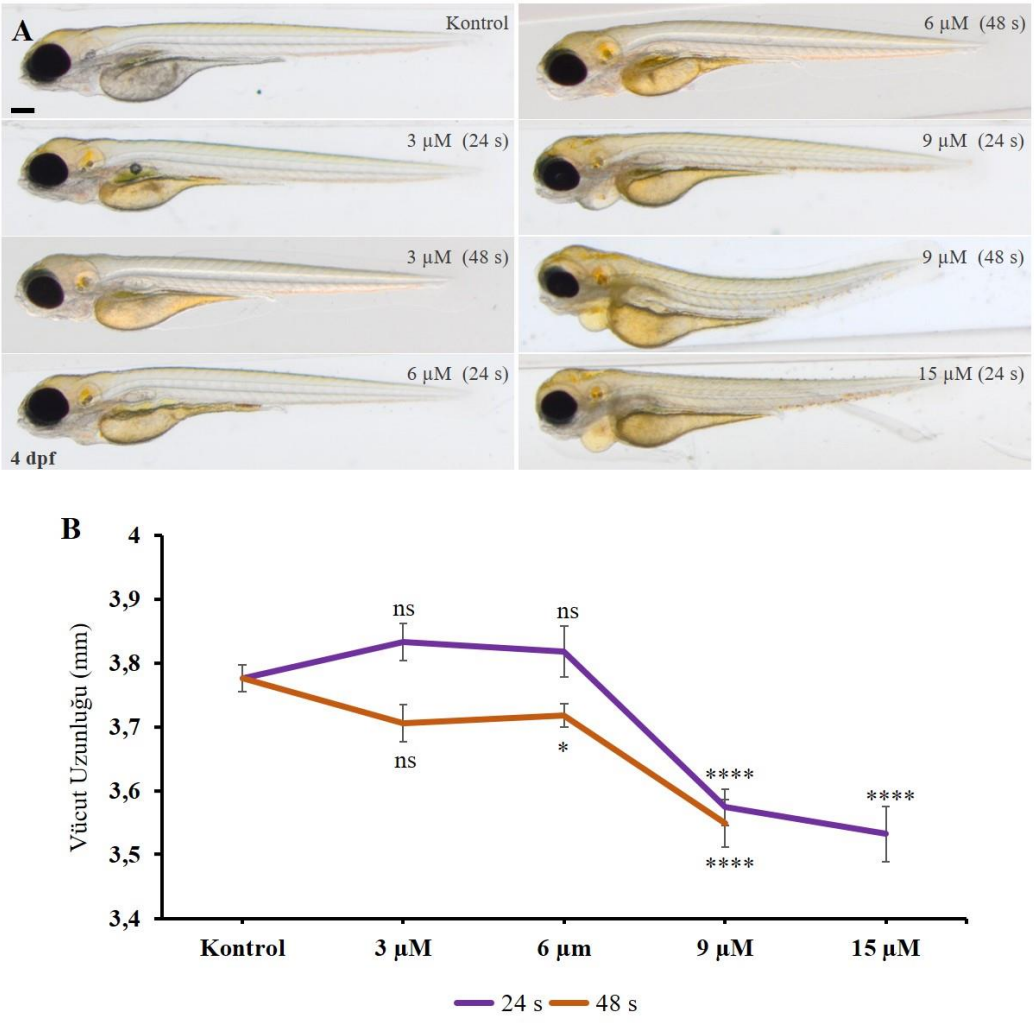
4.3. Zebrabalığı larvasında hiperblirubineminin gelişimsel ve nörolojik etkileri:

Hiperbilirubinemi fenotipinin oluşumunu daha fazla araştırmak için, bilirubine maruz kalan zebra balığı larvalarının vücut, kafa, göz ve otik vezikül (kulak) morfolojileri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Yenidoğanlarda görülen etkilerle karşılaştırılabilir gelişimsel gecikmeyi kantitatif olarak göstermek için vücut uzunluğu analiz edildi. Ayrıca, yenidoğanlarda bulunmayan ancak toksisite vakalarında zebrabalığına özgü olan kafada ve göz çevresinde görülen ödem ve otik veziküllerin büzülmesi gibi şiddetli fenotipik etkiler için nicel değerlendirmeler yapıldı.

4.3.1. Vücut uzunluğu

2-3 dpf ve 2-4 dpf arasında çeşitli konsantrasyonlarda bilirubine maruz kalan larvaların vücut uzunlukları 4 dpf'de görüntülenerek vücut ölçümleri alınmıştır (Şekil 19A). Bunun sonucunda, 3 µM ve 6 µM düşük dozlarda 24 saat bilirubin maruziyeti sonucunda kontrole kıyasla anlamlı bir vücut değişimi gözlemlenmezken, maruziyet süresinin 48 saate çıkarıldığı durumda sadece 6 µM'da vücut uzunluğunda düşüş gözlemlenmiştir ($P<0.05$). 9 µM ve 15 µM yüksek dozlarında ise hem 24 saatlik maruziyet hemde 48 saatlik maruziyet sonucunda vücut uzunluklarında şiddetli bir düşüş ve vücutlarının geriye doğru kıvrıldığı gözlemlenmiştir ($P<0.001$). Ancak 15 µM dozuna 48 saat maruz kalan larvalarda mortaliteye bağlı ölçüm alınamamıştır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, bilirubin konsantrasyonun ve maruziyet süresinin artması ile bilirubinin toksik etkilerinin artışıyla larvaların bağ dokusunun ve kasların etkilenmesine bağlı olarak vücut uzunluğunun şiddetli bir şekilde etkilendiği sonucuna varılmıştır. Yenidoğanlarda görülen gelişimsel gerilik durumlarına benzer olarak zebrabalığında şiddetli fenotipe bağlı olarak vücutlarının kısaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 19B). Buna ek olarak yenidoğanlarda kasların gerilmesi sonucu oluşan opistotonus'a benzer olarak bazı zebrabalığı larvalarında vücutlarının geriye doğru kıvrıldığı görülmüştür.



Şekil 18: Casper larvalarının vücut uzunluğunun 4dpf'de analizi. A) 4 dpf'de parlak alan görüntülerine dayalı olarak artan bilirubin dozlarında (3, 6, 9 ve 15 µM) ve maruziyet sürelerinde (24s ve 48s) bilirubinin toksik etkisine bağlı olarak vücut uzunluklarının azalması. Ölçek çubuğu: 200 µm. B) Bilirubine maruz kalan larvaların vücut uzunluklarının kantitatif olarak gösterimi. Veriler Ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. (Kontrol için n=24; 24 saat serisi: 3, 6, 9 ve 15 µM için n=24, 14, 10, 28 ve 17; 48 saat serisi: 3, 6 ve 9µM için n= 10, 10 ve 15). *P<0.05; ****P<0.0001; NS, anlamlı değil (tek kuyruklu t-testi).

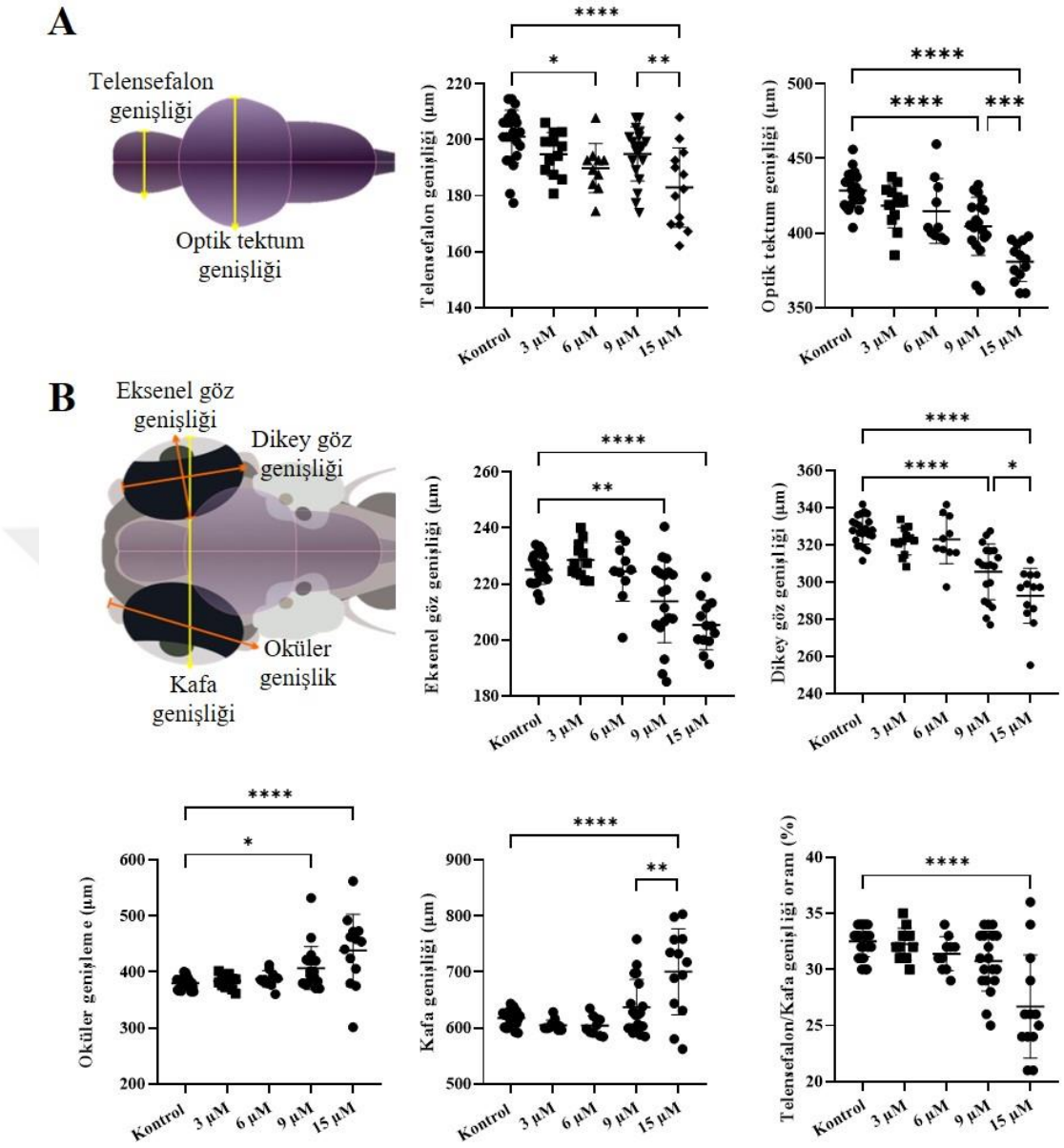
4.3.2. Beyin ve göz gelişimi

Yenidoğanlarda bilirubinin sinir sisteminde ciddi hasara neden olduğu bilinmektedir (33). Zebrabalıklarında beyin ve göz gibi sinir dokularında artan bilirubin nörotoksisitesine bağlı olarak zebrabalığı larvalarında kafa ve göz bölgelerinde ödem gibi şiddetli bir fenotip sergilenmiştir. Şekil 15'te gösterilen bu

şiddetli fenotip; 24 saat (2-3 dpf) boyunca bilirubine maruz kalan 4 dpf'teki larvalardan alınan görüntüler (Şekil 13) kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir ve sonuçlar Şekil 20' de sunulmuştur.

3, 6, 9 ve 15 µM gibi farklı dozlarda bilirubine maruz kalan larvalarda morfolojik farklılıklardan yola çıkarak telensefalon ve optik tektum genişliği ölçülmüştür (Şekil 20A). Ek olarak, eksenel ve dikey göz genişliği, oküler genişleme ve kafa genişliği analiz edilmiştir. Kafada görülen ödemin beyindeki telensefalon bölgesine olan etkisini analiz etmek için telensefalon ve kafa genişliği arasındaki ilişki değerlendirilmiştir (Şekil 20B).

Telensefalon ölçüm sonuçlarına göre, 6 µM ve 15 µM bilirubine maruz kalan larvaların telensefalon beyin bölgesinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir (sırasıyla $P<0.01$ ve $P<0.0001$). İlginç bir şekilde, 9 µM telensefalon ölçüm sonuçları kontrole kıyasla önemli bir düşüş sergilememiştir. Beynin optik tektum bölgesinde ise hem 9 µM ($P<0.0001$) hem de 15 µM ($P<0.0001$) dozlarında optik tektumun genişliğinin dramatik bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 20A).



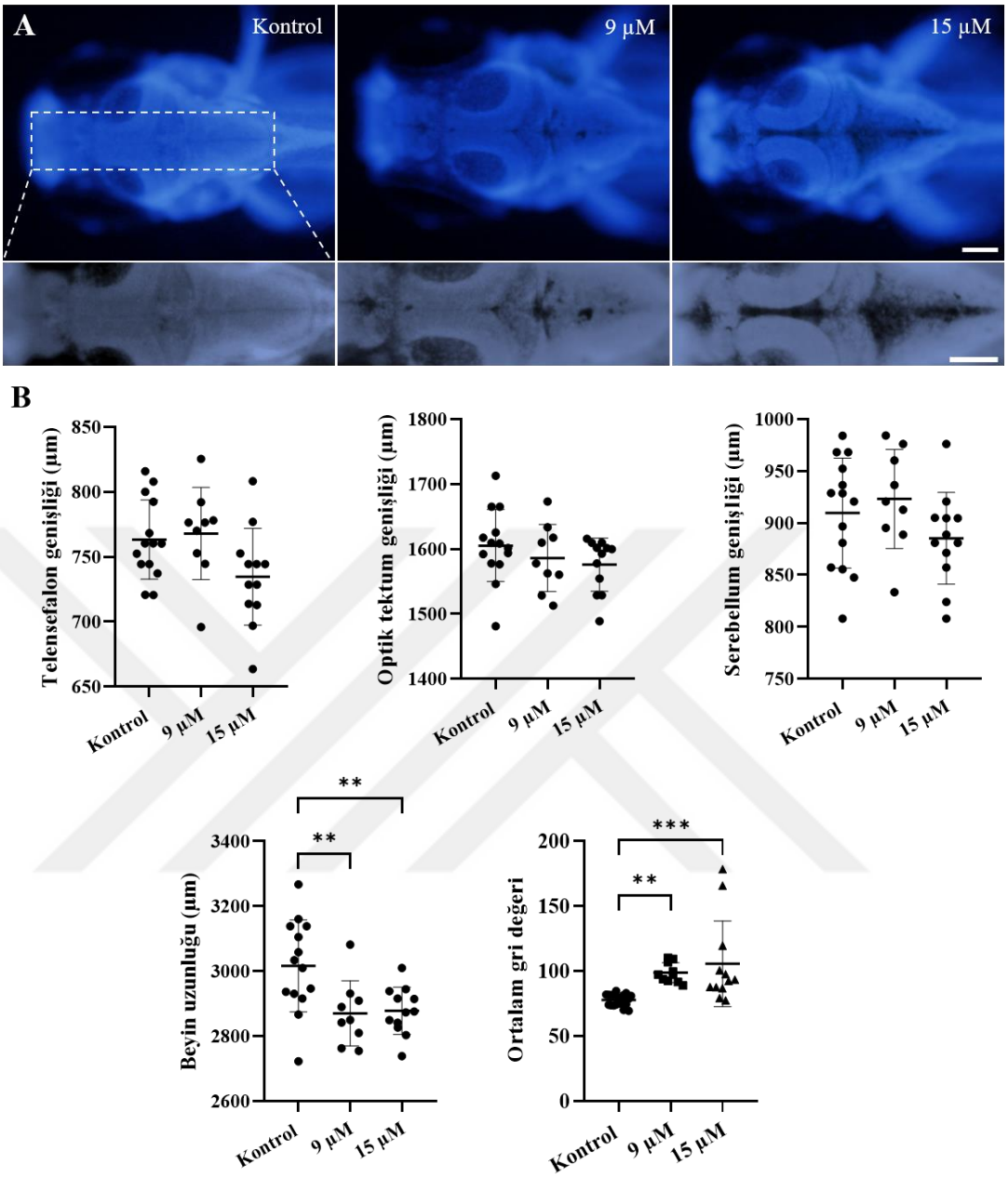
Şekil 19. Beyin ve göz kompartmanlarının genişliğinin analizi (4 dpf). 2-3 dpf zaman aralığında 3, 6, 9 ve 15 µM dozlarında bilirubine maruz kalan larvalara ait: (A) Telensefalon ve optik tektum genişliği ölçümü ve (B) Eksenel ve dikey göz uzunluğu, oküler genişleme, kafa genişliği ve telensefalon/kafa genişliği oranının ölçümü ve ölçüme ait şematik gösterimler. Veriler Ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. (Kontrol, 3, 6, 9 ve 15 µM için sırasıyla: n=24, 12, 10, 19 ve 13). *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001 (tek kuyruklu t-testi). (Metehan Güzelkaya yardımlarıyla)

9 µM bilirubine maruz kalan larvalarda dikey ve eksenel göz genişliklerinde (sırasıyla P<0.0001 ve P<0.01) önemli bir azalma görülürken 15 µM'da ise her iki ölçüm sonucunda dramatik bir düşüş gözlemlenmiştir (P<0.0001). Gözün etrafındaki oküler dokunun ölçüm sonuçlarında ise ödeme bağlı olarak 9 µM dozunda P<0.05

değerinde bir artış gözlemlenirken 15 µM'da P<0.0001 olarak ciddi bir genişleme tespit edilmiştir. Şiddetli fenotip belirtilerinden biri olan kafa bölgesinde görülen ödemin kantitatif değerlendirilmesi için yapılan ölçümlerine göre ise, 9 µM'da fenotipik varyasyonların artışına bağlı olarak kontrole kıyasla anlamlı bir kafa genişlemesi sonucu elde edilememiştir. 15 µM dozunda ise P<0.0001 değerinde ciddi bir kafa genişlemesi tespit edilmiştir (Şekil 20B).

Elde edilen bu bulgulardan yola çıkarak telensefalon ve kafa genişliği arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi sonucunda ise, telensefalonda görülen düşüşünde ve kafa genişliğindeki artışında bir korelasyon olup 15 µM dozunda önemli düzeyde (P<0.0001) bir fark gözlemlenmiştir (Şekil 20B).

Şekil 20'da elde edilen tüm kantitatif sonuçlardan yola çıkarak, eksenel ve dikey göz yapılarının küçülmesi ve göz çevresindeki oküler dokunun ödeme bağlı genişlemesi ile beynin optik tektum bölgesinin arasında şiddetli dozlarda (9 ve 15 µM) bir korelasyon gözlemlenmiştir. Kafa bölgesinde görülen ödem ile ise beynin telensefalon bölgesi arasında 15 µM şiddetli dozunda önemli düzeyde bir ilişki gözlemlenmiştir.



Şekil 20. Bilirubine maruz kalan larvaların beyninin görüntülenmesi ve beyin morfolojilerinin analizi. (A) 9 ve 15 µM dozları altında 4 dpf'de floresan DAPI görüntüleri. Beyaz kutu, beynin yakından görünümünü gösterir. Ölçek çubukları: 100 µm. (B) Telensefalon, optik tektum ve serebellum (rhombensefalon) genişliklerinin, beyin dorsal uzunluğunun ve birikmiş bilirubinin ortalama gri değerinin ölçülmesi. Veriler Ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. (Kontrol, 9 µM ve 15 µM için sırasıyla: n=14, 9 ve 9). **P<0.01; ***P<0.001 (tek kuyruklu t testi). (Metehan Güzelkaya yardımlarıyla)

Stereomikroskop görüntülerinden elde edilen bulguların doğrulanması için zebrabalığı larvaları fikse edilmiş DAPI ile boyanmış ve ardından epifloresan mikroskopta beyin görüntüleri alınmıştır. Şekil 21'de, 9 µM ve 15 µM yüksek doz

bilirubine maruz kalan larvalardan alınan floresan görüntülerinde beyin kompartmanlarının kantitatif analizi yapılmıştır. Şekil 21A'da bilirubine maruz kalan larvalarda beyin kompartmanlarına ait sınır çizgilerinin biriken bilirubin ile daha da belirginleştiği gözlemlenmiştir. 9 µM dozunda bilirubin birikimi nispeten daha azdır. 15 µM'da ise beynin telensefalon, optik tektum, mezensefalon ve serebellum (rhombensefalon) bölgelerindeki ventriküllerde yoğun bir şekilde bilirubin biriktiği gözlemlenmiştir. 9 µM dozunda ise nispeten birikim daha az olup telensefalon ve serebellum bölgelerindeki ventriküllerde az miktarda birikme gözlemlenmiştir.

Şekil 21B'de telensefalon, optik tektum, mezensefalon ve serebellum (rhombensefalon) gibi beyin kompartmanlarının genişliği, beynin dorsal uzunluğu ve biriken bilirubinin kantitatif ölçümü yer almaktadır. Bulgular incelendiğinde, 9 µM bilirubine maruz kalan larvaların sadece optik tektum bölgesinde bir küçülme gözlemlenmiştir. 15 µM'da ise tüm beyin kompartmanlarının eksenel genişliklerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ancak her iki doza ait bu sonuçlar kantitatif olarak değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Beynin dorsal uzunluğunun ölçüm sonuçlarına göre, hem 9 µM ($P<0.01$) hem de 15 µM ($P<0.01$) dozlarında beynin anlamlı düzeyde kısaldığı saptanmıştır. Beynin telensefalon, optik tektum, mezensefalon ve rhombensefalon bölgelerindeki ventriküllerde biriken bilirubinin ortalama gri değeri ölçüldü ve hem 9 µM ($P<0.0001$) hem de 15 µM ($P<0.0001$) dozlarında beyinde dikkate değer bir şekilde bilirubin birikimi tespit edilmiştir.

4.3.3. Hiperbilirubineminin histoplatojik etkilerinin incelenmesi:

Bilirubin maruziyetinindokularda yarattığı hücresel değişimlerin incelenmesi için histopatolojik incelemeler yapılmıştır. Farklı maruziyet süreleri ve şiddetli fenotipin görüldüğü yüksek dozlar kullanılarak beyin ve otik vezikül (kulak) gibi sinir ve sensörimotor dokularında nörotoksik etkiler ve karaciğer ve gut gibi çeşitli organlarda bilirubin metabolizması gözlemlenmiştir.

Yenidoğan dönemine karşılık geldiği düşünülen 2-3 dpf arasında ve bilirubini metabolize edecek organların gelişmeye başladığı dönem sonrası 3-4 dpf arası bilirubin maruziyeti yapılmıştır. Şiddetli fenotipin tespit edildiği 9 µM ve 15 µM

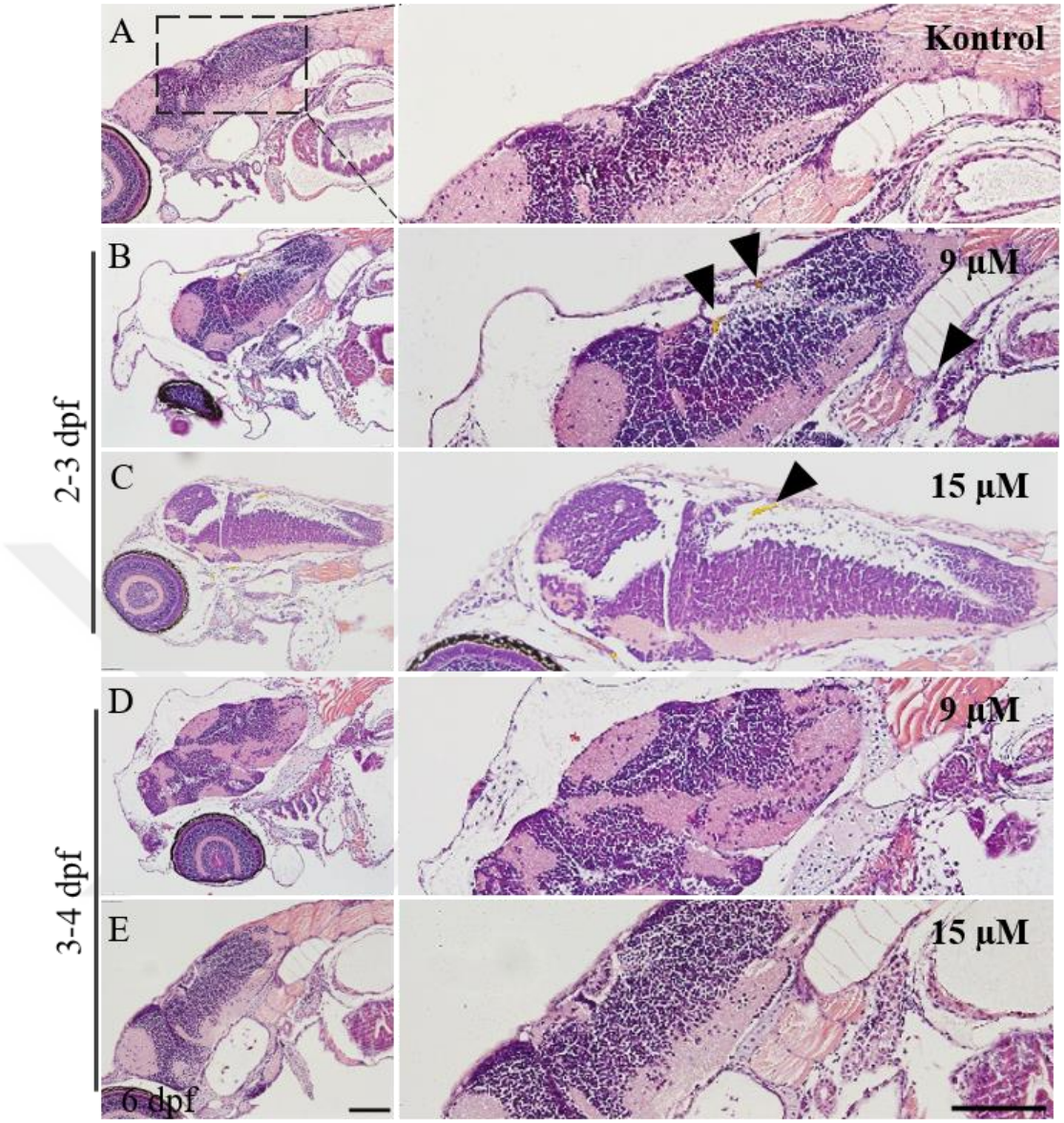
yüksek dozlarında bilirubin uygulanarak 6 dpf'de histopatolojik analiz yapılmıştır ve bilirubin varlığının tespit edildiği dokular görüntülenmiştir.

***Nöral toksisitenin beyin histopatoloji analizi ile gösterilmesi*:**

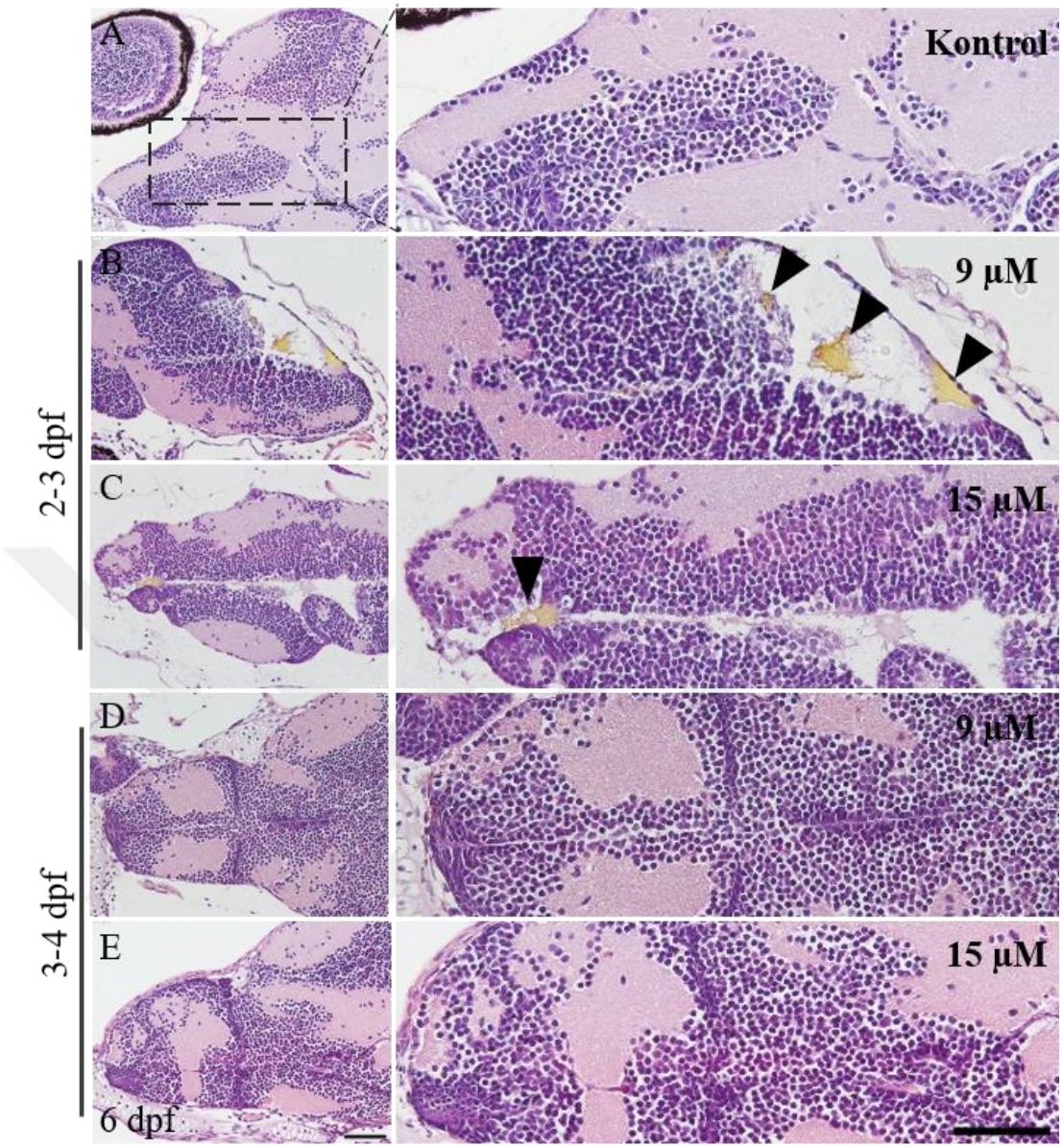
Yenidoğanlarda bilirubinin vücuttan elimine edilemediği durumda kan-beyin bariyerini aşarak beyin dokusuna nüfuz ettiği ve nörotoksisiteye olduğu bilinmektedir (32). Bunun sonucunda bilirubine maruz kalan larval dönemdeki zebrabalıklarının beyin dokuları histopatolojik olarak gözlemlenmiştir.

2-3 dpf arasında yapılan bilirubin maruziyeti sonucu, 9 µM dozunda beynin rhombensefalon bölgesindeki ventriküllerde belirgin bir şekilde bilirubin birikimi tespit edilmiştir. Yanal ve dorsal kesitlere göre, 15 µM dozunda ise telensefalon ve rhombensefalon bölgelerinde bilirubin birikimi gözlemlenmiştir (Şekil 22 ve Şekil 23). 3-4 dpf arasında 9 ve 15 µM bilirubin yüksek dozları uygulandığında ise, beynin hem yanal (Şekil 22) hem dorsal (Şekil 23) görüntülerinde dokularda bilirubine rastlanmıştır.

Buna ek olarak morfolojilerinde bozukluklar gözlemlenmektedir. Özellikle Şekil 22B ve 22D'de beyin yapısınındaki morfolojik bozukluklar görülmektedir. Buna ek olarak şekil 20'de beyin ve kafa ölçümleriyle tutarlı olarak kafa ödemi görülen larvaların beyin ebatları ile bağlantılı bir şekilde küçüldüğü gözlemlenmiştir.



Şekil 21: Bilirubin uygulanan larvaların beyninin histopatoloji görüntüleri (yanal). Farklı zaman dilimlerinde (2-3 dpf ve 3-4 dpf), 9 ve 15 µM bilirubin uygulanan larvaların 6 dpf'de histopatolojik olarak analizi. Siyah kutu, beynin yakından görünümünü gösterir. Siyah oklar biriken bilirubini gösterir. Ölçek çubukları: 100 µm (Emine Gelinci ve Metehan Güzelkaya yardımlarıyla)

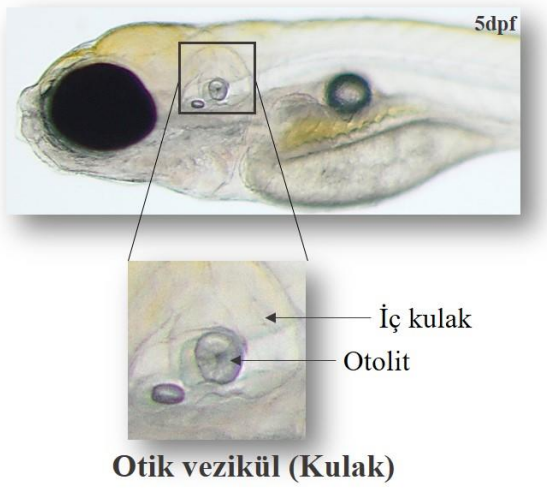


Şekil 22: Bilirubin uygulanan larvaların beyninin histopatoloji görüntüleri (dorsal). Farklı zaman dilimlerinde (2-3 dpf ve 3-4 dpf), 9 ve 15 µM bilirubin uygulanan larvaların 6 dpf'de histopatolojik olarak analizi. Siyah kutu, beynin yakından görünümünü gösterir. Siyah oklar biriken bilirubini gösterir. Ölçek çubukları: 50 µm (Emine Gelinci ve Metehan Güzelkaya yardımlarıyla)

Ototoksisitenin histopatolojik incelemesi

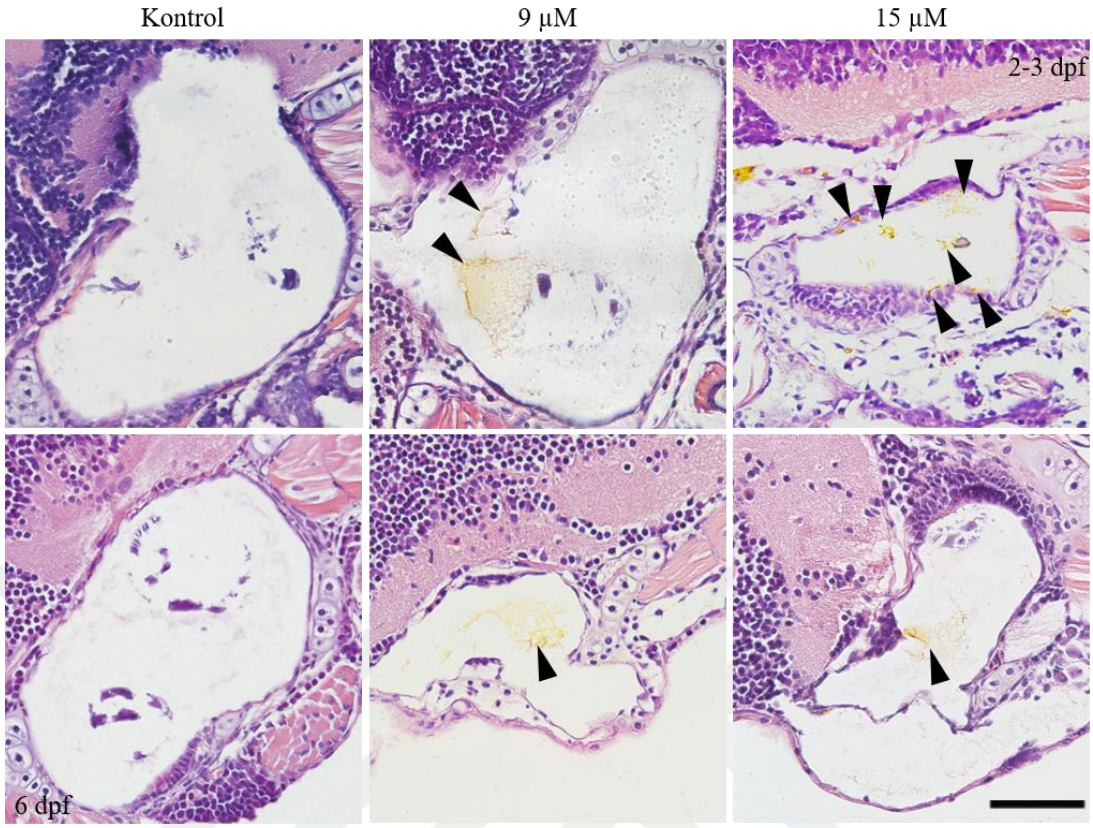
Yenidoğanlarda, bilirubin nörotoksisitesine bağlı olarak işitsel fonksiyonların etkilendiği, kernikterus durumunda ise sensörinöral işitme kaybı gibi kalıcı nörolojik sekeller gözlemlenir (55, 56, 57). Zebrabalığı larvasında gelişen otik veziküller, otolit taşlarını ve iç kulağı içeren bir yapıdır (Şekil 24). Otik veziküller, neuromast gibi

mekanosensör yapılar ile birlikte işitmeyi sağlar ve denge ve hareket için önemli olan vestibüler sistemde rol alırlar (144).



Şekil 23: Otik vezikül yapısının gösterimi. İç kulak ve otolit taşlarından oluşan kulak yapısının 5 dpf'de parlak alan görüntüsü.

Farklı zaman dilimlerinde bilirubine maruz kalan zebrabalığı larvalar histopatolojik olarak incelendiğinde, hem 9 µM hem de 15 µM bilirubine maruz kalan larvaların her iki zaman diliminde de (2-3 dpf ve 3-4 dpf) otik veziküllerin iç kısmında bilirubin birikimi gözlemlendi. Özellikle 2-3 dpf arasında 15 µM dozunda, otolitlerin bulunduğu bölgede ve iç kulakta hücreler arasında bilirubin birikimine rastlanmıştır. Kulak morfolojisinin ise deforme olduğu ve fark edilebilir düzeyde küçük olduğu gözlemlenmiştir. 3-4 dpf'de 9 µM ve 15 µM dozlarında ise görüntüler dorsolateral olarak görüntülenmiş olsa da iç kulak yapısının hafif düzeyde küçüldüğü ve bilirubinin otolitlerin bulunduğu bölgede biriktiği gözlemlenmiştir (Şekil 25).



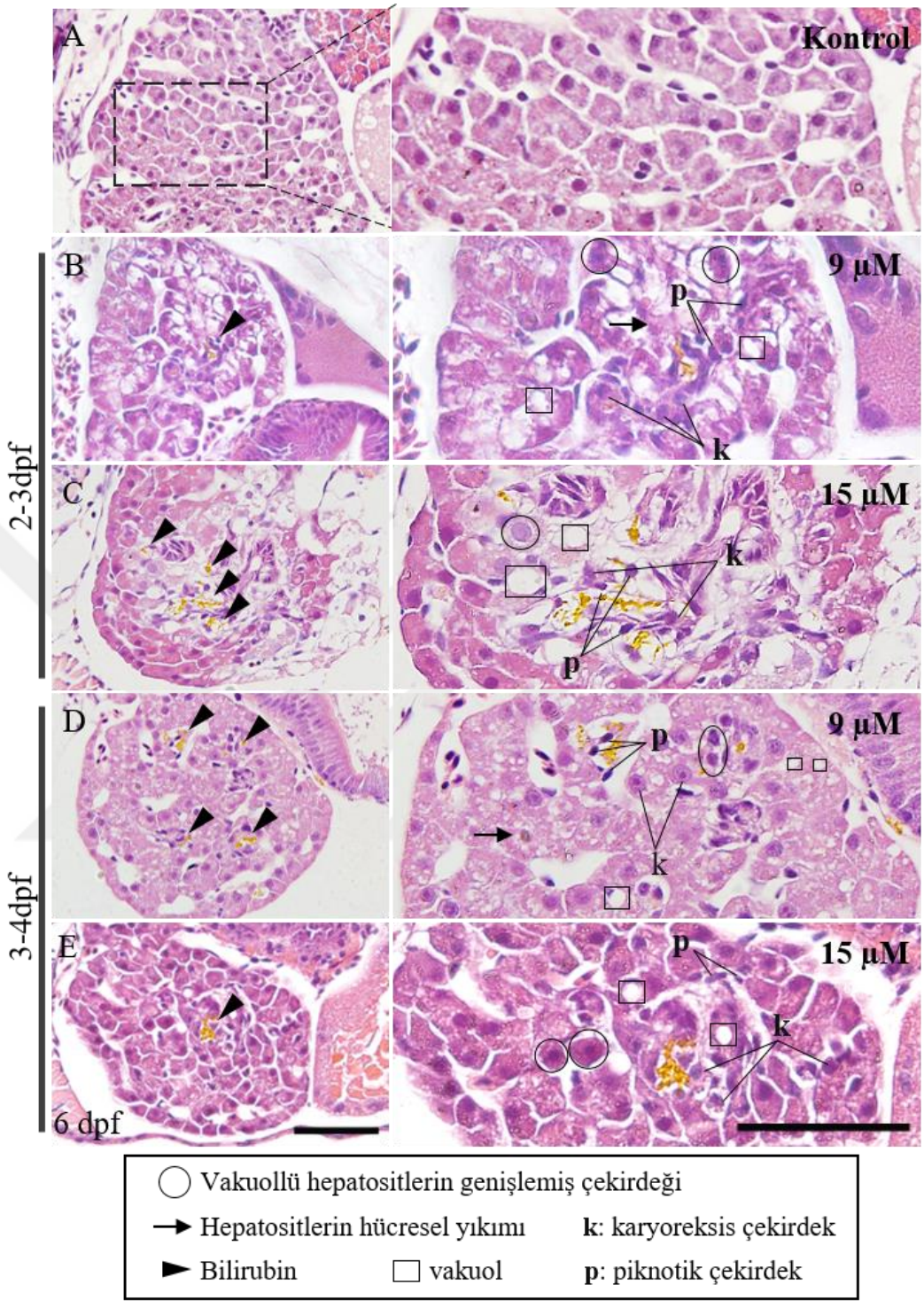
Şekil 24: Bilirubin uygulanan larvaların otik veziküllerinin histopatoloji görüntüleri. Farklı zaman dilimlerinde (2-3 dpf ve 3-4 dpf), 9 ve 15 µM bilirubin uygulanan larvaların 6 dpf'de histopatolojik olarak analizi. Siyah oklar biriken bilirubini gösterir. Ölçek çubuğu: 50 µm (Emine Gelinci ve Metehan Güzelkaya yardımlarıyla)

Hiperbilirubineminin Karaciğer dokusundaki etkileri:

Yenidoğan dönemi olan 2-3 dpf'de bilirubin uygulanan balıkların karaciğer dokusu 6 dpf'de histopatolojik inceleme yapılarak incelenmişltir. 2-3 dpf ve 3-4 dpf olmak üzere her iki zaman diliminde ve 9 ve 15 µM bilirubin dozlarında bütün larvaların karaciğerlerinde bilirubine rastlanmıştır.

Buna ek olarak, bilirubine maruz kalan larvaların karaciğerlerinde, hücre çekirdeklerinin yoğun ve kompakt hale geldiği piknotik hücre ölümü ve parçalanmaya başladığı karyoreksis gözlemlenmiştir. Geniş ölçüde, vakuollü hepatositlerin genişlemiş çekirdeklerine rastlanmıştır ve hepatositlerde hücresel yıkımlar görülmüştür. Hepatosit hücrelerinin dışında da vakuollere rastlanmıştır (145).

Özellikle henüz karaciğerin gelişmediği dönemde (2-3 dpf) bilirubine maruz kalan larvaların karaciğer yapılarının çok fazla deforme olduğu görülmektedir (Şekil 26 B ve C). 9 µM dozunda piknotik ve karyoreksik hücrelere daha fazla rastlanmıştır (Şekil 26 B). 15 µM dozunda ise karaciğer morfolojisinde yoğun bir değişim gözlemlenmektedir. Vakuol yoğunluğunun arttığı, piknotik ve karyoreksik hücrelerinin arttığı ve hücresel yıkımın daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 26 C). Karaciğer yapısının gelişim sürecinin başladığı (3-4 dpf) dönemde bilirubine maruz kalanlarda ise, karaciğer yapısının bütünlüğünün daha fazla korunduğu ve daha az yapısal bozuklukların olduğu görülmektedir (Şekil 26 D ve E). 9 µM dozunda vakuol yapıları daha küçükken 15 µM da daha geniş yapılara rastlanmıştır. 9 µM dozunda piknotik ve karyoreksik hücre sayıları 15 µM dozuna kıyasla daha azdır.



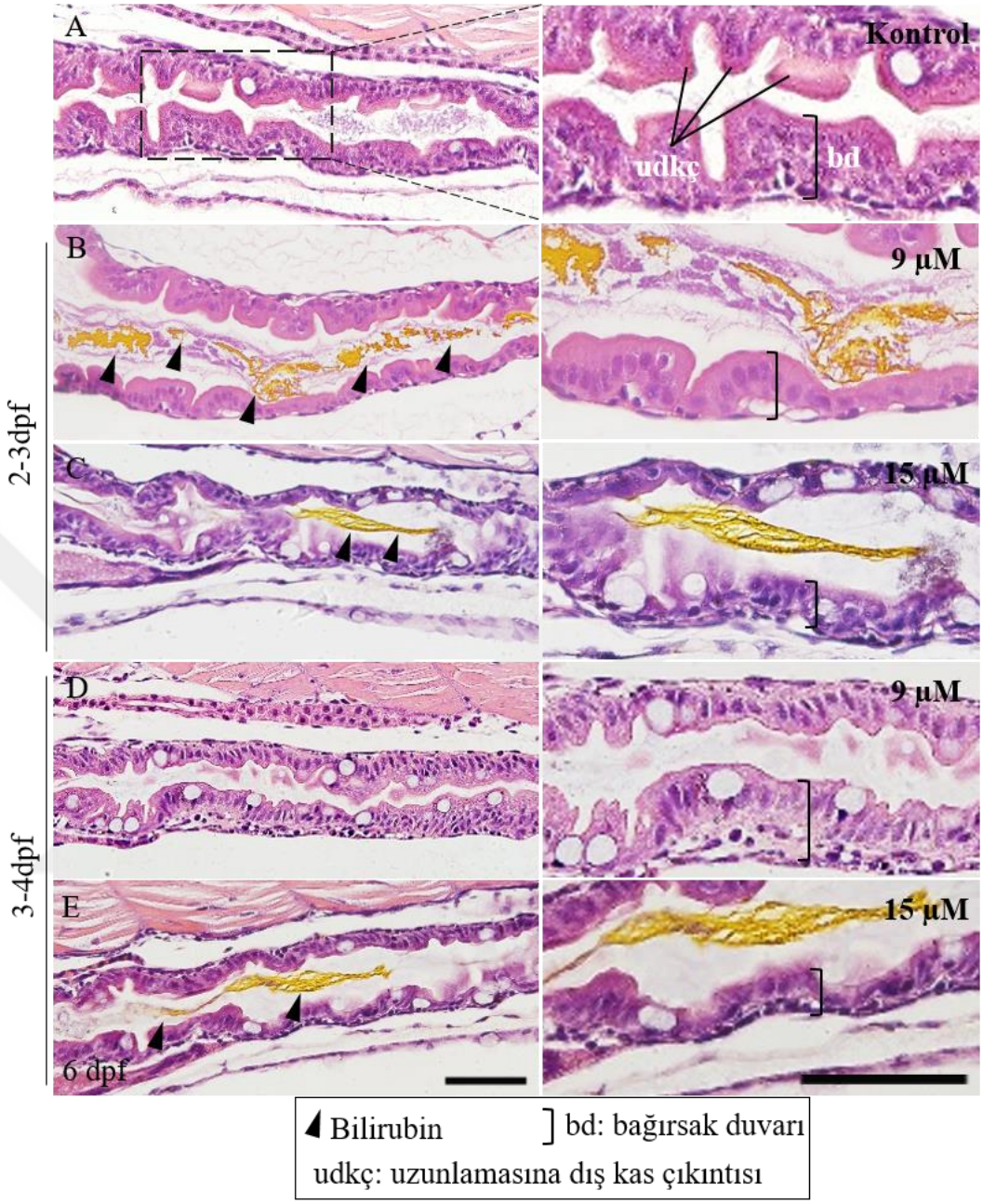
Şekil 25: Bilirubin uygulanan larvaların karaciğerlerine ait histopatoloji görüntüleri. Farklı zaman dilimlerinde (2-3 dpf ve 3-4 dpf), 9 ve 15 µM bilirubin uygulanan larvaların 6 dpf'de histopatolojik olarak analizi. Siyah kutu, karaciğerin yakından görünümünü gösterir. Ölçek çubukları: 50 µm (Emine Gelinci ve Metehan Güzelkaya yardımlarıyla)

Hiperbilirubineminin gastrointestinal sistemindeki etkileri:

Maruziyet ve eliminasyon sürecinde gastrointestinal sistemin yapısı histopatolojik olarak 6 dpf'de incelenmiştir.

Gastrointestinel sistemin gelişimin henüz başlamadığı zaman aralığında (2-3 dpf) bilirubine maruz kalan larvalar gözlemlendiğinde, intestinal sisteminde bilirubine rastlanmıştır, bu eliminasyon yolağı olabileceği gibi birikim olarak da nitelendirilebilir. 9 µM dozunda, uzunlamasına dış kas çıkıntılarının azaldığı ve bağırsak duvarının inceldiği görülmektedir. 15 µM dozunda ise bilirubinin vücuttan uzaklaştırılamadğı görülmektedir. Bağırsak dokusunun ise ciddi şekilde tahrip olduğu gözlemlenmektedir. Buna bağlı olarak uzunlamasına dış kas çıkıntılarının kaybolduğu ve bağırsak duvarının deforme olduğu görülmektedir. Çekirdeklerin kompakt hale geldiği piknotik hücre ölümüne bu dokularda da rastlanmaktadır.

Gastrointestinel sistemin gelişimin başladığı (3-4 dpf) dönemde 9 µM bilirubine maruz kalan larvalarda ise bilirubin vücuttan atıldığı ve bağırsak sisteminde birikmediği görülmüştür. Bağırsak yapısında bulunan uzunlamasına dış kasların daha az tahrip olduğu ve bağırsak duvarının daha kalın olduğu görülmektedir. 15 µM dozunda ise, bilirubinin henüz atılamadığı, uzunlamasına dış kasların kaybolduğu, bağırsak duvarının inceldiği ve piknotik hücre çekirdeklerinin varlığı görülmektedir (Şekil 27).



Şekil 26: Bilirubin uygulanan larvaların gastrointestinal sisteminin histopatolojik olarak incelenmesi. 2-3 dpf ve 3-4 dpf zaman aralığında 9 ve 15 µM bilirubine maruz kalan larvaların gastrointestinal sisteminde bilirubin varlığına bağlı olarak eliminasyon sürecinin ayrıntılı olarak takibi (6 dpf). Siyah kutu, intestinal sistemin yakından görünümünü gösterir. Ölçek çubukları: 50 µm. (Emine Gelinci ve Metehan Güzelkaya yardımlarıyla)

4.4. Zebrabalığı hiperbilirubinemi modelinde nörolojik işlevlerin test edilmesi:

Yenidoğanlarda bilirubin nörotoksisitesi sonucu ciddi sakatlıklara kadar çeşitli şiddetlerde nörolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Kernikterus en şiddetli nörolojik sorunlardan biri olup sonucunda yukarıya bakış kısıtlığı, sensörinöral işitme kaybı ve koreatetoid serebral palsi gibi kalıcı sekeller görülebilir (55, 56, 57). Akut bilirubin ensefelopatisi geliştiğinde ise yürüme fonksiyonlarında, işitmede ve görsel kortikal yolaklarda nöromotor sorunlar gözlemlenebilir (35, 36, 37, 38). Zebrabalığı larvalarında bilirubin nörotoksisitesini ayrıntılı olarak incelemek için bakış kısıtlılığı testi ve serbest yüzme davranış testi yapılmıştır.

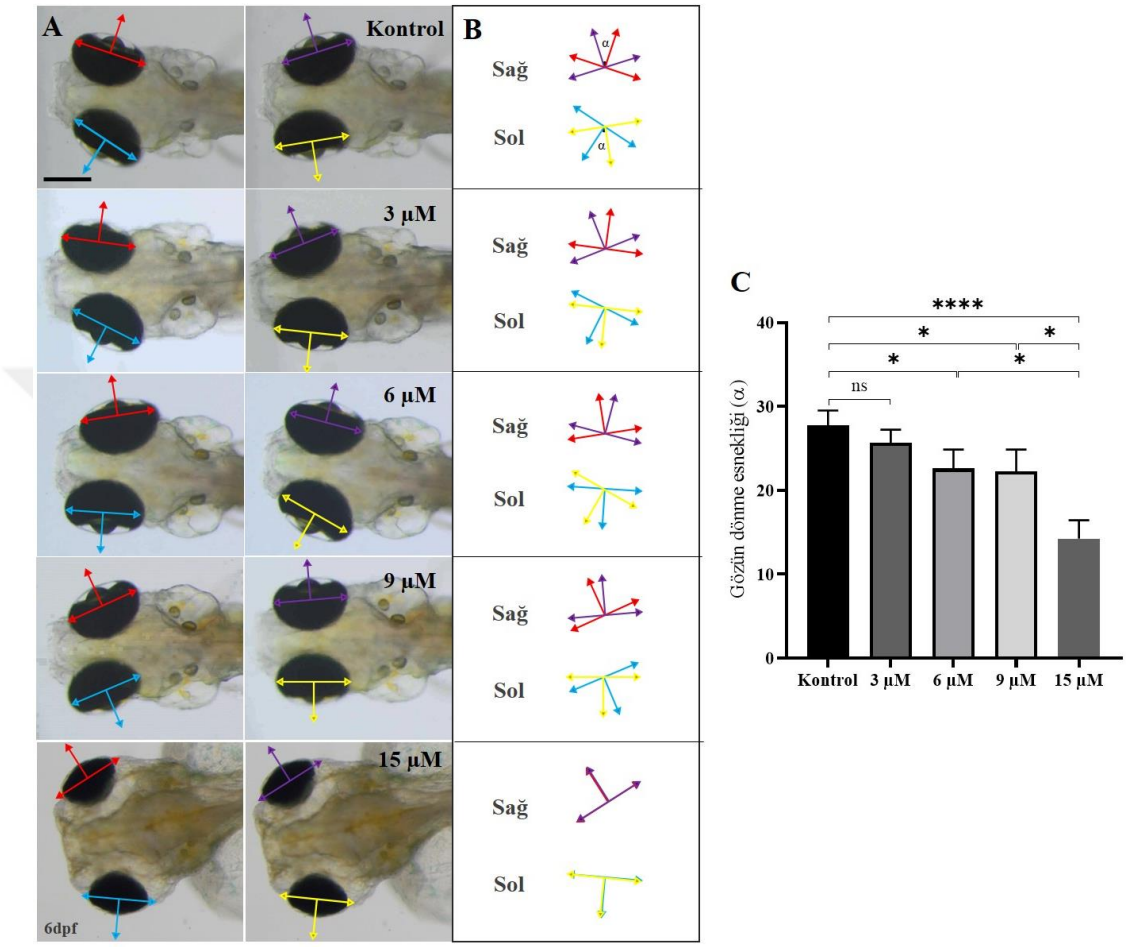
4.4.1. Bakış kısıtlılığı testi

Bilirubine maruz kalan zebrabalığı larvalarında göz kaslarını ve göz hareketlerini gözlemlemek ve fonksiyonlarını değerlendirmek için ışık uyaranlarıyla göz refleksleri test edilmiştir. Karanlık ardından gelen ışık uyaranına tepki verilme durumunda gözlerin dönme açıları hesaplanarak bilirubin nörotoksisitesi sonucu bakış kısıtlılığı gelişip gelişmediği incelenmiştir.

Bilirubinin düşük dozları (3 ve 6 µM) ve yüksek dozları (9 ve 15 µM) kullanılarak 2-3 dpf zaman aralığında maruziyet yapılmıştır, ve 6 dpf'de ışık uyaran testi uygulanmıştır. Şekil 28A' da, gözlerin yönünü tespit etmek için T şeklinde ok çizgileri çizilmiştir, ve ışık uyaranı sonrası en uç zıt yönlerdeki göz pozisyonları tespit edilerek öncesi-sonrası için mor-kırmızı (sağ göz) ve mavi-sarı (sol göz) renginde ok çizgileri ile gösterilmiştir. Gözün fonksiyonları ve dönme esnekliği, alfa dönüş açısı kullanılarak hesaplanmıştır.

3, 6, 9 ve 15 µM bilirubin dozlarına maruz bırakılan Casper larvalarında gözlerin dönme açıları, Şekil 28B' de gösterilmektedir. Kontrol grubuna (27.723°±1.753) kıyasla, 6 µM (22.591°±2.237) ve 9 µM (22.285°±2.511) dozlarında gözün alfa açılarının ortalamasında bir azalma gözlemlenmiştir ($P<0.05$).

15 µM yüksek dozunda (14.254°±2.131) ise, gözün dönme açısının ciddi bir şekilde azaldığı görülmüştür (P<0.0001). Ayrıca, 3 µM (25,647°±1,543) ve kontrol arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



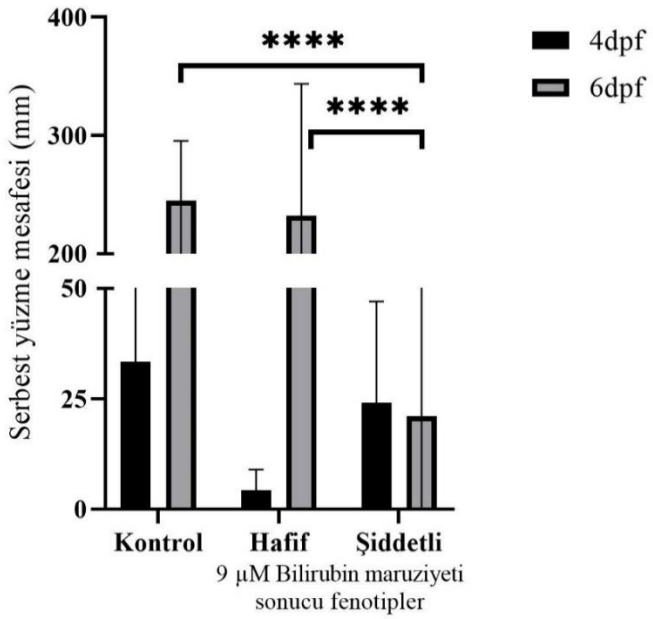
Şekil 27. Işık uyaran testi ile zebrabalığında bakış kısıtlılığının analizi. A) Bilirubin maruziyeti sonrası 6 dpf'de parlak alan mikroskobu altında ışık uyaran testine tabi tutulan zebrabalıklarına ait videolardan alınan görseller. B) Ok çizgileri, ışık uyaranından sonra en uç zıt yönlerdeki göz pozisyonlarını gösterir (sağ göz için mor ve kırmızı; sol göz için sarı ve mavi). Alfa (α) açıları, gözün dönme esnekliğini temsil eder. Ölçek çubukları: 200 µm C) 3, 6, 9 ve 15 µM bilirubin dozlarına maruz kalan Casper balıklarında gözün dönme esnekliğinin değerlendirilmesi (A'daki alfa açıları ile). Veriler Ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir (Kontrol, 3, 6, 9 ve 15 µM için sırasıyla: n=20, 18, 22, 20 ve 22). *P<0.05; ***P<0.001; NS, anlamlı değil (tek kuyruklu t-testi). (Emine Gelinci yardımlarıyla)

4.4.2. Serbest yüzme davranış testi

Bilirubin toksisitesinin neden olduğu diğer sensorimotor işlev bozuklukları ise uyuşukluk (letarji) ve kas kontrol yetersizliği semptomlarına neden olan serebral palsidir (55). Bu sekeller hareketi ve refleksleri etkileyebilir. Bilirubine maruz kalan

zebrabalıklarında hareket ve refleks fonksiyonlarını gözlemlemek için serbest yüzme davranış testi yapılmıştır. 24 kuyulu tabaklarda parlak alan mikroskobu altında serbest yüzme davranışlarının takibi sağlanmıştır ve yüzme fonksiyonları analiz edilmiştir (Şekil 29).

2-3 dpf zaman diliminde 9 µM bilirubine maruz kalan larvaların serbest yüzme davranışları 4dpf ve 6dpf'de video kaydına alınmıştır. Larvalar hafif ve şiddetli fenotiplere göre ikiye ayrılmıştır ve görüntülendikleri kuyu içerisinde yüzdükleri mesafeler ölçülmüştür.



Şekil 28: Bilirubin nörotoksisitesine bağlı serbest yüzme davranışının analizi. 2-3 dpf zaman aralığında 9 µM bilirubin dozuna maruz kalan hafif ve şiddetli fenotipe sahip larvaların 4 ve 6 dpf'de yüzme mesafelerinin değerlendirilmesi. Veriler Ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir (4dpf için: Kontrol, Hafif fenotip ve şiddetli fenotip için sırasıyla: n=10, 8 ve 12; 6 dpf için: 10, 10 ve 10). ****P<0.0001 (tek kuyruklu t-testi). (Metehan Güzelkaya yardımlarıyla)

Hafif fenotipteki larvalar 4dpf'de çevresel uyaranlara daha az yanıt verdikleri ve uyuşuk oldukları gözlemlenirken 6dpf'de ise en az kontrol grubundaki larvalar kadar hareketli oldukları görülmüştür. Şiddetli fenotip görülen larvalarda 4dpf'de ise hafif fenotipe kıyasla daha hareketli oldukları ve çevresel uyaranlara daha fazla yanıt verdikleri gözlemlenmiştir, ancak kendi etraflarında "dönme" hareketi yaptıkları için yüzme mesafelerinde artan bir değişim görülmemiştir. 6dpf'de ise 4dpf'e kıyasla fenotipik bir değişim gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak, hafif fenotipteki larvaların 4dpf'deki serbest yüzme davranışları azken şiddetli fenotipe sahip larvalar daha fazla yüzme davranışı göstermiştir. Hafif fenotiptekilerde 6dpf'de serbest yüzme ile kattetikleri yolda artış görülürken şiddetli fenotiptekilerde serbest yüzme davranışında değişim görülmemiştir ve kontrole kıyasla daha düşük ($P<0.0001$) bir yüzme davranışı sergilemiştir (Şekil 29).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında yenidoğan hiperbilirubinemisi erken zebrabalığı larvalarında ilk kez modellenmiştir. Elde edilen bulgular 2-3 dpf arasında henüz karaciğer ve gastrointestinal sistem gelişmeden önce 9-15 uM bilirubine maruz bırakılan balıklarda toksik seviyede hiperbilirubinemi görüldüğünü, dokularda biriken bilirubinin nörolojik fenotiplere neden olduğunu göstermektedir. Modelde görülen etkiler morfolojik ve histopatolojik düzeyde incelenmiş, davranışsal ve gelişimsel sonuçları raporlanmıştır.

Zebrabalığında bilirubin doz/süre ve gelişimsel sürecin belirlenmesi

Zebrabalığında karaciğer ve bağırsak organogenezinin devam ettiği ve kan-beyin bariyer yapısına katılan sıkı bağlantıların henüz oluşmadığı 2-3 dpf zaman diliminde farklı dozlarda ve sürelerde bilirubin maruziyeti yapılarak bilirubin nörotoksisite mekanizmaları 5 dpf'e kadar detaylı olarak araştırılmıştır (114, 119, 120, 140).

Bilirubinin düşük dozlarında (3 ve 6 μM), dolaşımda, otik veziküllerde, karaciğer ve gut gibi doku ve organlarda bilirubine rastlanmış olsa da bilirubinin nörotoksik etkileri bu dozlarda tespit edilememiştir (Şekil 12 ve 13). Bu seyir yenidoğanlardaki fizyolojik sarılığın ilerlediği ancak patolojik olmadığı anlamlı hiperbilirubinemisine (12≤TSB≤20 mg/dL) benzer değerlendirilmiştir.

Tablo 4: Hiperbilirubinemi düzeyleri ve ABE hastalık seyrinin Zebrabalığıyla karşılaştırılması

Hiperbilirubinemi	Toplam Serum Bilirubin	Akut Bilirubin Ensefalopatisi seyri	Zebrabalığında doz (2-3 dpf)
Fizyolojik	TSB≤12 mg/dL	-	-
Anlamlı	12≤TSB≤20 mg/dL	-	3µM 6 µM
Ciddi	20≤TSB≤25 mg/dL	Hafif	9 µM (Hafif fenotip)
Şiddetli	25 ≤TSB≤30 mg/dL	Orta	9 µM (Şiddetli fenotip)
Kritik/Ölümcül	30 ≤TSB≤35 mg/dL	Ağır	15 µM 30 µM

2-3 dpf arasında 9 µM bilirubine maruz kalan larvalarda ise, 4. günde sırasıyla hafif ve şiddetli olmak üzere iki tip fenotip gözlemlenmiştir (Şekil 15). Hafif fenotipteki larvaların bir kısmının 7. güne kadar yaşamlarını sürdürerek biriken bilirubinin toksik etkisini tolere edebildikleri; bazılarının ise tolere edemeyip durumlarının ağırlaştığı görülmüştür (Şekil 14). Bu hafif fenotipte görülen uyuşukluk ve hipotoni durumları bilirubin toksisitesinin klinikte ciddi hiperbilirubinemide (20≤TSB≤25 mg/dL) görülen ABE'nin hafif hastalık seyrine benzerlik göstermektedir. Şiddetli fenotip görülen larvalarda ise bilirubinin dolaşım, kalp, beyin ve otik veziküllerde yoğun olarak birikimine bağlı olarak beyinde, göz bölgesinde, kaslarda, kalpte ve yolkta rastlanan ödem ve doku/kas dejenerasyonu gibi bazı nörotoksik etkilere rastlanmıştır (Şekil 15). Larvaların hipertoniye benzer yüksek kas tonusuna sahip oldukları, opistotonus ve retrokollise benzer olarak kuyruklarının arkaya doğru kıvrıldığı, yenidoğanlardaki gelişimsel geriliğe benzer olarak gerilik görülmesi ve vücut uzunluklarının kısalması (Şekil 19) gibi fenotipik etkiler görülmüştür. Bu nörotoksik ve fenotipik etkiler klinikte şiddetli hiperbilirubinemide (25 ≤TSB≤30 mg/dL) görülen ABE'nin orta hastalık seyrine benzer etkiler gösterdiğine işaret etmektedir (Tablo 2 ve 4).

Bilirubine maruz kalma süresinin arttırıldığı durumda bilirubinin nörotoksik etkilerinin artıp artmayacağını test etmek için 2-4 dpf zaman aralığında maruziyet yapılmış ve şiddetli fenotipte artış görülmüştür (Şekil 14). ABE'nin orta hastalık

seyrinin şiddetli formuna dönüşebileceği geçiş aşamasında görülen nörotoksisiteye benzer etkilere rastlanmıştır (~30 mg/dL).

Yüksek 15 µM dozunun 2-3 dpf zaman aralığında uygulanması durumunda, ilk günden ağır bilirubin nörotoksisitesi, şiddetli fenotip ve sonrasında mortalite ile sonuçlanması, bu dozun klinikte kritik/ölümcül hiperbilirubinemide (30 ≤TSB≤35 mg/dL) görülen ABE'nin ağır hastalık seyrine benzer etkiler gösterdiğine işaret etmektedir (Tablo 2 ve 4). 2-4 dpf (48 s) arasında 15 µM bilirubine maruz bırakıldığında ise 4 dpf'de dokularda daha şiddetli ödem ve deformasyon ve beyinde şiddetli bilirubin birikimine rastlanamıştır. Her iki zaman diliminde yapılan maruziyetler sonucu ölümler görülmesi klinikte görülene benzer olarak bilirubin nörotoksisitesine bağlı olarak Kernikterus geliştiğini ve larvaların tolere edemediğini göstermektedir.

30 µM dozunda 24 saat uygulanan bilirubinin yüksek toksik etkilerine bağlı olarak yaşam belirtisine rastlanamamış olup bu dozun klinikte görülen kritik/ölümcül hiperbilirubinemisine (TSB≥35 mg/dL) benzer etkisi olduğu değerlendirilmiştir (Şekil 14 ve Tablo 4).

Kan beyin bariyerindeki sıkı bağlantıların, karaciğer ve bağırsağın gelişiminin başladığı 3-4 dpf arasında larvalara 9 ve 15 µM yüksek dozlarında bilirubin verilmiştir. 2-3 dpf' de yapılan maruziyete kıyasla, bu dozlarda daha az nörotoksik ve fenotipik etkilere rastlanmıştır (Şekil 14). Bunun sonucunda bilirubinin beyine geçişinin azaldığı ve bilirubin metabolizmasının çalışmaya başladığı bu dönem, klinikte yenidoğan döneminde zamanında doğan (term) bebeklere benzetilebilir. 2-3 dpf dönemi ise bilirubin nörotoksisite riskinin daha yüksek olduğu erken doğan (preterm) bebeklerdeki duruma benzetilebilir (146).

Sinir dokularında nörotoksisitenin araştırılması

Beyinde bilirubin birikiminin ve nörotoksik etkileri 4 dpf beyin görüntüleri daha ayrıntılı incelenmiş ve analiz edilmiştir. bilirubinin kan beyin bariyerini geçerek beyinde biriktiği ve artan dozlara ve maruziyet sürelerine bağlı olarak birikimin artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 17). Özellikle ABE'nin orta hastalık seyrinin

görüldüğü 9 µM dozunda telesensefalon ve rhombensefalon (serebellum) bölgelerine ait beyin ventriküllerinde bilirubin akümülasyonu 24 saatte ciddi şekilde belirginlemiştir. 48 saatte ise birikime ek olarak ciddi düzeyde kafa bölgesinde ödem gözlemlenmiştir. ABE'nin ağır seyri olduğu düşünülen 15 µM dozunda, 24 s bilirubin uygulanan larvalarda, beynin her bölgesinde yoğun şekilde bilirubin birikimi, şiddetli kafa ödemi ve nekroza bağlı dokuların şeffaflığının azaldığı gözlemlenmiştir.

Sinir dokularında görülen bilirubin birikimlerinin ve yüksek dozlarda kafada ödemin beyin morfolojisine etkisi araştırılmıştır (Şekil 20). En çok ödeme sahip olan 15 µM yüksek dozunda telensefalon genişliğinin beklenildiği üzere dramatik bir şekilde azaldığı tespit edilmiş, ödem ve telensefalon genişliğinin ciddi düzeyde ilişkili olduğu görülmüştür. İlginç bir şekilde ödem görülmemesine rağmen 6 µM da telensefalon bölgesinin etkilendiği; 9 µM dozunda ise anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin 9 µM'da görülen fenotipik varyasyonlardan kaynaklandığı düşünülebilir. Elde edilen bulgular nörotoksisiteden ilk olarak telensefalon bölgesinin etkilendiğini göstermektedir. İnsanda ise yenidoğanlarda bilirubin ensefalopatisi görüldüğü durumda oküler, bazal gangliyonların ve hippokampal beyin bölgesinin etkilendiği bilinmektedir (56, 57). İnsandaki bu beyin bölgelerine benzer olduğu düşünülen zebrabalığındaki telensefalon beyin bölgesinde morofolojik değişim gözlemlenmesi bilirubin nörotoksisite modelinin geliştirilmesi açısından umut verici bir sonuçtur. Ayrıca, zebrabalıklarında yüksek beyin işlevlerinden sorumlu olan telensefalonun etkilenmesi zebrabalığının hafıza, biliş ve motor kontrol gibi önemli fonksiyonlarını etkileyebilir (147). Bunu daha detaylı araştırmak için serbest yüzme davranış testi yapılmıştır (Şekil 29). 9 µM dozunun hafif ve şiddetli fenotip olarak ayrı değerlendirildiği bu deneyde, hafif fenotipteki larvaların 4dpf'deki serbest yüzme davranışları az olup yenidoğandaki hipotoniye benzer davranış sergilemiştir. Şiddetli fenotiptekiler ise daha fazla yüzerek hipertoni davranışı göstermiştir (Tablo 2). 6 dpf'de ise, hafif fenotipteki larvaların bilirubini metabolize etmesine yardımcı olan gelişen karaciğer ve bağırsak sistemi ile bilirubini vücutlarından uzaklaştırabildikleri görülmüştür. Şiddetli fenotipteki larvaların ise ciddi nörotoksisite görülmesine bağlı olarak bilirubini tolere edemediği ve insanda hareket/motor fonksiyonlarının etkilenmesine benzer olarak serbest yüzme davranışının azaldığı görülmüştür. Buna ek olarak, larvalarda dönme (circling)

hareketi gözlemlenmiştir. Bu durum, yolk'ta görülen ödemin ve opistotonus'un larva fizyolojisini bozmasına bağlı olarak yüzmenin engellendiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, kulak yapısının vestibular (denge) sistemde etkisinin olduğu ve işitsel fonksiyonların etkilenmesine bağlı olarak zebrabalığı larvalarında dönme (circling) davranışının görülmesinde etkili olduğu belirtilmiştir (144). Bilirubine maruz kalan larvalarda görülen dönme davranışının, -bilişsel ve fizyolojik etkilerin yanı sıra- işitme fonksiyonunun etkilenmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

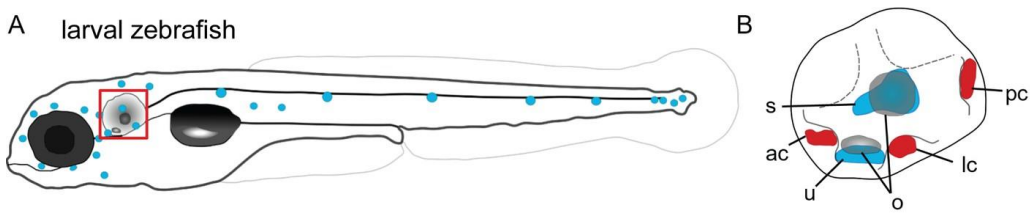
Optik tektum ise bilirubin nörotoksisitesinden etkilenen diğer bir beyin kompartmanı olup, zebrabalığına özgü bir beyin bölgesidir ve insanda *superior collicus* olarak bilinen bu bölge genellikle hiperbilirubinemi de etkilenmeyen bir alandır (87). Ancak yapılan deneylerce özellikle 9 ve 15 µM dozunda bu bölgenin ciddi düzeyde etkilenmiş olması şaşırtıcıdır (Şekil 20A) ve bilirubinin optik tektumu etkilemiş olması literatüre katkı sağlaması açısından önemlidir. Buna ek olarak, göz dokularında görülen ödem artışının optik tektum bölgesinin etkilenmesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. ABE görülen yenidoğanlarda görsel kortikal yolaklarda nöromotor hasarlar oluştuğu bilinmektedir (35, 37). Akut dönemin kronikleştiği durumda ise beyin bölgelerinin kalıcı olarak etkilenmesine bağlı olarak yukarıya bakış kısıtlılığı ve uyuşukluk gibi fonksyionel bozukluklar görülebilir (55, 56, 57). Bu literatür bilgisinden yola çıkarak bakış kısıtlılığı testi yapılmıştır (Şekil 28) ve bilirubinin artan dozlarına bağlı olarak larvalarda göz refleks davranışının azaldığı görülmüştür. Bu durum insandakine benzer olarak beyinde oluşan nörotoksisitenin zebrabalığı modelinde de nörotomor sorunlara yol açtığını göstermektedir.

Beyin kompartmanlarının yakından incelenmesi için DAPI çekirdek boyaması yapılmış ve floresan görüntüleri kullanılarak beyinden çeşitli ölçümler alınarak ek bir inceleme yapılmıştır (Şekil 21). Kontole kıyasla 9 µM dozunda optik tektumun etkilendiği 15 µM dozunda ise telensefalon, optik tektum ve serebellumun etkilendiği ancak anlamlı bir azalma görülmediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar beyin kompartmanlarının sınırlarının belirlenmesindeki zorlukları ve morfolojik varyasyonların sonuçları ciddi şekilde etkilemesine bağlı bazı zorlukları içerdiğinden kaynaklabilir. Beyin kompartmanlarını içine alan beyin uzunluğu ölçümünden beynin dorsal uzunluğunun anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Beynin genişliğindeki

düşüş anlamlı olmasa da uzunluğundaki azalmanın tespiti beynin hacimsel olarak küçüldüğüne işaret etmektedir. Bilirubinin beyin ventriküllerindeki birikiminin şiddeti ve beyin kompartmanları arasındaki dağılımı floresan mikroskobu altında incelenerek doğrulanmıştır.

Bilirubinin hücresel boyutta etkileri

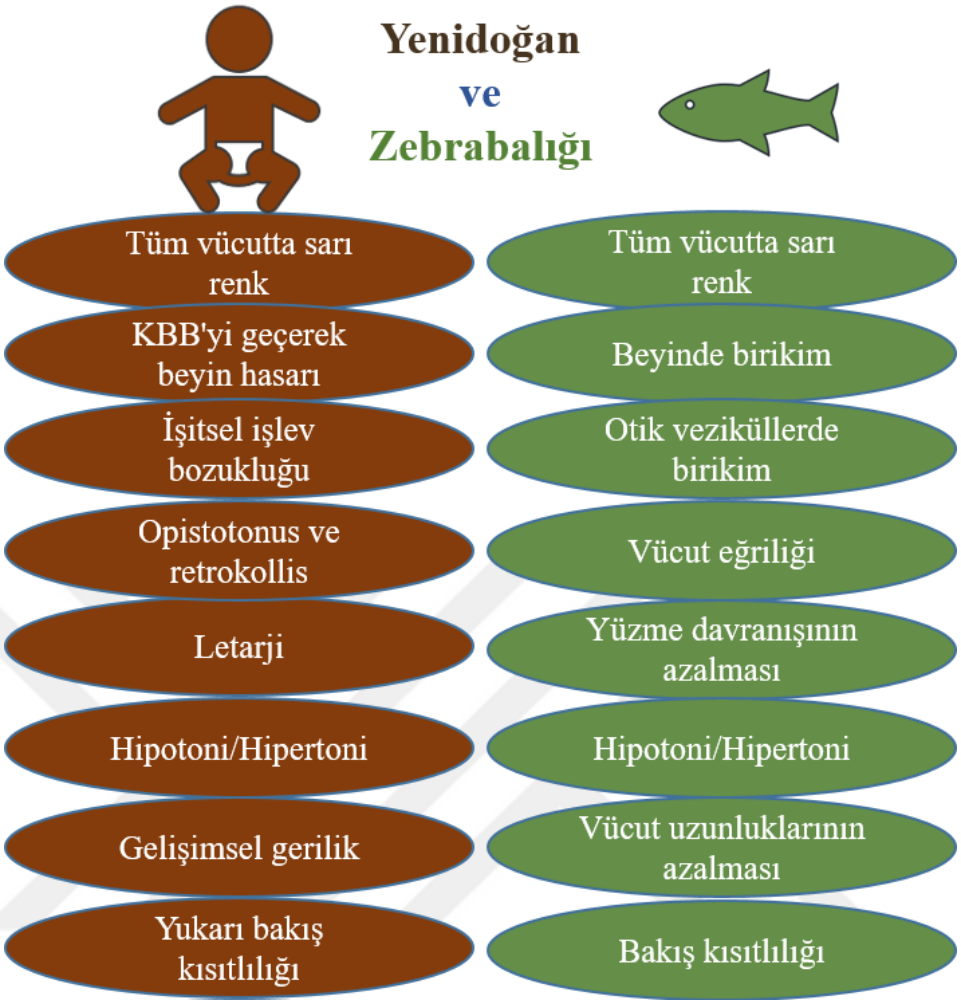
Yenidoğanlarda bilirubinin vücuttan elimine edilemediği durumda kan-beyin bariyerini aşarak beyin dokusuna nüfuz ederek nörotoksisiteye ve işitsel disfonksiyonlara yol açtığı bilinmektedir (34, 55). Bilirubin nörotoksisitesinin en çok görüldüğü 9 ve 15 µM yüksek dozları kullanılarak zamanında (term) ve erken doğmuş (preterm) yenidoğan dönemlerine bernzer oldukları düşünülen 2-3 dpf ve 3-4 dpf zaman dilimlerinde hücrelerdeki etkiler yakından incelenmiştir (Şekil 22 ve 23). 2-3 dpf grubundan elde edilen sonuçlara göre 9 µM dozunda rhombensefalon ventriküllerinde ve otik veziküllerinde birikim görülürken 15 µM dozunda rhombensefalon ve telensefalon ventriküllerinde ve otik veziküllerde bilirubine rastlanmıştır. Buna ek olarak preterm dönemdeki larvaların beyin yapısında deformasyon olduğu ve beyin yapısının küçüldüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuçların parlak alan mikroskobu altında yapılan gözlemler ve DAPI ile boyanmış beyin analizi sonuçları ile tutarlı olduğu bulunmuştur. 3-4 dpf grubundakilerde ise kan beyin bariyerinin oluşmuş olmasından dolayı beyin ventriküllerinde bilirubine rastlanmazken otik veziküllerde bilirubin birikimi tespit edilmiştir ve bu dokulardan bilirubini uzaklaştırmak için eliminasyon mekanizmasının yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır. Buna ek olarak otik veziküllerde birikimin otolitler etrafında saccule adı verilen bölgede görülmesi ilginçtir. Bu bölgede saç hücrelerinin (hair cells) yoğunlukla bulunduğu ototoksisite durumuna karşı oldukça hassas oldukları bilinmektedir (148). Buradan yola çıkarak bilirubinin ototoksisiteye sebebiyet verdiği sonucuna varılabilir.



Şekil 29: Otik vezikülün yakından gösterimi (O:otolitler ve S:saccule)

Bilirubin metabolizmasında yer alan karaciğer hücreleri yakından incelendiğinde hepatositlerin henüz gelişimini tamamlamadığı dönemde (2-3 dpf) bilirubine maruz kalan larvaların karaciğer dokularında artan bilirubin dozlarına bağlı olarak hücrenin çekirdeğinin geri dönüşümsüz olarak yoğunlaştığı piknotik hücre ölümü ve sonraki süreçte görülen nükleer parçalanmanın olduğu karyoreksik hücrelere rastlanmıştır (Şekil 26 B ve C) (145). Bu hücrelerin bilirubinin toksik etkisine bağlı olarak nekroz veya apoptoz geçirdiği sonucuna varılabilir. Ek olarak parçalanan hepatosit hücrelerinin yerini vakuollerin aldığı görülmektedir. Hepatositlerin gelişimine başladığı dönemde bilirubin maruziyeti yapıldığında ise doku bütünlüğünün daha fazla olduğu ve yapısal bozuklukların daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 26 D ve E). Elde edilen bulgular geç dönemde bilirubine maruz kalındığı durumda karaciğer hücrelerinin kendini bilirubinin toksik etkilerinden koruyabildiği ve metabolize edebilidiği düşünülmektedir. Preterm dönemdekinde ise hücrelerin şiddetli etkilenmesi bilirubinin yenidoğan döneminde verdiği zararın boyutunu gözler önüne sermektedir.

Gastrointestinel sistemin organogenezinin henüz tamamlanmadığı dönemde (2-3 dpf), bilirubinin 6dpf'de hala görülen şiddetli toksik etkilerine bağlı olarak uzunlamasına dış kas çıkıntılarının azaldığı, bağırsak duvarının inceldiği ve deforme olduğu, bilirubinin vücuttan elimine edilemediği ve goblet hücrelerinin yapılarının bozulduğu görülmektedir (Şekil 27 B ve C). Bağırsak farklılaşmasının çoktan başladığı 3-4 dpf arasında bilirubine maruz kalındığında, bu toksik etkilerin daha az görüldüğü ve hatta 9 µM dozunda vücuttan elimine edilebildiği gözlemlenmiştir (Şekil 27 D ve E).



Şekil 30: Yenidoğan ve Zebrabalığının karşılaştırmalı gösterimi

Sonuç

Bu tezde, 2-3 dpf zaman aralığındaki zebrabalığı larvalarında yenidoğanlarda görülen fenotiplere benzer olarak yenidoğan hiperbilirubinemi modellemesi yapılmıştır (Şekil 31). Bilirubinin kan beyin bariyerini aşarak, sinir dokularında özellikle de telensefalon ve rhombensefalon kompartmanlarının beyin ventriküllerinde bilirubin birikimine rastlanmıştır. Beyin kompartmanlarının hacimsel olarak bu birikimlerden ciddi şekilde etkilendiği yapılan analizlerle destelenmiştir. Bilirubinin etkileri sonucunda yenidoğandakine benzer olarak letarji, opistotonus, retrokollis, hipotoni/hipertoni, gelişimsel gerilik ve hatta ölüm gibi fenotipler görülmüştür. 9 µM ve 15 µM dozlarının yenidoğanlarda sırasıyla hafif ve orta seyirde akut bilirubin

ensefalopatisi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bilirubinin ototoksisiteye yol açtığı ve hem işitsel hem de denge sistemini etkilediği sonucuna varılmıştır. Yenidoğanlarda görülen yukarıya bakış kısıtlılığına benzer olarak göz reflekslerinde azalma gözlemlenmiştir. Beyin kompartmanlarının etkilenmesinden yola çıkarak hareket yetilerinin etkilendiği ve serbest yüzme davranışlarının azaldığı görülmüştür. Karaciğer ve gastrointestinal dokular incelendiğinde bilirubinin metabolize edilebilmesi için bu dokularda yoğunlaştığı ancak bilirubinin yüksek toksik etkilerine bağlı olarak apoptoz veya nekroz görüldüğü sonucuna varılmıştır.

Özetle bu çalışmada yenidoğan dönemindeki zebrabalığı larvalarında, beyinde ve dokularda biriken bilirubin sonrası beynin ve ilgili bölgelerin etkilendiği ve bunun sonucunda bilirubinin nörotoksik ve ototoksik etkilere yol açtığı gözlemlenmiştir. Literatürde daha önce geliştirilmemiş olan zebrabalığı yenidoğan hiperbilirubinemi modeli yardımıyla hastalığın altında yatan mekanizmaların tanımlanması ve etkin tedavilerin geliştirilmesi için bu model yol gösterici olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Dennery PA. Evaluating the beneficial and detrimental effects of bile pigments in early and later life. Frontiers in pharmacology. 2012; 3: 115.
2. Dennery P A, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. N. Engl. J. Med. 2001; 344: 581–590
3. Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106: 5171–5176.
4. Karadag F, Sengul CB, Enli Y, Karakulah K, Alacam H, Kaptanoglu B, Kalkanci O, Herken H. Relationship between serum bilirubin levels and metabolic syndrome in patients with schizophrenia spectrum disorders. Clin Psychopharmacol Neurosci. 2017; 15: 153–162.
5. Gloria-Bottini F, Bottini E. Is there a role of early neonatal events in susceptibility to allergy? Int J Biomed Sci. 2010; 6: 8–12.
6. Hansen TWR, Bratlid D. Physiology of neonatal uncojugated hyperbilirubinemia. In: Care of the Jaundiced Neonate, edited by Stevenson DK, Maisels MJ and Watchko JF. New York: NY: McGraw-Hill, 2012; 65-95.
7. Jayanti S, Moretti R, Tiribelli C, Gazzin S. Bilirubin: A Promising Therapy for Parkinson's Disease. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(12): 6223.
8. Vítek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. Advances in clinical chemistry. 2007; 43: 1-57.
9. Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. Expert opinion on drug metabolism toxicology. 2006; 2(3): 351–366.
10. Gazzin S, Masutti F, Vitek L, and Tiribelli C. The molecular basis of jaundice: An old symptom revisited. Liver Int. 2017; 37: 1094-1102.
11. Ullah S, Rahman K, Hedayati M. Hyperbilirubinemia in Neonates: Types, Causes, Clinical Examinations, Preventive Measures and Treatments: A Narrative Review Article. Iran J Public Health. 2016; 45(5): 558-68.

12. Memon N, Weinberger BI, Hegyi T, Aleksunes LM. Inherited disorders of bilirubin clearance. Pediatric research. 2016; 79(3): 378–386.
13. Fargo MV, Grogan SP, Saguil A. Evaluation of Jaundice in Adults. American Family Physician. 2017; 95(3): 164-168.
14. Roche SP, Kobos R. Jaundice in the adult patient. American family physician, 2004; 69(2): 299–304.
15. Kaplan M, Hammerman C, Vreman HJ., Wong RJ, Stevenson DK. Direct antiglobulin titer strength and hyperbilirubinemia. Pediatrics. 2014; 134(5): 1340–1344.
16. Riskin A, Gery N, Kugelman A, Hemo M, Spevak I, Bader D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and borderline deficiency: association with neonatal hyperbilirubinemia. The Journal of pediatrics. 2012; 161(2): 191–6.e1.
17. Kaplan M, Wong RJ, Sibley E, Stevenson DK. Neonatal jaundice and liver disease. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, editors. Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine. 9th ed. Amsterdam: Elsevier /Mosby. 2011; 1443-96
18. Skierka JM, Kotzer KE, Lagerstedt SA, O'Kane DJ, Baudhuin LM. UGT1A1 genetic analysis as a diagnostic aid for individuals with unconjugated hyperbilirubinemia. The Journal of pediatrics. 2013; 162(6): 1146–1152.
19. Radlović N. Hereditary hyperbilirubinemias. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo. 2014; 142(3-4): 257–260.
20. Strassburg CP. Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome. Pharmacogenomics, 2008; 9(6): 703–715.
21. Erps LT, Ritter JK, Hersh JH, Blossom D, Martin NC, Owens IS. Identification of two single base substitutions in the UGT1 gene locus which abolish bilirubin uridine diphosphate glucuronosyltransferase activity in vitro. The Journal of clinical investigation. 1994; 93(2): 564–570.
22. Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). Best Practice Research Clinical Gastroenterology. 2010; 24(5): 555–571.

23. Stevenson DK, Vreman HJ, Wong RJ. Bilirubin production and the risk of bilirubin neurotoxicity. Seminars in perinatology. 2011; 35(3): 121–126.
24. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. World journal of gastroenterology. 2013; 19(38): 6398–6407.
25. Auclair C, Hakim J, Boivin P, Troube H, Boucherot J. Bilirubin and paranitrophenol glucuronyl transferase activities of the liver in patients with Gilbert's syndrome An attempt at a biochemical breakdown of the Gilbert's syndrome. Enzyme. 1976; 21(2): 97–107.
26. Maisels MJ, Clune S, Coleman K, Gendelman B, Kendall A, McManus S, Smyth M. The natural history of jaundice in predominantly breastfed infants. Pediatrics. 2014; 134(2): e340-5.
27. Grunebaum E, Amir J, Merlob P, Mimouni M, Varsano I. Breast mild jaundice: natural history, familial incidence and late neurodevelopmental outcome of the infant. Eur J Pediatr. 1991; 150(4): 267-70.
28. Maisels MJ, Kring E. Length of stay, jaundice, and hospital readmission. Pediatrics. 1998; 101(6): 995–998.
29. Mohinuddin S, Sakhuja P, Bermundo B, Ratnavel N, Kempley S, Ward HC, Sinha A. Outcomes of full-term infants with bilious vomiting: observational study of a retrieved cohort. Arch Dis Child. 2015; 100(1): 14-7.
30. Feldman-Winter L, Kellams A, Peter-Wohl S, Taylor JS, Lee KG, Terrell MJ, Noble L, Maynor AR, Meek JY, Stuebe AM. Evidence-Based Updates on the First Week of Exclusive Breastfeeding Among Infants ≥35 Weeks. Pediatrics. 2020; 145(4): 2018-3696.
31. Kuzniewicz MW, Wickremasinghe AC, Wu YW, McCulloch CE, Walsh EM, Wi S, Newman TB. Incidence, etiology, and outcomes of hazardous hyperbilirubinemia in newborns. Pediatrics. 2014; 134(3): 504-9.
32. Ebbesen F, Bjerre JV, Vandborg PK. Relation between serum bilirubin levels ≥450 μmol/L and bilirubin encephalopathy; a Danish population-based study. Acta Paediatr. 2012; 101: 384
33. Volpe JJ. Neurology of the Newborn, 4th ed, WB Saunders, Philadelphia. 2001.

34. Hankø E, Hansen TW, Almaas R, Lindstad J, Rootwelt T. Bilirubin induces apoptosis and necrosis in human NT2-N neurons. Pediatr Res. 2005; 57(2): 179-84.
35. Good WV, Hou C. Visuocortical bilirubin-induced neurological dysfunction. Semin Fetal Neonatal Med. 2015; 20: 37.
36. Rose J, Vassar R. Movement disorders due to bilirubin toxicity. Semin Fetal Neonatal Med. 2015; 20: 20.
37. Keren R, Tremont K, Luan X, Cnaan A. Visual assessment of jaundice in term and late preterm infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2009; 94: F317.
38. Wusthoff CJ, Loe IM. Impact of bilirubin-induced neurologic dysfunction on neurodevelopmental outcomes. Semin Fetal Neonatal Med. 2015; 20: 52.
39. Manning D, Todd P, Maxwell M, Jane Platt M. Prospective surveillance study of severe hyperbilirubinaemia in the newborn in the UK and Ireland. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2007; 92: F342.
40. Usman F, Diala UM, Shapiro SM, Le Pichon JB, Slusher TM. Acute bilirubin encephalopathy and its progression to kernicterus: current perspectives. Research and Reports in Neonatology. 2018; 8: 33-44.
41. Gamaleldin R, Iskander I, Seoud I, Aboraya H, Aravkin A, Sampson PD, Wennberg RP. Risk factors for neurotoxicity in newborns with severe neonatal hyperbilirubinemia. Pediatrics. 2011; 128(4): 925-31.
42. Bozkurt Ö, Yücesoy E, Oğuz B, Akinel Ö, Palali MF, Ataş N. Severe neonatal hyperbilirubinemia in the southeast region of Turkey. Turk J Med Sci. 2020; 50(1): 103-109.
43. Donneborg ML, Hansen BM, Vandborg PK, Rodrigo-Domingo M, Ebbesen F. Extreme neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus spectrum disorder in Denmark during the years 2000-2015. J Perinatol. 2020; 40(2): 194-202.
44. Sgro M, Campbell DM, Kandasamy S, Shah V. Incidence of chronic bilirubin encephalopathy in Canada, 2007-2008. Pediatrics 2012; 130: e886.
45. Wu YW, Kuzniewicz MW, Wickremasinghe AC, Walsh EM, Wi S, McCulloch CE, Newman TB. Risk for cerebral palsy in infants with total serum bilirubin levels at or above the exchange transfusion threshold: a population-based study. JAMA Pediatr. 2015; 169(3): 239-46.

46. Alkén J, Håkansson S, Ekéus C, Gustafson P, Norman M. Rates of Extreme Neonatal Hyperbilirubinemia and Kernicterus in Children and Adherence to National Guidelines for Screening, Diagnosis, and Treatment in Sweden. JAMA Netw Open. 2019; 2(3): e190858.
47. Burke BL, Robbins JM, Bird TM, Hobbs CA, Nesmith C, Tilford JM. Trends in hospitalizations for neonatal jaundice and kernicterus in the United States, 1988-2005. Pediatrics. 2009; 123(2): 524-32.
48. Bhutani VK, Zipursky A, Blencowe H, Khanna R, Sgro M, Ebbesen F, Bell J, Mori R, Slusher TM, Fahmy N, Paul VK, Du L, Okolo AA, de Almeida MF, Olusanya BO, Kumar P, Cousens S, Lawn JE. Neonatal hyperbilirubinemia and Rhesus disease of the newborn: incidence and impairment estimates for 2010 at regional and global levels. Pediatr Res. 2013; 74 Suppl 1(Suppl 1): 86-100.
49. Bhutani VK, Johnson L. Kernicterus in the 21st century: frequently asked questions. J Perinatol. 2009; 29 Suppl 1: S20-4.
50. Bhutani VK, Johnson LH, Jeffrey Maisels M, Newman TB, Phibbs C, Stark AR, Yeargin-Allsopp M. Kernicterus: epidemiological strategies for its prevention through systems-based approaches. J Perinatol. 2004; 24(10): 650-62.
51. Johnson L, Bhutani VK, Karp K, Sivieri EM, Shapiro SM. Clinical report from the pilot USA Kernicterus Registry (1992 to 2004). J Perinatol. 2009; 29 Suppl 1: S25-45.
52. Brooks JC, Fisher-Owens SA, Wu YW, Strauss DJ, Newman TB. Evidence suggests there was not a "resurgence" of kernicterus in the 1990s. Pediatrics. 2011; 127(4): 672-9.
53. van Toorn R, Brink P, Smith J, Ackermann C, Solomons R. Bilirubin-Induced Neurological Dysfunction: A Clinico-Radiological-Neurophysiological Correlation in 30 Consecutive Children. J Child Neurol. 2016; 31(14): 1579-1583.
54. Shapiro, S. Definition of the Clinical Spectrum of Kernicterus and Bilirubin-Induced Neurologic Dysfunction (BIND). J Perinatol. 2005; 25: 54–59.

55. Magai DN, Mwaniki M, Abubakar A, Mohammed S, Gordon AL, Kalu R, Mwangi P, Koot HM, Newton CR. Neonatal jaundice and developmental impairment among infants in Kilifi, Kenya. Child: care, health and development. 2020; 46(3): 336–344.
56. Wisnowski JL, Panigrahy A, Painter MJ, Watchko JF. Magnetic Resonance Imaging Abnormalities in Advanced Acute Bilirubin Encephalopathy Highlight Dentato-Thalamo-Cortical Pathways. J Pediatr. 2016; 174: 260.
57. Wisnowski JL, Panigrahy A, Painter MJ, Watchko JF. Magnetic resonance imaging of bilirubin encephalopathy: current limitations and future promise. Semin Perinatol. 2014; 38: 422.
58. Van Praagh R. Diagnosis of kernicterus in the neonatal period. Pediatrics.1961; 28: 870.
59. Jones Mh, Sands R, Hyman Cb, Sturgeon P, Koch Fp. Longitudinal study of the incidence of central nervous system damage following erythroblastosis fetalis. Pediatrics. 1954; 14(4): 346-50.
60. Wang J, Guo G, Li A, Cai WQ, Wang X. Challenges of phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia (Review). Experimental and therapeutic medicine. 2021; 21(3): 231.
61. Hansen TWR., Maisels MJ, Ebbesen F, Vreman HJ, Stevenson DK, Wong RJ, Bhutani VK. Sixty years of phototherapy for neonatal Jaundice -from serendipitous observation to standardized treatment and rescue for millions. Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association. 2020; 40(2): 180–193.
62. Chen A, Du L, Xu Y, Chen L, Wu Y. The effect of blue light exposure on the expression of circadian genes: bmal1 and cryptochrome 1 in peripheral blood mononuclear cells of jaundiced neonates. Pediatric research. 2005; 58(6): 1180–1184.
63. Maayan-Metzger A, Yosipovitch G, Hadad E, Sirota L. Transepidermal water loss and skin hydration in preterm infants during phototherapy. American journal of perinatology. 2001; 18(7): 393–396.
64. Asghar I, Khan IA, Hassan F. Effect of head covering on phototherapy induced hypocalcemia in term neonates with hyperbilirubinemia: A

randomised controlled study. Journal of neonatal-perinatal medicine. 2021; 14(2): 245–251.

65. Jeffrey Maisels M. Phototherapy and skin rashes. Pediatric dermatology. 2013; 30(5): 636–637.
66. Le TN, Reese J. Bronze Baby Syndrome. The Journal of pediatrics. 2017; 188: 301–301.
67. Kale Y, Aydemir O, Celik Ü, Kavurt S, Isikoglu S, Bas AY, Demirel N. Effects of phototherapy using different light sources on oxidant and antioxidant status of neonates with jaundice. Early human development. 2013; 89(12): 957–960.
68. Uhrikova Z, Zibolen M, Javorka K, Chladekova L, Javorka M. Hyperbilirubinemia and phototherapy in newborns: Effects on cardiac autonomic control. Early human development. 2015; 91(6): 351–356.
69. Chen P, Lai Z, Wu Y, Xu L, Cai X, Qiu J, Yang P, Yang M, Zhou P, Zhuang J, Ge J, Yu K, Zhuang J. Retinal Neuron Is More Sensitive to Blue Light-Induced Damage than Glia Cell Due to DNA Double-Strand Breaks. Cells. 2019; 8(1): 68.
70. Ramy N, Ghany EA, Alsharany W, Nada A, Darwish RK, Rabie WA, Aly H. Jaundice, phototherapy and DNA damage in full-term neonates. J Perinatol. 2016; 36: 132–136.
71. Hong B, van den Heuvel AP, Prabhu VV, Zhang S, El-Deiry WS. Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: Strategies, challenges and opportunities. Curr Drug Targets. 2014; 15: 80–89.
72. Wickremasinghe AC, Kuzniewicz MW, Grimes BA, McCulloch CE, Newman TB. Neonatal Phototherapy and Infantile Cancer. Pediatrics. 2016; 137(6): e20151353.
73. Auger N, Laverdière C, Ayoub A, Lo E, Luu TM. Neonatal phototherapy and future risk of childhood cancer. International journal of cancer. 2019; 145(8): 2061–2069.
74. Newman TB, Wickremasinghe AC, Walsh EM, Grimes BA, McCulloch CE, Kuzniewicz MW. Retrospective cohort study of phototherapy and childhood cancer in northern california. Pediatrics. 2016; 137: e20151354

75. Matichard E, Le Hénanff A, Sanders A, Leguyadec J, Crickx B, Descamps V. Effect of neonatal phototherapy on melanocytic nevus count in children. Arch Dermatol. 2006; 142: 1599–1604.
76. Arnold C, Pedroza C, Tyson JE. Phototherapy in ELBW newborns: Does it work? Is it safe? The evidence from randomized clinical trials. Semin Perinatol. 2014; 38: 452–464.
77. El-Abdin MYZ, El-Salam MA, Ibrhim MY, Koraa SSM, Mahmoud E. Phototherapy and DNA changes in full term neonates with hyperbilirubinemia. Egypt J Med Hum Genet. 2012; 13: 29–35
78. Singh S, Ilyayeva S: Androgen Insensitivity Syndrome. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
79. Bujandric N, Grujic J. Exchange Transfusion for Severe Neonatal Hyperbilirubinemia: 17 Years' Experience from Vojvodina, Serbia. Indian journal of hematology blood transfusion: an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion. 2016; 32(2): 208–214.
80. Dey SK, Jahan S, Jahan I, Islam MS, Shabuj MK., Shahidullah M. Exchange Transfusion for Hyperbilirubinemia among Term and Near Term in NICU of a Tertiary Care Hospital of Bangladesh: Findings from a Prospective Study. Euroasian journal of hepato-gastroenterology. 2021; 11(1): 21–26.
81. Watchko JF, Tiribelli C. Bilirubin-induced neurologic damage--mechanisms and management approaches. The New England journal of medicine. 2013; 369(21): 2021–2030.
82. Calligaris R, Bellarosa C, Foti R, Roncaglia P, Giraudi P, Krmac H, Tiribelli C, Gustincich SA transcriptome analysis identifies molecular effectors of unconjugated bilirubin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. BMC genomics. 2009; 10: 543.
83. Qaisiya M, Brischetto C, Jašprová J, Vitek L, Tiribelli C, Bellarosa C. Bilirubin-induced ER stress contributes to the inflammatory response and apoptosis in neuronal cells. Arch Toxicol. 2017; 91(4), 1847-1858.
84. Bortolussi G, Muro AF. Experimental models assessing bilirubin neurotoxicity. Pediatr Res. 2020; 87: 17–25.

85. Brites, D. The evolving landscape of neurotoxicity by unconjugated bilirubin: role of glial cells and inflammation. Front. Pharmacol. 2012; 3: 88.
86. Rodrigues CM, Sola S, Silva RF, Brites D. Aging confers different sensitivity to the neurotoxic properties of unconjugated bilirubin. Pediatr. Res. 2002; 51: 112–118
87. Gazzin S, Zelenka J, Zdrahalova L, Konickova R, Zabetta CC, Giraudi PJ, Berengeno AL, Raseni A, Robert MC, Vitek L, Tiribelli C. Bilirubin accumulation and Cyp mRNA expression in selected brain regions of jaundiced Gunn rat pups. Pediatr Res. 2012; 71(6): 653-60.
88. Brito MA, Pereira P, Barroso C, Aronica E, Brites D. New autopsy findings in different brain regions of a preterm neonate with kernicterus: neurovascular alterations and up-regulation of efflux transporters. Pediatr. Neurol. 2013; 49: 431–438
89. Silva SL, Vaz AR, Diógenes MJ, van Rooijen N, Sebastião AM, Fernandes A, Silva RF, Brites D. Neuritic growth impairment and cell death by unconjugated bilirubin is mediated by NO and glutamate, modulated by microglia, and prevented by glycoursodeoxycholic acid and interleukin-10. Neuropharmacology. 2012; 62(7): 2398-408.
90. Chang FY, Lee CC, Huang CC. Hsu KS. Unconjugated bilirubin exposure impairs hippocampal long-term synaptic plasticity. PLoS ONE. 2009; 4, e5876
91. Dal Ben M, Bottin C, Zanconati F, Tiribelli C, Gazzin S. Evaluation of region selective bilirubin-induced brain damage as a basis for a pharmacological treatment. Sci. Rep. 2017; 7: 41032
92. Rodrigues CM, Sola S, Silva RF. Brites, D. Aging confers different sensitivity to the neurotoxic properties of unconjugated bilirubin. Pediatr. Res. 2002; 51: 112–118.
93. Shapiro SM. Acute brainstem auditory evoked potential abnormalities in jaundiced Gunn rats given sulfonamide. Pediatr. Res. 1988; 23: 306–310.
94. Conlee JW, Shapiro SM. Development of cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: a quantitative light microscopic analysis. Acta Neuropathol. 1997; 93: 450–460.

95. Sawasaki Y, Yamada N, Nakajima H. Developmental features of cerebellar hypoplasia and brain bilirubin levels in a mutant (Gunn) rat with hereditary hyperbilirubinaemia. J. Neurochem. 1976; 27: 577–583.
96. Nguyen N, Bonzo JA, Chen S, Chouinard S, Kelner MJ, Hardiman G, Bélanger A, Tukey RH. Disruption of the ugt1 locus in mice resembles human Crigler-Najjar type I disease. J Biol Chem. 2008; 283(12): 7901-11.
97. Fujiwara R, Nguyen N, Chen S, Tukey RH. Developmental hyperbilirubinemia and CNS toxicity in mice humanized with the UDP glucuronosyltransferase 1 (UGT1) locus. Proc. Natl Acad. Sci. 2010; 107: 5024–5029
98. Bockor L, Bortolussi G, Vodret S, Iaconcig A, Jašprová J, Zelenka J, Vitek L, Tiribelli C, Muro AF. Modulation of bilirubin neurotoxicity by the Abcb1 transporter in the Ugt1-/- lethal mouse model of neonatal hyperbilirubinemia. Hum Mol Genet. 2017; 26(1): 145-157.
99. Barateiro A, Chen S, Yueh MF, Fernandes A, Domingues HS, Relvas J, Barbier O, Nguyen N, Tukey RH, Brites D. Reduced Myelination and Increased Glia Reactivity Resulting from Severe Neonatal Hyperbilirubinemia. Mol Pharmacol. 2016; 89(1): 84-93.
100. Chen S, Yueh MF, Bigo C, Barbier O, Wang K, Karin M, Nguyen N, Tukey RH. Intestinal glucuronidation protects against chemotherapy-induced toxicity by irinotecan (CPT-11). Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110(47): 19143-8.
101. Bortolussi G, Baj G, Vodret S, Viviani G, Bittolo T, Muro AF. Age-dependent pattern of cerebellar susceptibility to bilirubin neurotoxicity in vivo in mice. Dis Model Mech. 2014; 7(9): 1057-68.
102. Bortolussi G, Zentilin L, Baj G, Giraudi P, Bellarosa C, Giacca M, Tiribelli C, Muro AF. Rescue of bilirubin-induced neonatal lethality in a mouse model of Crigler-Najjar syndrome type I by AAV9-mediated gene transfer. Faseb J. 2012; 26(3): 1052-63.
103. Gao X, Yang X, Zhang B. Neuroprotection of taurine against bilirubin-induced elevation of apoptosis and intracellular free calcium ion in vivo. Toxicol. Mech. Methods. 2011; 21: 383–387.

104. Huang H, Guo M, Liu N, Zhao C, Chen H, Wang X, Liao S, Zhou P, Liao Y, Chen X, Lan X, Chen J, Xu D, Li X, Shi X, Yu L, Nie Y, Wang X, Zhang CE, Liu J. Bilirubin neurotoxicity is associated with proteasome inhibition. Cell Death Dis. 2017; 8(6): e2877.

105. Song S, Hu Y, Gu X, Si F, Hua ZA. novel newborn rat kernicterus model created by injecting a bilirubin solution into the cisterna magna. PLoS ONE. 2014; 9: e96171.

106. Rice AC, Shapiro SM. A new animal model of hemolytic hyperbilirubinemia-induced bilirubin encephalopathy (kernicterus). Pediatr. Res. 2008; 64: 265–269.

107. Davies BE. Displacement of bilirubin from cord serum by sulphadimethoxine, amoxycillin, clavulanic acid in combination with either amoxycillin or ticarcillin, temocillin and cloxacillin. Br. J. Clin. Pharmacol. 1985; 20: 345–348.

108. Davis DR, Yeary RA. Effects of sulfadimethoxine on tissue distribution of (14C) bilirubin in the newborn and adult hyperbilirubinemic Gunn rate. Pediatr. Res. 1975; 9: 846–850

109. Schreuder AB, Rice AC, Vanikova J, Vitek L, Shapiro SM, Verkade HJ. Albumin administration protects against bilirubin-induced auditory brainstem dysfunction in Gunn rat pups. Liver Int. 2013; 33(10): 1557-65.

110. Martin WK, Tennant AH, Conolly RB, Prince K, Stevens JS, DeMarini DM., … Farraj AK. High-Throughput Video Processing of Heart Rate Responses in Multiple Wild-type Embryonic Zebrafish per Imaging Field. Scientific Reports, Sci Rep. 2019; 9: 145.

111. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, … Stemple DL. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature. 2013; 496 (7446): 498-503.

112. Veldman M, Lin S Zebrafish as a Developmental Model Organism for Pediatric Research. Pediatr Res. 2008; 64: 470–476.

113. Cakan-Akdogan G, Aftab AM, Cinar MC, Abdelhalim KA, Konu O. Zebrafish as a model for drug induced liver injury: state of the art and beyond. Explor Dig Dis. 2023; 2: 44-55.

114. Chu J, Sadler KC. New school in liver development: lessons from zebrafish. Hepatology (Baltimore, Md.), 2009; 50(5), 1656–1663.

115. Zon L, Peterson R. In vivo drug discovery in the zebrafish. Nat Rev Drug Discov. 2005; 4: 35–44.

116. Luo M, Xie D, Lin Z, Sun H, Liu Y. Toxicology evaluation of overdose hydroxychloroquine on zebrafish (Danio rerio) embryos. Sci Rep. 2022; 12(1): 18259.

117. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. 1995; 203(3): 253–310.

118. Naylor RW, Qubisi SS, Davidson AJ. Zebrafish Pronephros Development. Results and problems in cell differentiation. 2017; 60, 27–53.

119. Cox AG, Goessling W. The lure of zebrafish in liver research: regulation of hepatic growth in development and regeneration. Current Opinion in Genetics Development. 2015; 32: 153–161.

120. Ng ANY, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, White SJ, Shin J, Appel B, … Heath, J. K. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. Developmental Biology. 2005; 286(1): 114–135.

121. Wang Y, Huang H, Wu Q. Characterization of the zebrafish Ugt repertoire reveals a new class of drug-metabolizing UDP glucuronosyltransferases. Mol Pharmacol. 2014; 86(1): 62-75.

122. Luo K, Ogawa M, Ayer A, Britton W J, Stocker R, Kikuchi K, Oehlers SH. Zebrafish heme oxygenase 1A is necessary for normal development and macrophage migration. bioRxiv. 2021.

123. Holowiecki A, O'Shields B, Jenny MJ. Characterization of heme oxygenase and biliverdin reductase gene expression in zebrafish (Danio rerio): Basal expression and response to pro-oxidant exposures. Toxicology and applied pharmacology. 2016; 311: 74–87.

124. Gusb. The Zebrafish Information Network. (n.d.). 2023; https://zfin.org/ZDB-GENE-070705-256#summary

125. Kulkeaw K, Sugiyama D. Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia. Stem Cell Res Ther. 2012; 3,:55.

126. Priddle H, Jones DR, Burridge PW, Patient R. Hematopoiesis from human embryonic stem cells: overcoming the immune barrier in stem cell therapies. Stem Cells. 2006; 24(4): 815-24.

127. Martin CS, Moriyama A, Zon LI. Hematopoietic stem cells, hematopoiesis and disease: lessons from the zebrafish model. Genome Med. 2011; 3(12): 83.

128. Paik EJ, Zon LI: Hematopoietic development in the zebrafish. Int J Dev Biol. 2010; 54: 1127-1137.

129. McGrath KE, Palis J: Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. Exp Hematol. 2005; 33: 1021-1028.

130. Labastie MC, Cortés F, Roméo PH, Dulac C, Péault B: Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. Blood. 1998; 92: 3624-3635.

131. Guo S. Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function. Expert Opin. Drug Discov. 2009; 4: 715–726.

132. Vaz R, Hofmeister W, and Lindstrand A. Zebrafish models of neurodevelopmental disorders: limitations and benefits of current tools and techniques. Int. J. Mol. Sci. 2019; 20: 1296.

133. Schmidt R, Strähle U, and Scholpp S. Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult. Neural Dev. 2013; 8: 3.

134. Broglio C, Gómez A, Durán E, Salas C, and Rodríguez F. "Brain and cognition in teleost fish," in Fish Cognition and Behavior. Oxford: Wiley-Blackwell. 2011; 325–358

135. Zebrafish UCL. Midbrain. 2022; Available online at: http://zebrafishucl.org/midbrain.

136. Wullimann MF, Rupp B, and Reichert H. Neuroanatomy of the Zebrafish Brain. Berlin: Springer. 1996.

137. Moens CB, Prince VE. Constructing the hindbrain: insights from the zebrafish. Dev. Dyn. 2002; 224: 1–17.

138. Rodríguez F, Durán E, Gómez A, Ocaña FM, Alvarez E, Jiménez-Moya F, Broglio C, Salas C. Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum. Brain Res Bull. 2005; 66(4-6): 365-70.

139. Shenoy A, Banerjee M, Upadhya A, Bagwe-Parab S, Kaur G. The Brilliance of the Zebrafish Model: Perception on Behavior and Alzheimer's Disease. Front Behav Neurosci. 2022; 16: 861155.

140. Fleming A, Diekmann H, Goldsmith P. Functional Characterisation of the Maturation of the Blood-Brain Barrier in Larval Zebrafish. PLOS ONE. 2013; 8(10): e77548.

141. White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, Bourque, C, Dovey M, Goessling W, Burns CE, Zon LI. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. Cell stem cell. 2008; 2(2): 183–189.

142. Vreman HJ, Kourula S, Jašprová J, Ludvíková L, Klán P, Muchová L, Vítek L, Cline BK, Wong RJ, Stevenson DK. The effect of light wavelength on in vitro bilirubin photodegradation and photoisomer production. Pediatr Res. 2019; 85(6): 865-873.

143. Brits H, Adendorff J, Huisamen D, Beukes D, Botha K, Herbst H, Joubert G. The prevalence of neonatal jaundice and risk factors in healthy term neonates at National District Hospital in Bloemfontein. Afr J Prim Health Care Fam Med. 2018; 10(1): e1-e6.

144. Moorman SJ. Development of sensory systems in zebrafish (Danio rerio). ILAR J. 2001; 42(4): 292-8.

145. Tekkan B, İsisag Ucuncu S, Özlem Ö. The Effects of Sodium Perchlorate on the Liver of Molly Fish(Poecilia sphenops, Cyprinidae, Teleostei.. African J. Biotechnol. 2009; 8: 2648-2652.

146. Watchko JF. Bilirubin-Induced Neurotoxicity in the Preterm Neonate. Clin Perinatol. 2016; 43: 297.

147. Turner KJ, Hawkins TA, Henriques PM, Valdivia LE, Bianco IH, Wilson SW, Folgueira MA. Structural Atlas of the Developing Zebrafish

Telencephalon Based on Spatially-Restricted Transgene Expression. Frontiers in neuroanatomy. 2022; 16: 840924.

148. Shi T, Beaulieu MO, Saunders LM, Fabian P, Trapnell C, Segil N, Crump JG, Raible DW. Single-cell transcriptomic profiling of the zebrafish inner ear reveals molecularly distinct hair cell and supporting cell subtypes. Elife. 2023; 12: e82978.

7. EKLER

İZMİR BİYOTIP VE GENOM MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İBG-HADYEK)
KARARI

Toplantı Tarihi	: 09/06/2021	**Toplantı Günü**	: Çarşamba
Toplantı Sayısı	: 8	**Toplantı Saati**	: 15:30

Sayın Prof. Dr. Abdullah KUMRAL,

2021-012 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Özgün Bir Hiperbilirubinemi Modelinin Zebrabalığında Geliştirilmesi" başlıklı projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Doç. Dr. Güneş ÖZHAN **Başkan**	**Vet. Hek. Kerem ESMEN** **Başkan Yardımcısı**
Prof. Dr. Ensari GÜNELİ **Üye**	**Doç. Dr. Kasım DIRIL** **Üye**
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Banu DEMİR **Üye** (Katılmadı)	(Projede araştırmacı) **Dr. Gülçin ÇAKAN AKDOĞAN** **Üye** (Katılmadı)
Vet. Hek. Umur KELEŞ **Üye**	**Vet. Hek. Ceren ÜLKER** **Üye**
Vet. Hek. Gizem ARALAN **Üye**	**İrem KARADAŞ** **Üye** (Katılmadı)

ÖZGEÇMİŞ

EBRU ÖNAL

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

04 Ekim 2020 - Şu Anda (2 yıl 9 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL SİNİR BİLİMLER (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: -

03 Eylül 2014 - 03 Temmuz 2019 (4 yıl 11 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PR. (İNGİLİZCE)
Diploma Numarası: 4184
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.54 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Mart 2022 - 01 Ağustos 2022 (6 ay) (Yarı Zamanlı)
AR-GE PERSONEL, İZMİR BİYOTIP VE GENOM MERKEZİ

01 Ağustos 2019 - 01 Ekim 2019 (3 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, INSTITUTE OF EXPERİMENTAL BOTANY

01 Haziran 2018 - 01 Ağustos 2018 (3 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ

01 Haziran 2017 - 01 Ağustos 2017 (3 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ FEN FAKÜLTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: Orta)

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler	M. ARSLAN, M. KARADAG, E. ONAL, E. GELİNCİ, G. CAKAN-AKDOGAN & S. KALYONCU, Effect of non-repetitive linker on in vitro and in vivo properties of an anti-VEGF scFv, SCIENTIFIC REPORTS, 2022, 2045-2322, 12, 1.
Patentler	Efe Can, Sibel Kalyoncu Uzunlar, Şeyda Güllü, Ceren Özer Çokgezme, Gülçin Çakan Akdoğan, Mehmet Inan, Ebru Önal, Stable And Potent Anti-Angiogenic ScFv Fragments And Uses As VEGF Antagonist Thereof, Patent Başvurusu, Uluslararası(PCT), Başvuru No: 050990, 05 Eylül 2022

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0