



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İSKEMİ VE REOKSİJENİZASYONUN NEDEN OLDUĞU PROTEİN S100B
SALIVERİLMESİ: GLUTAMATIN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Celaleddin DEMİRCAN

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2013



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İSKEMİ VE REOKSİJENİZASYONUN NEDEN OLDUĞU PROTEİN S100B
SALIVERİLMESİ: GLUTAMATIN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Celaleddin DEMİRCAN

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. R. Levent BÜYÜKUYSAL

BURSA-2013


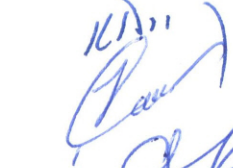



İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	III
İNGİLİZCE ÖZET	IV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 İskemi-reperfüzyon hasarı	3
2.1.1 İskemi.....	3
2.1.2 İskemi-reperfüzyon hasarı.....	5
2.2 Protein S100B	7
2.2.1 S100B proteininin intrasellüler etkileri	12
2.2.1.1 S100B'nin hücre iskeleti üzerine etkileri.....	12
2.2.1.2 S100B'nin hücre proliferasyonu ve sağkalım üzerine etkileri.....	13
2.2.1.3 S100B'nin hücre farklılaşması üzerine etkileri.....	13
2.2.1.4 S100B'nin Ca ⁺⁺ homeostazisi üzerine etkileri.....	13
2.2.1.5 S100B'nin enzim aktivitesi düzenleyici etkileri.....	14
2.2.1.6 S100B'nin protein fosforilasyonunu inhibe edici etkileri.....	14
2.2.2 S100B proteininin ekstrasellüler etkileri	15
2.2.2.1 S100B'nin nöronlar üzerine etkileri	15
2.2.2.2 S100B'nin astrositler üzerine etkileri	16
2.2.2.3 S100B'nin mikroglia üzerine etkileri	17
2.2.2.4 S100B'nin diğer hücreler üzerine etkileri	18
2.2.3 S100B'nin klinik kullanımı	19
2.2.4 Ünitimizde S100B ile yapılan çalışmalar	19
2.3 Glutamat	20
2.3.1 Glutamat sentezi	20
2.3.2 Glutamat reseptörleri	21
2.3.2.1 İyonotropik reseptörler	22
2.3.2.2 Metabotropik reseptörler	23
2.3.3 Glutamat taşıyıcıları	24
2.3.4 Glutamat metabolizması	25
2.3.5 Glutamat eksitotoksitesi	26

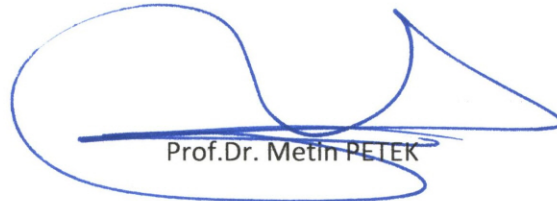
2.4 α -Ketoglutarat.....	27
2.5 Pirüvat.....	27
2.6 Laktat	29
2.7 2-Ketobutirat	29
2.8 Menadion	30
2.9 Laktat dehidrogenaz	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1 Materyaller	32
3.2 Beyin dilimlerinin hazırlanması ve inkübasyonu	32
3.3 Protein S100B ölçümü	33
3.4 Laktat dehidrogenaz ölçümü	34
3.5 Total protein ölçümü	34
3.6 Veri analizi	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA	47
6. KAYNAKLAR	51
7. TEŞEKKÜR	68
8. ÖZGEÇMİŞ	69

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Celaledin Demircan tarafından hazırlanan "İskemi ve reoksijenizasyonun neden olduğu protein S100B saliverilmesi: Glutamatın koruyucu etkisinin incelenmesi" konulu Doktora tezi 07/06/2013 günü, 10:30-11:30 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof.Dr. R.Levent Büyükuysal	
Üye	Prof.Dr. Kamil Dilek	
Üye	Prof.Dr. Sinan Çavun	
Üye	Prof.Dr. Güner Ulak	
Üye	Prof.Dr. Vahide Savcı	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun 10.06.2013 tarih ve 2013/17 sayılı toplantısında alınan 3 numaralı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof.Dr. Metin PETEK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Amaç: S100B, özellikle astrositlerde sentezlenen ve salıverilen kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. Salıverilme mekanizması iyi bilinmemekle beraber, iskeminin S100B salıverilmesini artırdığı gösterilmiştir. Daha önce in vitro beyin dilimleri modeli kullanarak yaptığımız çalışmalarda, iskemi ve reoksijenizasyonun (REO) neden olduğu S100B salıverilmesindeki artışın glutamat tarafından önlendiğini göstermiştik. Çalışma glutamatın bu etkisinin mekanizmasını aydınlatmak amacıyla planlanmıştır.

Yöntem: Sıçan beyninden hazırlanan kortikal dilimler preinkubasyon dönemi sonrası 60 dk iskemik ortamda (oksijen ve glukoz yok), ardından oksijen ve glukoz içeren ortamda (REO) inkübe edildi.. Daha sonra toplanan inkubasyon ortamları dilimlerden salıverilen S100B ve laktat dehidrogenaz (LDH) ölçümü için kullanıldı. Glutamatın S100B ve LDH salıverilmesi üzerine etkileri α -ketoglutarat, laktat, piruvat ve 2-ketobutirat gibi maddelerin etkileri ile karşılaştırılarak incelendi.

Bulgular: İskemi ve REO, S100B salıverilmesini sırasıyla %81 ve %244 oranında, REO ise LDH çıkışını %192 oranında artırdı. Ortama glutamat eklenmesi, S100B ve LDH artışlarını anlamlı şekilde önledi. Enerji substratı ve serbest oksijen radikal (SOR) tutucu etkileri olan α -ketoglutarat, piruvat ve laktat ile sadece enerji substratı olan 2-ketobutirat, glutamat benzeri etki gösterdiler. Dilimlerin hücrede SOR oluşturan menadion ile inkübe edilmeleri, S100B ve LDH salıverilmesinde önemli artışa neden oldu. Glutamat ve çalışmada kullanılan diğer maddeler menadion nedenli bu artışı önlediler

Sonuç: Çalışmanın sonuçları, α -ketoglutarat ve diğer α -ketoasitlerin iskemi, REO ve menadion nedenli S100B ve LDH artışları üzerine glutamat benzeri etkiye sahip olduklarını göstermektedir. α -Ketoglutarat, glutamatın bir metabolik ürünü olduğu için glutamatın koruyucu etkisinin, onun enerji substratı olması yanısıra SOR tutucu etkisine de bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: İskemi, reoksijenasyon, S100B proteini, laktat dehidrogenaz, glutamat, α -ketoglutarat

SUMMARY

ISCHEMIA AND REOXYGENATION-INDUCED PROTEIN S100B RELEASE: INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF GLUTAMATE

Objective: S100B is a calcium-binding protein especially expressed in and released from astrocytes. Although release mechanism is not clear, it has been shown that ischemia increases S100B release. In our earlier studies performed in vitro brain slices, we showed that ischemia and subsequent reoxygenation (REO)-induced increases on S100B release were prevented by glutamate. This study was planned to elucidate the mechanism of decreasing effect of glutamate on S100B release.

Methods: After preincubation period, cortical slices prepared from rat brain were incubated 60 min in ischemic medium (oxygen-glucose deprivation, OGD) and then in the medium containing oxygen and glucose (REO). At the end of this periods, incubation media were collected and used for the measurement of S100B and lactate dehydrogenase (LDH) released from the slices. The effects of glutamate on S100B and LDH release were tested by comparing with the effects of other substances such as α -ketoglutarate, lactate, pyruvate and 2-ketobutirate.

Results: Ischemia and REO increased release of S100B by 81% and 244% respectively, and REO increased LDH leakage by 192%. The addition of glutamate into the medium significantly prevented increments on S100B and LDH outputs. α -Ketoglutarate, pyruvate and lactate that have energy substrate and free oxygen radical scavenger effects and 2-ketobutirat those are energy substrates and also having free oxygen radical scavenger activities and 2-ketobutirate that is only an energy substrate, showed glutamate-like effects. When slices were incubated with menadion that generates free oxygen radicals intracellularly caused significant increases on S100B and LDH outputs. Glutamate and other substances tested in the study protected the slices against menadion-induced these increments.

Conclusion: The results presented here demonstrate that α -ketoglutarate and other α -ketoacids exerted a similar effect as glutamate on OGD, REO and menadion-induced S100B and LDH outputs. Since α -ketoglutarate is a metabolic product of glutamate, the

protective effect of glutamate is probably due to its free radical scavenger properties in addition to its energy substrate properties.

Key words: Ischemia, reoxygenation, S100B protein, lactate dehydrogenase, glutamate, α -ketoglutarate.

1. GİRİŞ

S100B, kalsiyum bağlayıcı bir protein olan S100 protein ailesinin bir üyesi olup başlıca astrositlerde sentezlenir ve salıverilir. Çeşitli intrasellüler ve ekstrasellüler etkileri vardır. İntrasellüler olarak hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde, protein fosforilasyonunda, transkripsiyonda, kalsiyum homeostazisinde ve enzim aktivitesinin düzenlenmesinde rol alır. Ekstrasellüler etkileri ise S100B'nin konsantrasyonuna bağlı olarak değişir; nanomolar konsantrasyonlarda nöronlar üzerinde trofik etki gösterirken mikromolar konsantrasyonlarda ise toksik etkilere sahiptir (1).

Metabolik stres, iskemi-reperfüzyon (İ/R) ve bir proinflamatuvar sitokin olan tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi çeşitli faktörlerin S100B salıverilmesi üzerine düzenleyici etkileri olmasına rağmen bu proteinin salıverilme mekanizması hakkında az şey bilinmektedir (2-4). Gerek anabilim dalımızda ve gerekse başka merkezlerde yapılan çeşitli çalışmalarda beyin dilimlerinden inkübasyon ortamı içine ölçülebilir miktarda S100B salıverildiği ve bu yöntemin diğer ölçülebilen parametrelere benzer şekilde in vitro koşullar altında S100B salıverilmesinin araştırılmasında güvenilebilir bir model olduğu bildirilmiştir (3,5,6). Anabilim dalımızda beyin dilimleri inkübasyonu modeli kullanılarak yapılan çalışmalarda inkübasyon ortamından oksijen ve glukozun çıkartılmasının (in vitro iskemi) beyin dilimlerinden S100B salıverilmesini artırdığı ve bu etkinin reoksijenizasyon (REO) dönemi sırasında daha da fazlaştığı gözlenmiştir (3,6).

S100B salıverilmesiyle ilişkili önemli bir bulgu; eksitatör amino asit glutamatın, yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında serum deprivasyonu (serumun çıkarıldığı hücre kültürü ortamı), iskemi veya REO'nun neden olduğu S100B salıverilmesindeki artışı azaltmasıdır (3,6-8). Primer astrosit kültürlerinin inkübe edildiği ortamdan serumun çıkarılmasının S100B salıverilmesinde önemli derecede artışa neden olduğu ve ortama eklenen yüksek konsantrasyonda glutamatın, glutamat uptake taşıyıcısı ile ilişkili bir mekanizma aracılığıyla S100B salıverilmesini azalttığı gösterilmiştir (8). Anabilim dalımızda yapılan çalışmalarda ise yüksek konsantrasyonda glutamatın kortikal dilimleri iskemi veya REO'nun neden olduğu S100B salıverilmesine veya REO'nun neden olduğu laktat dehidrogenaz (LDH) çıkışına karşı koruduğu bulunmuştur (3,6). Benzer şekilde alfa-ketoglutaratın (α -KG) da kortikal dilimlerden iskemi veya REO'nun neden olduğu S100B salıverilmesini azalttığı gözlenmiştir (6). Glutamat metabolizması, Krebs (trikarboksilik asit, sitrik asit) döngüsü aracılığıyla enerji üretici bir yolak olup α -KG bu döngüde ara

basamak olarak yer alır. α -KG'in enerji substratı olarak fonksiyon görmesi yanında (9,10), hidrojen peroksit (H_2O_2) tutucu etkisi de söz konusudur (11,12). Yüksek konsantrasyonda glutamatın iskemi ve REO nedenli S100B salıverilmesini, metabolik ürünü olan α -KG aracılığıyla azaltması bir olasılıktır. Çalışma bu olasılıktan yola çıkarak, enerji substrat metaboliti ve/veya H_2O_2 tutucu olduğu bilinen piruvat, laktat ve 2-ketobutirat (2-KB) gibi maddelerin etkilerini glutamat ve α -KG'in etkileriyle karşılaştırmak ve sonuçta glutamatın yüksek konsantrasyonlarda gösterdiği koruyucu etkisinin mekanizmasını açıklamak amacı ile yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi-Reperfüzyon (İ/R) Hasarı

2.1.1. İskemi

İskemi; bir doku veya organın kanlanması bozulmasına bağlı olarak o doku/organın hücrelerinde geri dönüşümlü veya dönüşümsüz bir hasarın oluşmasıdır. İskemi; o doku/organa gelen kan akımının damar içi ateroskleroz plağı, trombus, şok, kalp durması, vasküler cerrahi girişimler veya organ transplantasyonu gibi nedenlerle azalması/kesilmesi sonucu ortaya çıkabilir. İskemide doku ve hücrelerde hipoksi gelişir, hücredeki enerji depoları boşalır ve toksik metabolitler birikir. İskeminin uzun sürmesi durumunda hücrelerdeki hasar geri dönüşümsüz olur, hücrelerin bütünlüğü kaybolur ve hücre ölümü gelişir (13-17).

İskemik dönemde hücrede oluşan başlıca metabolik ve yapısal değişiklikler şunlardır;

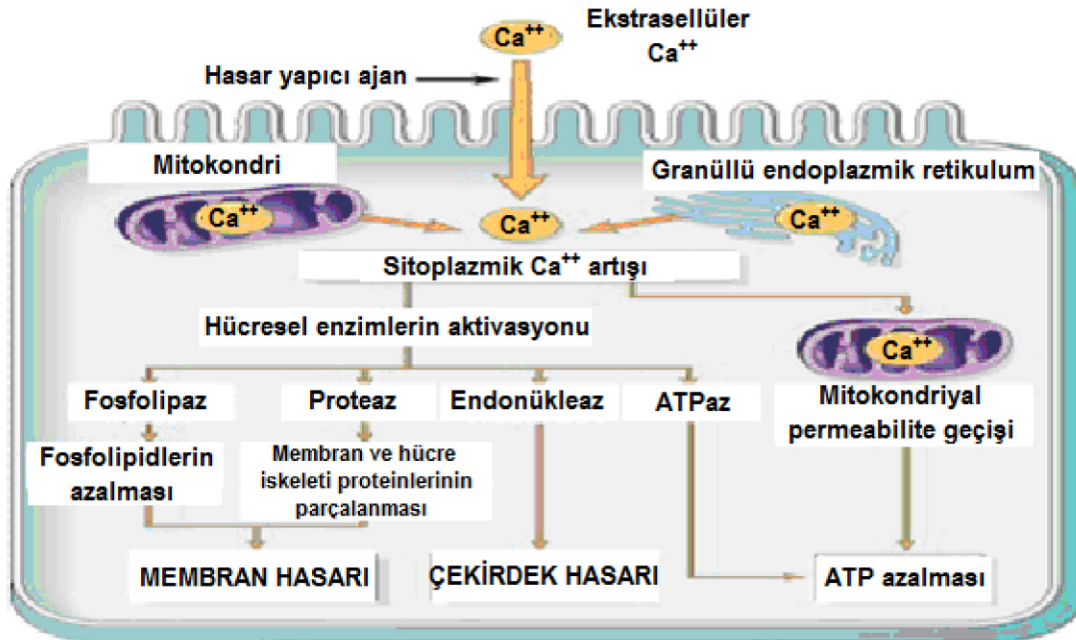
1. İskemide, gelişen hipoksi sonucu hücredeki aerobik solunum, yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon azalır ve buna bağlı olarak hücre içi adenosin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin üretimi durur. Mevcut ATP, hücrenin homeostatik fonksiyonlarını sürdürmek için kullanılarak tüketilir, ATP parçalanarak adenosin monofosfat (AMP) ve adenosin oluşur. Adenosin diffüzyonla hızla hücre dışına geçerek inozin ve hipoksantine parçalanır. Böylece, iskemide yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı dokuda hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine neden olur (14-17).

2. Hücrede oksidatif fosforilasyon durur ve enerji üretimi anaerobik glikolizis ile sağlanmaya çalışılır. Bunun sonucunda glikojen depoları giderek azalır, laktik asit ve inorganik fosfatların düzeyi artar. Bu asidik metabolitlerin hücre içinde birikmesiyle aynı zamanda hücre içi pH da azalır (14-17).

3. Hücre membranında ATP enerjisi gerektiren Na^+ , K^+ -ATP'az pompası inhibe olur. Bunu, sodyumun hücre içinde birikimi, potasyumun hücre dışına çıkışı ve kalsiyumun hücre içine girişi izler. Böylece hücre içinde sodyum ve kalsiyum konsantrasyonları artar. Hücre içi sodyum konsantrasyonunun artması, beraberinde hücre içine suyun girişine ve akut hücresel şişmeye neden olur. Bu hücresel şişme, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikiminin yol açtığı osmotik yükü daha da fazlalaştır (14-17).

4. Azalan hücre içi pH ve ATP düzeyleri, hücre iskeletinde yapısal değişikliklere yol açar; ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılmasına, polizomların monozomlara ayrışmasına ve sonuçta protein sentezinde azalmaya neden olur (15).

5. İskemide Ca^{++} -ATP'az pompası inhibe olur, kalsiyum hücre dışına atılamaz, hücre içine kalsiyum girişi artar ve kalsiyum homeostazisi bozulur. Normalde hücre içinde kalsiyum konsantrasyonu ekstrasellüler alana göre çok düşüktür. Hücre içindeki kalsiyum da endoplazmik retikulum ve mitokondride biriktiğinden sitoplazmada serbest kalsiyum düzeyi daha da düşüktür. İskemide gerek hücre içine giren, gerekse endoplazmik retikulum ve mitokondriden serbestlenen kalsiyum nedeniyle sitoplazmadaki serbest kalsiyum konsantrasyonu belirgin olarak artar ve bu da potansiyel zararlı etkileri olan çeşitli enzimleri aktive eder. Fosfolipazların aktivasyonu fosfolipidlerin parçalanmasına ve membran hasarına neden olurken, proteazların aktivasyonu membran ve hücre iskelet proteinlerinin parçalanmasına yol açar. Endonükleazların aktivasyonu nükleer kromatin hasarına yol açıp genetik materyali parçalarken, ATP'azların aktivasyonu mitokondriyal permeabiliteyi artırarak ATP kaybını ve hücre enerji depolarının boşalmasını hızlandırır. Bunların sonucunda mitokondriyal hasar ve hücre ölümü gelişir. Sitoplazmik kalsiyum düzeylerinin artması ayrıca kaspazların direkt aktivasyonuna neden olarak apoptozisi indükler (Şekil 1) (15,17-19).



Şekil 1: Sitoplazmada serbest kalsiyum artışının hücre hasarındaki rolü (15 nolu kaynaktan alınmıştır).

İskemi uzarsa hücreyel iyon homeostazisindeki bozulma, membran permeabilitesindeki artış ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu daha da artar. Sonuçta hücre morfolojisi daha fazla bozulur, hücre iskeleti dağılır, mikrovilluslar gibi yapısal özellikler kaybolur, geri dönüşümsüz hücre hasarı ve nekroz gelişir (15-17).

2.1.2. İskemi-Reperfüzyon (İ/R) Hasarı

Eđer hücreler geri dönüşümlü olarak hasarlanırsa kan akımının düzelmesi ile hücre/doku iyileşebilir. Ancak bazen iskemik dokularda kan akımının düzeltilmesi tam tersine hücre/doku hasarını artırır. Bu durum İ/R hasarı olarak adlandırılır. İ/R özellikle myokardiyal ve serebral infarktüslerde doku hasarına katkıda bulunması açısından oldukça önemlidir (14-17).

İ/R hasarının fizyopatolojik mekanizmaları tam olarak açıklanamamış olmakla beraber rolü olduğu ileri sürülen başlıca mekanizmalar şunlardır;

1. Reperfüzyon sırasında dokunun yeniden oksijenizasyonu sonucu serbest oksijen radikallerinin (SOR) ortaya çıkması İ/R hasarında ileri sürülen en önemli mekanizmadır. En önemli SOR kaynağı nötrofillerdir. İskemik dokunun yeniden kanlanmasıyla dokuya dolaşımdaki nötrofillerin gelişini artırır, bu hücreler membran hasarı ve mitokondriyal permeabiliteyi artıran büyük miktarda SOR açığa çıkartır. Diğer taraftan reperfüzyonda, oksijenizasyonun yeniden sağlanmasıyla iskemi sırasında oluşan ksantin oksidaz enzimi hücrede biriken hipoksantini ksantine dönüştürürken büyük miktarda SOR açığa çıkmasına neden olur. SOR; hücre membranında lipid peroksidasyonuna, DNA parçalanmasına ve sülfidril aracılı protein çapraz bağları oluşturarak protein parçalanmasının artmasına ve enzimatik aktivite kaybına yol açar. Bu hücrelerde antioksidan savunma mekanizmaları da bozulmuş olduğundan artan SOR oluşumu hücreyel hasarı daha da artırır (15-17,20-22).

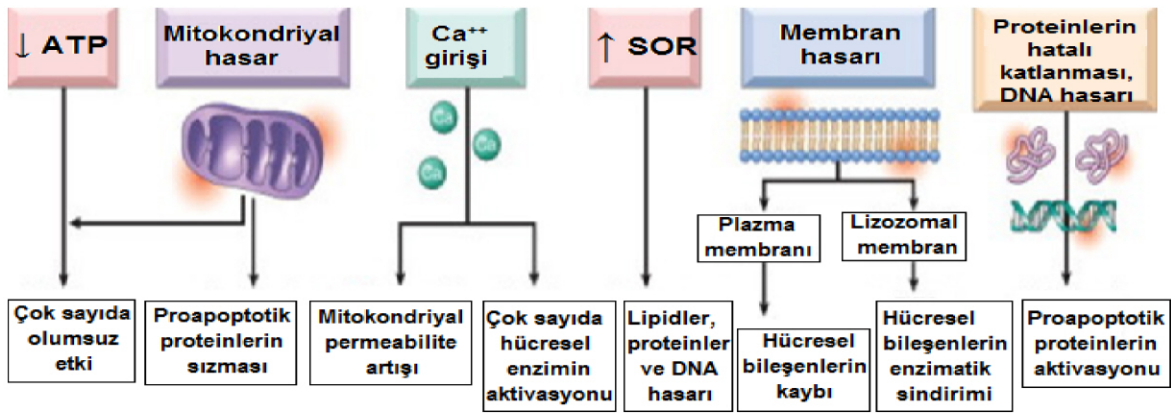
2. İ/R hasarında nötrofillerle endotel hücre adhezyonu oluşur. Aktive nötrofiller SOR oluşumu yanı sıra vasküler permeabilite artışına ve kemotaksise, nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-kB) aktivasyonuna, proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6), sitotoksik enzimlerin (elastaz, kollajenaz ve jelatinaz) salıverilmesine ve damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar (15-17,23-26).

3. İ/R hasarında endotel hücreleri hem SOR üretim kaynağıdır ve hem de SOR için hedef konumundadır. SOR endotel kaynaklı nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girer ve peroksinitrit

oluşturarak lipid peroksidasyonunu başlatabilir. SOR etkisi ile kompleman aktive edilir, lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar (16,20,21,27,28).

4. İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanması ile etkilenen hücreler henüz kendi iyonik homeostazisini tam olarak düzeltememişken yüksek konsantrasyonda kalsiyumla karşı karşıya kalır. Böylece hücre içi kalsiyum daha da artar ve kalsiyumun yukarıda bahsedilen sitotoksik etkileri daha da belirginleşir ve hücre bütünlüğü kaybolur (15,16,18-21).

İ/R hasarında Şekil 2’de özetlenen hüresel hasar mekanizmalarının hepsinin rolü vardır.



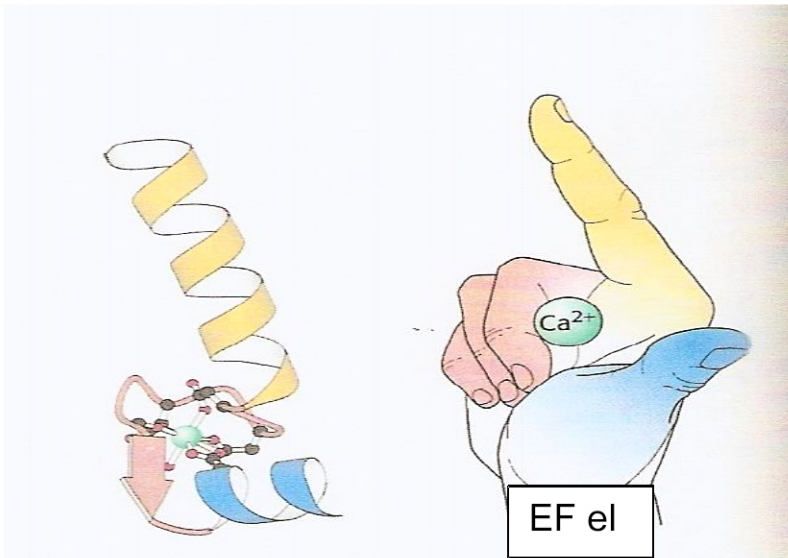
Şekil 2: Hücre hasarından sorumlu olası temel mekanizmalar ve bunların biyokimyasal ve fonksiyonel etkileri (15 nolu kaynaktan alınmıştır).

İn vivo beyin İ/R hasarı modellerinde; beyin o bölgesini besleyen arterde belirli süre oklüzyon yapılarak bölgenin kanlanması kesilir ve sonrasında bu oklüzyon ortadan kaldırılarak bölgenin kanlanması yeniden sağlanırken in vitro beyin İ/R hasarı için beyin dilimleri veya hücre kültürleri modelleri kullanılabilir. Beyin dilimleri iskemi modelinde; dilimler oksijensiz ve glukozsuz ortamda (oksijen-glukoz deprivasyonu, OGD) belirli süre inkübe edildikten sonra oksijenli ve glukozlu ortama (REO) alınarak belirli bir süre daha inkübe edilerek reperfüzyonu sağlanır. Benzer şekilde hücre kültürleri İ/R hasarı modelinde de ortamdan, önce belirli bir süre oksijen ve glukoz çıkarılır (OGD), daha sonra hücreler oksijen ve glukoz içeren ortamda (REO) inkübasyona alınır (29). Anabilim dalımızda da beyin dilimlerinde İ/R hasarı modeli kullanılarak dilimlerden protein S100B ve LDH saliverilmesi araştırılmıştır. İskemi dönemi için beyin dilimleri oksijen ve glukoz içermeyen fizyolojik Krebs sıvısında 1 saat süreyle inkübe edilmiş, daha sonra dilimler oksijen ve glukoz içeren ortamda 1 saat süreyle inkübe edilerek reperfüzyonu sağlanmıştır (3,5,6).

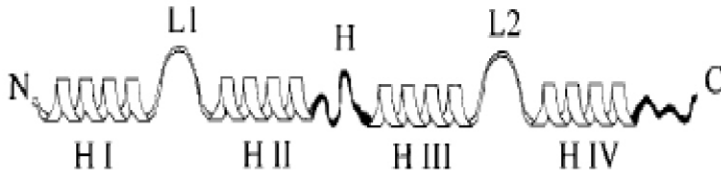
2.2. Protein S100B

S100 proteini ilk kez 1965'te sığır beyninden izole edilmiş ve uzun süre “beyine özgü asidik proteinler” olarak kabul edilmiştir (30,31). “S100” adı, söz konusu proteinin nötral pH'da %100 amonyum sülfat içinde çözündüğü için verilmiştir (30,32). Daha sonra proteinin birbirinden farklı iki molekülden (S100 α ve S100 β) oluştuğu gösterilmiş (33), sonraki yıllarda daha duyarlı ölçümler ve immünohistokimyasal yöntemlerdeki gelişmelerle S100 protein ailesinin yeni üyeleri keşfedilmiş ve sinir sistemi (SS) hücreleri dışında başka hücrelerde de ekspresse olduğu gösterilmiştir (34-36). S100 proteinlerinin kromozomal yerleşimi belirlendikten sonra 1995'te nomenklatür değişmiş ve S100 β yerine S100B ve S100 α yerine S100A1 adı kullanılmaya başlanmıştır (37). S100 protein üye sayısı 1999'da 19 ve 2006'da 24'e ulaşmıştır (S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A5, S100A6, S100A7, S100A7A, S100A7L2, S100A7P1, S100A7P2, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A11P, S100A12, S100A13, S100A14, S100A16, S100B, S100G, S100P, S100Z) (38).

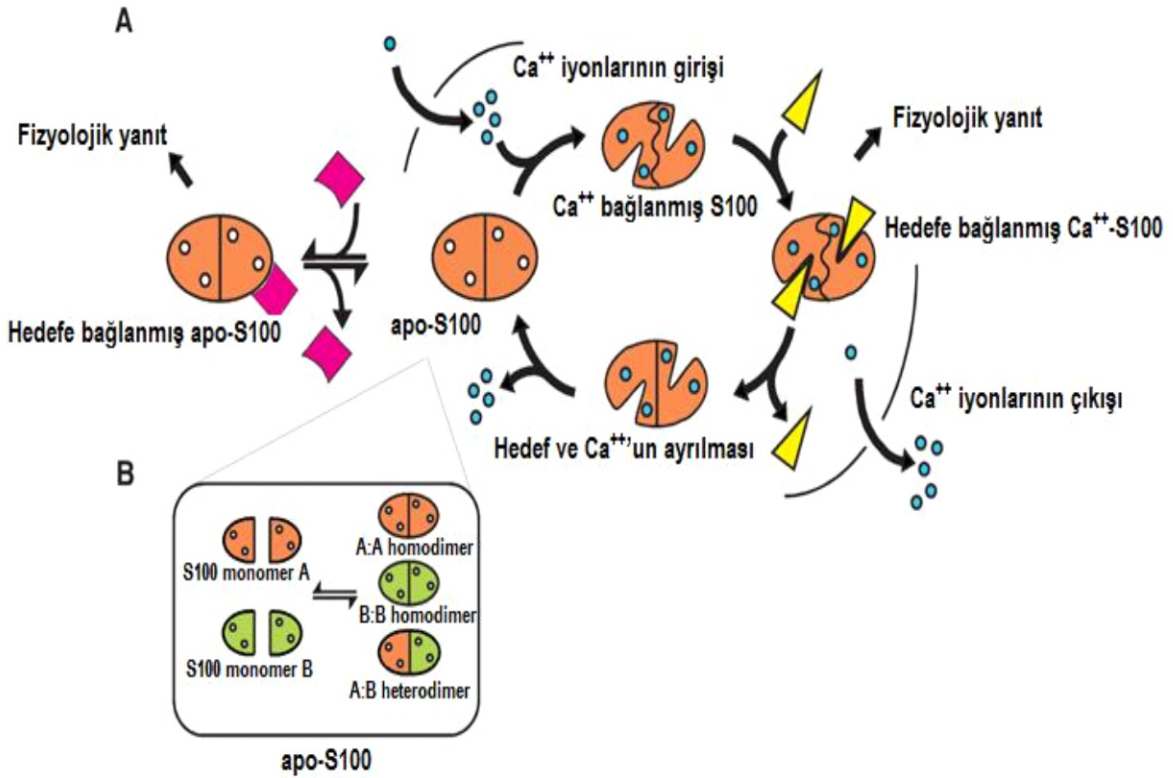
Protein S100, EF-el tipi motife sahip kalsiyum bağlayıcı proteinlerdendir (Şekil 3) (39) ve bir S100 proteini tipik olarak dimer yapıda olup bu ailenin üyeleri yüksek oranda (%25-65) sekans ve yapısal homoloji gösterirler (40). Herbir monomer 2 “heliks-lup-heliks” motifinden oluşur, bir bağlantı bölgesiyle birbirine bağlanır ve herbir monomerdeki lup bölgesine kalsiyum bağlanır (Şekil 4) (41). S100 proteinin kalsiyum bağımlı ve kalsiyumdan bağımsız etkileşimleri Şekil 5'te gösterilmiştir (36).



Şekil 3. EF-el tipi motife sahip kalsiyum bağlayıcı proteinlerden S100 proteinin şematik yapısı (39 nolu kaynaktan alınmıştır).



Şekil 4. Bir S100 proteinin sekonder yapısının şematik görünümü. Her bir Ca^{++} bağlayıcı lup (N- ve C- terminal yarısında sırasıyla L1 ve L2) α -helikslerle (L1 ve L2 için sırasıyla heliks I ve heliks II, heliks III ve heliks IV) bağlanır. Bir bağlantı bölgesi (hinge region, H) heliks II'yi heliks III'e bağlar (41 nolu kaynaktan alınmıştır).



Şekil 5. S100 ailesinin kalsiyum bağımlı ve kalsiyumdan bağımsız etkileşimleri. (A) S100 proteinler hedef moleküllerle (*pembe ve sarı renk*) etkileşerek farklı fizyolojik yanıtlar oluşturur. Düşük kalsiyum konsantrasyonlarında, S100 proteinler (*turuncu renk*) kalsiyumsuz (apo-S100) durumundadırlar. Voltaj kapılı veya reseptör aracılıklı kanallarla kalsiyum içeri girdiğinde S100 proteini kalsiyumu bağlar ve hidrofobik yüzey özelliklerinin farklılaştığı yapısal bir değişikliğe uğrar. Bu değişiklik, proteinin fizyolojik bir yanıt oluşturmak üzere çok sayıda hedef proteinle (*sarı renk*) etkileşime girmesine izin verir. S100-hedef protein etkileşimlerinin büyük kısmı kalsiyum bağımlı olmasına rağmen bazı S100 ailesi üyelerinin hedef proteinle (*pembe renk*) kalsiyumdan bağımsız şekilde etkileştikleri gösterilmiştir. (B) Dimer şeklindeki S100 proteinler diğer bir S100 protein üyesiyle subünit değiş tokuşu yapabilir ve in vitro ve in vivo deneylerde gösterildiği gibi aynı hücre tipinde homo- veya heterodimer şekline dönüşebilir. Herbirinin sayısı hücredeki S100 konsantrasyonuna bağımlıdır (36 nolu kaynaktan alınmıştır).

Protein S100B, kalsiyum bağlayıcı proteinlerden S100 ailesinin bir üyesi olup 91 amino asit içerir, homodimer ($\beta\beta$ subünitleri içerir) yapıdadır ve 21 kDa ağırlığındadır (35,40-42). Kalp ve aortada heterodimer ($\alpha\beta$ subünitleri içerir) yapıda bulunduğu gösterilmiştir (43). 4 kalsiyum bağlayıcı bölgesi yanısıra 6-8 çinko bağlayıcı bölgesi (34,40,44) ve 4 bakır bağlayıcı bölgesi (45) vardır. Gen kodlanması insanlarda kromozom 21q22.3 üzerinde lokalizedir (46).

Protein S100B en çok beyinde bulunur, başlıca astrositlerde sentezlenir ve salıverilir (47,48). Santral SS'nde ayrıca oligodendrositlerde (49,50), ependim hücrelerinde (50), mikroglia hücrelerinde (51,52) ve kolinerjik nöronlarda (53), periferik SS'nde de Schwann hücrelerinde ekspresse olduğu gösterilmiştir (54). SS dışında ise kondrositler (55), adipositler (55,56), pitüiter follükülostellat hücreler (57), kardiyomyositler (43), melanositler (58), Langerhans hücreleri (59), myoblastlar (60), iskelet kası myofibrilleri (61) ve olfaktor epitelyum (62) gibi yapılarda da sentezlendiği, hücre içinde de çekirdek ve sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir (1,63-64).

Protein S100B'nin, diğer S100 proteinler gibi birçok efektör proteinle etkileştiği gösterilmiştir. p53 tümör supressor protein (65), mikrotübülle ilişkili tau proteini (66), GFAP (glial fibriler asidik protein) (67,68), vimentin (68), hücre iskelet proteini tubulin (69), caldesmon (70), dev fosfoprotein AHNAK (71), MARCKS (72), intermediet (ara) filamentler (73), GAP-43 (nöromodulin) (74), aktin bağlayıcı protein CapZ (75) ve anneksin VI (76) protein S100B'nin kalsiyum bağımlı bir şekilde etkileşerek intrasellüler ve ekstrasellüler etkilere neden olduğu başlıca proteinlerdir. S100B, glikojen fosforilaz ve aldolaz A gibi bazı proteinlerle ise kalsiyumdan bağımsız (apo-S100B) olarak etkileşmektedir (36).

S100B ekspresyonu, proteini ekspresse eden hücrelerden gelişen astrositoma (77), glioblastoma (77), melanoma (78) gibi çeşitli tümörlerde, yaşlanan beyinde (79) ve Alzheimer hastalığı (80), kronik epilepsi (81), şizofreni (82), kafa travması (83,84), strok ve serebral iskemi (85,86) gibi beynin diğer patolojik durumlarında artar. Protein S100B ekspresyonunu artıran ve azaltan faktörler ile S100B ekspresyonundan sorumlu hücreler Tablo 1'de gösterilmiştir (1).

Tablo 1. S100B ekspresyonunu düzenleyen faktörler ve/veya durumlar ile ekspresyonun olduğu hücreler.*

S100B ekspresyon düzeyini artıran faktör ve/veya durumlar	S100B ekspresyon düzeyini azaltan faktör ve/veya durumlar
Norepinefrin ve fenilefrin (postinfarkt kardiyomyositler)	IFN- γ (mikroglia hücre dizileri ve astrozitler)
IL-1 β (astrozitler)	Epidermal büyüme faktörü (astrozitler)
β -amiloid	Disleksi (astrozitler)
Antidepresanlar (astrozitler)	
Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (astrozitler)	
Trizomi 21	
Alzheimer hastalığı (astrozitler)	
Yaşlanan beyin (astrozitler)	
Kronik epilepsi (astrozitler)	
HIV enfeksiyonu (astrozitler)	
Gliadin (enterik glia)	
Şizofreni	

*1 nolu kaynaktan alınmıştır.

S100B ekspresyonunun düzeyi çevresel faktörlere bağlı olabilir. Örneğin; S100B kardiyomyositlerde ölçülemez düzeydedir, fakat infarkt sonrası myokardiumda endojen katekolaminlerin salınması sonucu fetal proteinler, iskelet kası α -aktin ve β -myozin ağır zincir downregülasyonu ile birlikte serumda ölçülebilir düzeye çıkmaktadır (87). Bunun dışında proinflamatuvar sitokin interlekin-1 β (IL-1 β) (88), β -amiloid (89), antidepresanlar (90) ve beyin kaynaklı nörotropik faktör (BDNF) (91) astrozitlerde S100B ekspresyonunu artırır. Bu gözlemler S100B gen ekspresyonunun kompleks bir transkripsiyonal düzenleme altında olduğunu göstermektedir (1).

S100B astrozitlerden (92), adipositlerden (93) ve muhtemelen diğer hücre tiplerinden aktif olarak salınır. Astrozitlerden S100B salınması üzerine 5-Hidroksitriptamin 1A (5-HT_{1A}) (94), glutamat (95) ve proinflamatuvar sitokin TNF- α (4) ile uyarılmanın ve metabolik stresin (2) artırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. S100B salınmasını artıran ve azaltan faktörler Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. S100B saliverilmesini düzenleyen faktörler ve/veya durumlar ile saliverildiği hücreler.*

S100B saliverilmesini artıran faktörler ve/veya durumlar	S100B saliverilmesini azaltan faktörler ve/veya durumlar
Büyüme fazı (astrozitler)	Yüksek glukoz (astrozitler)
Katekolaminler (adipositler)	Src kinazın inhibisyonu (astrozitler)
5-HT _{1A} (astrozitler)	Yüksek glutamat (astrozitler)
Lizofosfatidik asit	
Glutamat (astrozitler)	
TNF- α (astrozitler)	
Metabolik stres (astrozitler)	
Yüksek sitozolik Ca ²⁺ (astrozitler)	
Doğal antioksidanlar (astrozitler)	
Dallı zincirli α -keto asitler (astrozitler)	
MPTP (astrozitler)	
Risperidon (astrozitler)	
Melanoma	
Dilate kardiyomyopati (astrozitler?, kardiyomyositler?)	
Kalp iskemisi	

* 1 nolu kaynaktan alınmıştır.

S100B primer olarak astrozitler tarafından üretilir ve glia (nöroepitelyal destek hücreleri), nöronlar ve mikroglialar üzerinde otokrin ve parakrin etkilere sahiptir (52). Herbir S100B monomerinin kalsiyum bağlama bölgesine kalsiyum bağlandığında hidrofobik yüzey özellikleri değişerek hedef proteinle etkileşime girebilir hale gelmekte ve S100B proteini böylece çeşitli hedef proteinlerle etkileşerek intrasellüler ve ekstrasellüler etki göstermektedir (41,42). S100B'nin ekspresse olduğu ve sitoplazmasında bulunduğu hücrelerde konsantrasyonunun artması S100B'nin çok daha fazla sayıda hedef proteinle etkileşmesini sağlar (42,64).

S100B'nin Ca⁺⁺ ile bağlanarak etkileştiği hedef proteinler ve fonksiyonları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. S100B ile hedef protein ilişkileri ve fonksiyonları.*

Hedef proteinler	Fonksiyonları
AHNAK	Kalsiyum homeostazisinin düzenlenmesi
Aldolaz C	Aldolaz C aktivitesinin uyarılması
CacyBP/SIP	Ubikinyasyon düzenlenmesi
Caldesmon	Aktomyosin inhibisyonunda azalma
CapZ (TRTK-12)	Aktin filament genişlemesinin düzenlenmesi
GFAP	İntermediet filamentlerin (IF) toplanması
Guanilat siklaz	Guanilat siklazın aktivasyonu
İntermediet filamentler	IF toplanması ve dağılmasının düzenlenmesi
IQGAP1	Membranın yeniden düzenlenmesi
MAG	Gliyal hücre iskeletinin düzenlenmesi
Mikrotübüller	Mikrotübül dinamiklerinin düzenlenmesi
Ndr	Ndr kinaz aktivasyonunun düzenlenmesi
Nöromodulin	PKC ile nöromodulin fosforilasyonunun inhibisyonu
p53	p53 fonksiyonunun inhibisyonu
Fosfoglukomutaz	Fosfoglukomutaz aktivitesinin uyarılması
RAGE	Hücre sağkalımının artırılması
Tau	PK II ile tau fosforilasyonunun inhibisyonu

*35 nolu kaynaktan alınmıştır.

2.2.1. S100B Proteininin İntrasellüler Etkileri

S100B'nin protein fosforilasyonunun düzenlenmesinde, hücre iskelet yapısının dinamiklerinde, kalsiyum homeostazisinde, enzim aktivitesinin düzenlenmesinde, hücre büyümesi ve farklılaşmasında, transkripsiyonda ve inflamatuvar yanıtta rolleri vardır (41,63).

2.2.1.1. S100B'nin Hücre İskeleti Üzerine Etkileri

S100B hücre iskeleti elemanlarıyla etkileşime girer. Hücre içinde sentrozomlar, mikrotübüller ve tip III intermediet filamentlerde lokalize olduğu ve mikrotübül toplanmasını düzenlediği (96), tubulin ve mikrotübül ilişkili tau proteini ile etkileşime girdiği (97), IQGAP1 ile etkileşime girerek membranın yeniden düzenlenmesinde rol

aldığı (98) bildirilmiştir. Bütün bu gözlemlerin ışığında S100B'nin, hücrenin mimari yapısının önemli bileşenlerinin bir araya toplanmasında rol oynadığı söylenebilir.

2.2.1.2. S100B'nin Hücre Proliferasyonu ve Sağkalım Üzerine Etkileri

Ca⁺⁺ ile bağlanan S100B'nin, hücre bölünmesi ve morfolojisinin düzenlenmesinden sorumlu kinazlar alt ailesine ait bir serin/threonine protein kinaz olan Ndr (nükleer Dbf2-ilişkili) ile bağlandığı ve onu aktive ettiği bildirilmiştir (99). S100B, Ca⁺⁺ ile bağlanarak tümör supressör p53 ile etkileşir ve onun fosforilasyonunu inhibe eder (100). Nöronal PC12 hücrelerinde S100B ekspresyonunun p53 düzeyleri veya nükleer translokasyon üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı, fakat artmış proliferasyon ve azalmış farklılaşmaya ve apoptoze neden olduğu gösterilmiştir (101). Kas satellit hücrelerinde ekspresse olan S100B'nin apoptozu azalttığı ve aktif satellit hücrelerinin büyümesini uyararak kas rejenerasyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (102). Bütün bu gözlemler S100B'nin hücre proliferasyonu ve sağkalımda rolü olduğunu göstermektedir.

2.2.1.3. S100B'nin Hücre Farklılaşması Üzerine Etkileri

Nöronal PC12 hücrelerinde S100B ekspresyonunun PI3-K/Akt/p21^{WAF1}/cdk4/ Rb/E2F yolak aktivasyonu aracılığıyla sinir büyüme faktörü (NGF) nedeni hücre farklılaşmasını azalttığı gösterilmiştir (101). SOX trio aracılığıyla kondrositlerin erken dönem farklılaşmasında indüklenen S100B henüz tam anlaşılmayan bir mekanizma ile kondrositlerin terminal dönem farklılaşmasını olumsuz olarak etkiler (103). Astrositik hücre dizilerinde S100B ekspresyonunun inhibisyonu, PI3-K/RhoA/ROCK aktivitesinde azalma ve GSK3β/Rac1 aktivitesinde artışa yol açarak stres fiber oluşumunun azalmasına, migrasyonun azalmasına ve farklılaşmış bir fenotip (ör, stellasyon) oluşumuna neden olur ve bu sonuç astrosit kültürlerinde S100B'nin, hücre farklılaşmasının baskılanmasına katkıda bulunabildiğini gösterir (104). Bu sonuçlara göre S100B'nin hücre farklılaşmasının bir inhibitörü olarak fonksiyon gördüğü söylenebilir.

2.2.1.4. S100B'nin Ca⁺⁺ Homeostazisi Üzerine Etkileri

S100B'den yoksun farelerin serebellar hücre kültürlerinde, astrositler KCl veya kafein uygulanmasına yanıt olarak artmış Ca⁺⁺ geçişi gösterirken, nöronlarda KCl, kafein veya NMDA uygulanmasına yanıt olarak normal Ca⁺⁺ geçişi saptanmıştır (105). Bu sonuç,

S100B'den yoksun farelerden elde edilen astrositlerde Ca^{++} kullanma kapasitesinde belirgin bir azalma olduğunu ve S100B'nin astrositlerde Ca^{++} homeostazisinin sürdürülmesinde rol oynadığını gösterir. Ancak S100B'nin bu fonksiyonu gerçekleştirme mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. S100B'nin epitelyal dokularda bir desmosomal plak proteini olan dev fosfoprotein AHNAK/desmoyokin ile Ca^{++} bağımlı bir şekilde etkileşime girdiği, bu fosfoprotein kardiyomyositlerde β -adrenerjik stimülasyona yanıtta L-tipi Ca^{++} kanallarını değiştirerek kardiyak Ca^{++} sinyalinde ve Ca^{++} akışımın düzenlenmesinde rolü olduğu bildirilmiştir (106). Bu gözlemler S100B'nin Ca^{++} homeostazisinde etkisinin olduğunu göstermektedir.

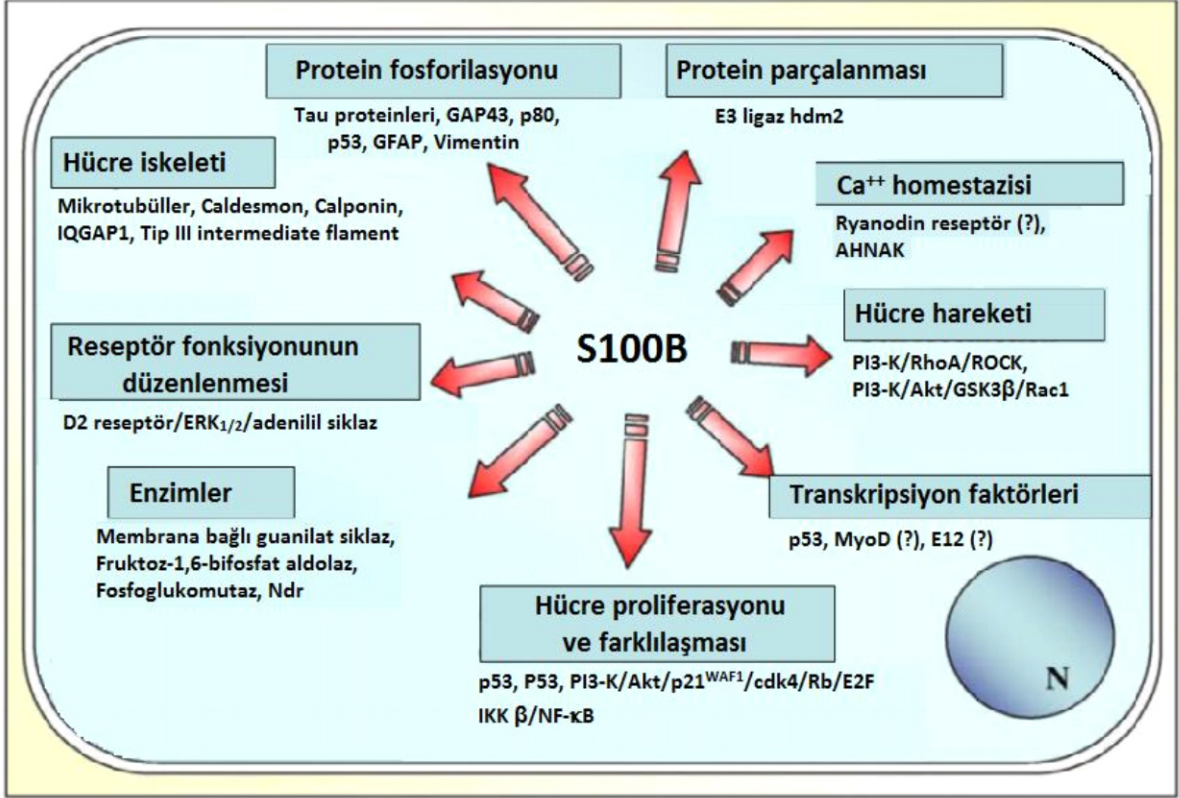
2.2.1.5. S100B'nin Enzim Aktivitesini Düzenleyici Etkileri

S100B, Ca^{++} bağımlı olarak hücre bölünmesi ve hücre morfolojisinin düzenlenmesinde önemli bir nükleer serin/treonin protein kinaz olan Ndr'yi uyarır (99). S100B, retinal Müllerian hücrelerde ve fotoreseptör dış segmentlerinde bulunan membran bağımlı guanilat siklaz aktivitesini uyarır ve fotoreseptörlerin karanlığa adaptasyonunda bir rol oynayabilir (107). S100B'nin Ca^{++} bağımlı olarak fruktoz-1,6-bifosfat aldolaz (108) ve fosfoglukomutaz (109) enzimlerinin aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Bu gözlemler S100B'nin bazı enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir.

2.2.1.6. S100B'nin Protein Fosforilasyonunu İnhibe Edici Etkileri

S100B, protein fosforilasyonunu kinaz substratlarıyla etkileşip kinazın, kinaz substratına girişini bloke ederek inhibe eder (110). Caldesmon fosforilasyonunu inhibe ederek caldesmon bağımlı aktomyosin ATPaz aktivitesindeki inhibisyonun tersine dönmesine neden olur (111). Mikrotübül ilişkili tau protein fosforilasyonunu inhibe ederek Alzheimer hastalığında S100B'nin ekspresse olduğu nöronları tau hiperfosforilasyonundan koruduğu gösterilmiştir (112). p53 fosforilasyonunu inhibe ederek p53'ün tümör supressör aktivitesinin bozulmasına yol açar ve p53 bağımlı transkripsiyon aktivasyonunun inhibisyonuna neden olabilir (113). S100'nin neden olduğu protein fosforilasyonunun inhibisyonu MARCKS, GAP-43 ve nörogranin (72), GFAP ve vimentin (68) gibi pek çok hedef proteinde bildirilmiştir. Bu protein fosforilasyonunu inhibe edici etkisi, S100B'nin sinyal iletimini azaltıcı bir rolü olabileceğini göstermektedir (35).

S100B'nin intrasellüler etkileri Şekil 6'da şematize edilmiştir.



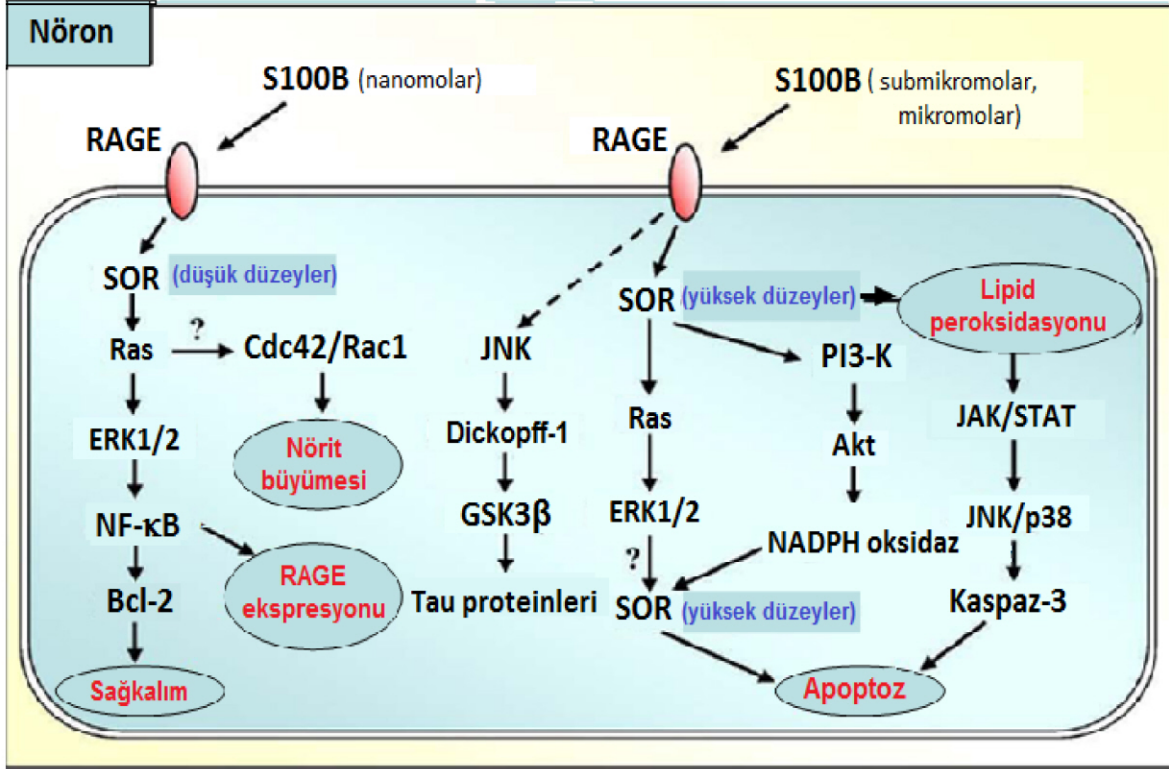
Şekil 6. S100B'nin intrasellüler düzenleyici etkilerinin şematik görünümü (1 nolu kaynaktan alınmıştır).

2.2.2. S100B Proteininin Ekstrasellüler Etkileri

2.2.2.1. S100B'nin Nöronlar Üzerine Etkileri

Ekstrasellüler S100B, nöronlar üzerinde konsantrasyonuna bağlı olarak 2 farklı şekilde; nanomolar dozlarda trofik etki ve mikromolar dozlarda ise toksik etki göstermektedir (1). S100B'nin nörit büyümesini ve rejenerasyonunu, nöronların sağkalım süresini artırdığı ve nöronlar üzerine nörotrofik etkileri olduğu gösterilmiştir (114,115). S100B, nöronları RAGE'ye (ileri glikasyon son ürünleri için reseptör) bağımlı şekilde bir Ras/MEK/ERK1/2/NF-κB yolağı aktivasyonu aracılığıyla anti-apoptotik faktör Bcl-2'nin artışına yol açarak toksik uyarılara karşı korur (116).

Ekstrasellüler S100B'nin nöronlar üzerindeki etkileri için ileri sürülen bir model Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Ekstrasellüler S100B'nin nöronlar üzerindeki etkileri için ileri sürülen model. Düşük dozlarda S100B, RAGE'ye bağlanarak orta derecede SOR üretimine neden olur ve muhtemelen Src tirozin kinaz aktivasyonu ve Ras-MEK-ERK1/2-NF-κB yolağının aktivasyonu ile sağkalım süresinde artışa ve antiapoptotik faktör Bcl-2 ve bir Rac1-Cdc42 yolağı aktivasyonu ile nörit büyümesine yol açar. Yüksek dozlarda S100B, RAGE'ye bağlanarak aşırı SOR üretimine ve mitokondrilerden beraberinde sitokrom-C salınımıyla birlikte Ras-MEK-ERK1/2 yolağının aşırı uyarılmasına ve nöronal apoptozise yol açan kaspaz-3 aktivasyonuna neden olur. S100B-RAGE-SOR bağımlı lipid peroksidasyonu sadece Down sendromluların beyindeki nöral progenitörlerde gösterilmiştir (117). (1 nolu kaynaktan alınmıştır).

2.2.2.2. S100B'nin Astrositler Üzerine Etkileri

S100B, astrositleri otokrin olarak etkiler. Düşük dozlarda S100B, astrosit hücre dizilerinin proliferasyonunu uyarır (118), yüksek dozlarda S100B'nin ise NF-κB aracılığıyla sıçan kortikal astrositlerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesini ve mRNA düzeylerini uyardığı gösterilmiştir (119,120). Yüksek dozlarda S100B ayrıca NO artışına yol açarak astrosit apoptozisine neden olur (121), astrositlerde IL-1β ekspresyonunu, β-amiloidin uyardığı glial aktivasyonu (122) ve astrositlerden IL-6 ve TNF-α salıverilmesini artırır (123). Bu gözlemlere göre, S100B astrositleri aktive edebilir, yani astrositlerin trofik hücrelerden beyin inflamatuvar yanıtına katılan hücrelere dönüşümü sürecinde rol alır. Bununla birlikte, astrositlerin S100B nedenli apoptozisi,

beyin inflamatuvar yanıtında aktive astrosit sayısını azaltmaya katkıda bulunabilir, dolayısıyla S100B inflamasyon sürecinin düzelmesinde rol oynayabilir. S100B'nin astrositler üzerindeki etkileri RAGE'ye bağımlı gözükmektedir (123).

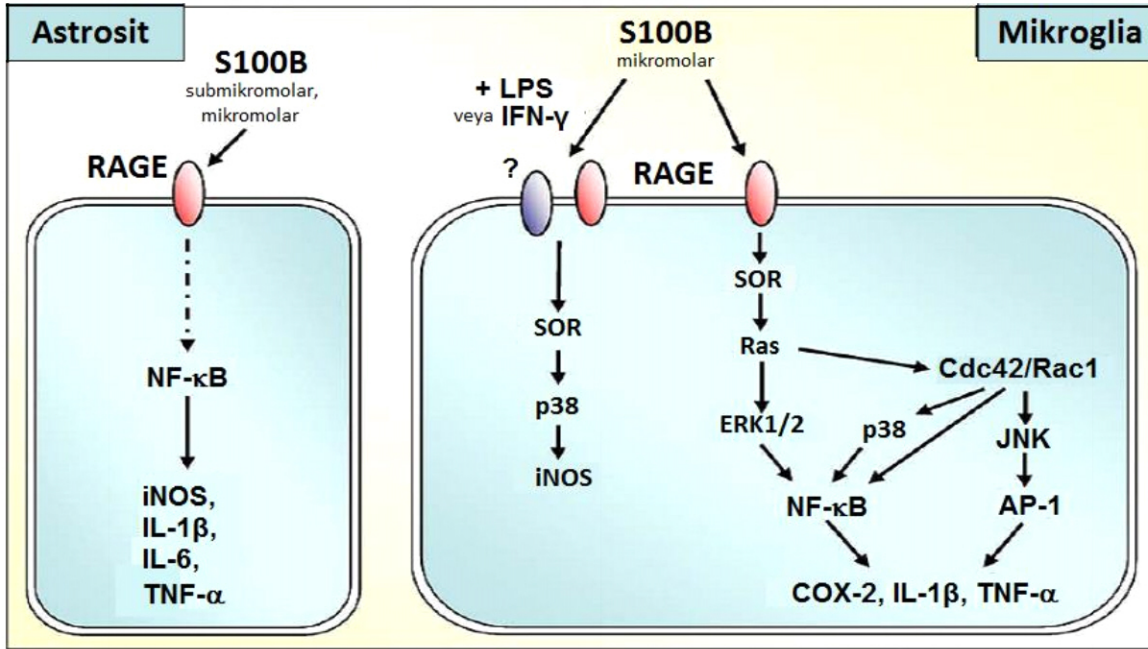
S100B'nin astrositler üzerindeki etkileri için ileri sürülen bir model Şekil 8'de gösterilmiştir.

2.2.2.3. S100B'nin Mikroglia Üzerine Etkileri

Düşük dozlarda S100B, mikroglia ve beyinde bulunan makrofajlar üzerinde nörotoksin trimetiltinin aktive edici etkilerini bloke eder (124). Aksine, yüksek dozlarda S100B ise beyin inflamatuvar yanıtında katkısı olduğu bilinen mikrogliaları aktive eder. S100B, RAGE'ye bağımlı olmaksızın mikroglialardan NO salınımı ve iNOS ekspresyonunu artırır ve bu etki bakteriyel endotoksin ve INF- γ ile sinerjistikdir (52). S100B, RAGE'ye bağımlı olarak mikroglialarda proinflamatuvar enzim siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin ekspresyonunu artırır, IL-1 β ve TNF- α üretimini uyarır (125).

Bu bilgiler, S100B'nin Alzheimer hastalığı, Down sendromu ve otoimmün hastalıklar, infeksiyonlar ve travmalar sonucundaki nöroinflamasyonda olduğu gibi mikroglia aktivasyonunun gösterildiği diğer nörodejeneratif süreçlerle ilişkili beyin hastalıklarının patogenezinde rol alabileceğini göstermektedir (1).

S100B'nin mikroglialar üzerindeki etkileri için ileri sürülen bir model Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Ekstrasellüler S100B'nin astrositler ve mikroglialar üzerindeki etkileri için ileri sürülen model. Yüksek dozlarda S100B, RAGE'ye bağlanarak NF-κB aktivasyonu aracılığıyla IL-1β, IL-6, TNF-α ve iNOS ekspresyonunu artırır. Yüksek dozlarda S100B, INF-γ aracılığıyla mikroglialarda iNOS ekspresyonunu artırır. Yüksek dozlarda S100B keza muhtemelen NADPH oksidaz kompleksinin aktivasyonu aracılığıyla RAGE'ye bağlanarak aşırı SOR üretimine neden olur. SOR, Ras-Rac1-Cdc42-MKK4/7-JNK-AP-1 ve Ras-Rac1-NF-κB yollarının aktivasyonu aracılığıyla COX-2, IL-1β ve TNF-α ekspresyonunu artırır (1 nolu kaynaktan alınmıştır).

2.2.2.4. S100B'nin Diğer Hücreler Üzerine Etkileri

S100B, insan monosit hücre dizisi, THP-1 ve insan periferik kan monositlerinde RAGE'ye bağımlı şekilde SOR üretimini artırır, COX-2 ekspresyonunu ve böylece prostaglandinlerin üretimini artırır (126). S100B yine RAGE'ye bağımlı olarak makrofajlarda p38 MAPK aktivasyonu aracılığıyla NO üretimini uyarır (127). Benzer şekilde S100B, nötrofillere kemoatraktan molekül olan N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine için nötrofil duyarlılığını artırır (128). Bu sonuçlar S100B'nin monositler, makrofajlar ve mikroglialar yanısıra nötrofillerde de RAGE'ye bağımlı olarak bakteriyel invazyona karşı ilk sıra savunmasına katıldığını, inflamatuvar gen ekspresyonunu indükleyebildiğini ve monositler, makrofajlar, mikroglialar ve nötrofillerde oksidatif yanmayı kolaylaştırabildiğini gösterir (1).

S100B, endotelial hücrelerde RAGE'ye bağlanarak NF-κB transkripsiyonel aktiviteyi (129) ve endotelial hücrelere lökosit adezyonunu artırır (130). Benzer şekilde, vasküler düz kas hücrelerinde RAGE'ye bağlanarak NADPH oksidazın uyarılması aracılığıyla SOR

üretimini ve fosfolipaz D1'nin aktivasyonu aracılığıyla JAK-2 tirozin fosforilasyonunu artırır, bu etkiler yüksek glukoz konsantrasyonları veya angiotensin II varlığında daha da artar (131).

S100B, myoblast kültürlerinde mitojenik ERK1/aktivasyonu ve myojenik p38 MAPK inhibisyonu yaparak myoblast proliferasyonunu uyarır, myojenik farklılaşmayı inhibe eder ve myoblast sağkalım süresini artırır (132). Bununla birlikte yüksek dozlarda S100B aşırı SOR oluşumu aracılığıyla in vitro myoblast apoptozisine neden olur (133).

2.2.3. S100B'nin Klinik Kullanımı

S100B ekspresyonunun Alzheimer hastalığı, kronik epilepsi, şizofreni, strok ve serebral iskemi gibi çeşitli durumlarda (80-86) arttığı gösterilmiş olmakla beraber travmatik beyin hasarı ve melanoma gibi az sayıda klinik tabloda serum veya BOS değerleri bir belirteç olarak kullanılmıştır (134). Çocuklarda travmatik beyin hasarında 0.1 µg/L eşik değerinin üstündeki serum S100B düzeylerinin kranyal tomografideki travma ile ilişkili intraserebral lezyonları %95 sensitivite ve %31 spesifite ile gösterebildiği bildirilmiştir (135). Malign melanomda da yüksek serum S100B değerlerinin tümör yükü, evresi ve prognozu ile korele olduğu ve 0.6 µg/L eşik değerinin üstündeki serum S100B düzeylerinin klinik evreden bağımsız bir prognostik belirteç olduğu bildirilmiştir (136).

2.2.4. Anabilim Dalımızda S100B ile Yapılan Çalışmalar

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında, Büyükuysal literatürde ilk kez in vitro beyin dilimlerinde iskemi-reoksijenizasyon modelinde iskemik (OGD) ortamda ve bunu takip eden reoksijenizasyon (REO) döneminde sıçan beyin dilimlerinden salıverilen protein S100B miktarını ölçmüş ve bunu dilimlerden LDH çıkışı ile karşılaştırmıştır. İskemik ortamda dilimlerden salıverilen S100B miktarının kontrol grubuna göre belirgin arttığı, bu artışın REO ortamında daha belirgin olduğu, dilimlerden LDH çıkışının ise iskemik ortamda kontrol grubu ile benzer iken REO ortamında belirgin arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, ortama eksojen glutamat eklenmesinin dilimlerden iskemi ve REO'nun neden olduğu S100B salıverilmesindeki artışı önlediği görülmüştür (3).

Daha sonra aynı model ile yapılan bir başka çalışmada Gürsoy ve Büyükuysal, bazal ve uyarılmış koşullarda sıçan kortikal dilimlerinden S100B salıverilmesi üzerine İ/R hasarında rolü olan bazı yolakların etkilerini incelemişlerdir. OGD ve REO ortamında S100B salıverilmesindeki artış üzerine *N*_o-Nitro-L-arginin metil ester hidroklorid (L-NAME) ile nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonunun, NO donörlerinin (sodyum nitroprussid ve hidroksilamin) ve NO prekürsörünün (L-arginin) etkisinin olmadığı, benzer şekilde protein kinaz C (PKC), fosfolipaz A₂ (PLA₂) ve fosfolipaz C (PLC) inhibisyonunun da etkisinin olmadığı, bunların yanısıra Ca⁺⁺ iyonlarının inkübasyon ortamından çıkarılması, Ca⁺⁺ kanallarının verapamil ile bloke edilmesi ve ekstrasellüler Ca⁺⁺ iyonlarının BAPTA ile şelasyonunun da etkisinin olmadığı görülmüştür. Aksine, yüksek konsantrasyonlarda glutamat ve α-KG eklenmesinin ise hem OGD ve hem de REO'nun neden olduğu S100B salıverilmesini önlediği gösterilmiştir (6).

2.3. Glutamat

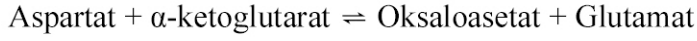
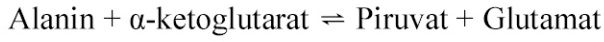
Glutamik asit, vücudumuzda bulunan bir nonesansiyel amino asit olup molekül formülü; C₅H₉NO₄, molekül ağırlığı; 147.13 g/mol ve sistematik adı; (2S)-2-aminopentanedioik asittir. Glutamik asidin karboksilat anyonu olan glutamat hücre metabolizmasında anahtar rol oynar ve vücudumuzda en bol bulunan eksitatör aminoasittir. Glutamat, SSS'nin ana nörotransmitteri olup sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde, nöronal farklılaşma, migrasyon ve beyin gelişiminde, bellek, algı ve öğrenme gibi birçok beyin fonksiyonunda ve enerji metabolizmasında rolü vardır (137,138).

2.3.1. Glutamat Sentezi

Glutamat, amino asitlerin indirgenmesi sırasında oluşan alanin ve aspartat ile glukoz metabolizmasında Krebs döngüsü sırasında ortaya çıkan ara ürün α-KG'nin transaminasyon reaksiyonları sonucu ve beyinde ise daha çok glutaminden glutaminaz enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir (137-141).

Proteinlerin parçalanması sonucu oluşan amino asitler vücutta diğer fonksiyonel işlerde metabolik bir yakıt gibi kullanılır. Amino asit indirgenmesinde kilit reaksiyon transaminasyon olup amino asidin amino (NH₂) grubu, transaminaz aracılığıyla bir α-keto aside transfer olur. Reaksiyon sonucu ortaya çıkan α-keto asit ya yakıt olarak veya daha sonraki metabolizma basamaklarında substrat olarak kullanılabilir. En yaygın α-keto asit,

Krebs döngüsünde ortaya çıkan α -KG'tır. α -KG'in transaminasyonu sonucunda glutamat oluşur. Glutamatın rol aldığı tersinir transaminasyon reaksiyonları şunlardır;



Glutamat, fazla nitrojenin vücuttan atılmasında önemli rol oynar. Glutamattan glutamat dehidrogenaz ile katalizlenen deaminasyon reaksiyonu sonucu amonyak oluşur. Amonyak da, karaciğerde üre sentezinde rol alır ve üre şeklinde vücuttan atılır (137,141-144).



Glutamat kan-beyin bariyerini geçemez. Bu nedenle SSS'ndeki glutamatın tamamı burada sentez ve depo edilmektedir. Glutamat sentezi önemli oranda sinir uçlarında glutaminin glutaminaz enzimi aracılığıyla hidroliz edilmesiyle gerçekleşir. Daha az bir kısmı ise kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen glukozun nöronlar ve astrositlerdeki metabolizması sırasında Krebs döngüsünde oluşan ara ürün α -KG ile alanin ve aspartat amino asitlerinin transaminasyonu sonucu sentezlenir (137-142).

Glutamat, beyinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda olup büyük kısmı (2-5 $\mu\text{M/L}$) hücre içinde, az bir kısmı (0.05 $\mu\text{M/L}$) ise hücre dışı sıvıda bulunur. Glutamat, sinapslarda veziküller içinde depolanır ve sinirsel impulslar aracılığıyla presinaptik hücrelerden Ca^{++} -bağımlı eksositoz mekanizmasıyla sinaptik aralığa salıverilir. Postsinaptik hücrelerdeki glutamat reseptörleri ise glutamata bağlar ve aktive olurlar (143-146).

2.3.2. Glutamat Reseptörleri

Glutamat etkilerini SSS'nde yaygın olarak bulunan çeşitli reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir (Tablo 4).

Tablo 4. Glutamat reseptörleri.

1. İyonotropik reseptörler

a. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri

NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A, NR3B

b. α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionik asit (AMPA) reseptörleri

GluR1, GluR2, GluR3, GluR4

c. Kainat (KA) reseptörleri

GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2

2. Metabotropik reseptörler (mGluR)

a. Grup I mGluR

mGluR1, mGluR5

b. Grup II mGluR

mGluR2, mGluR3

c. Grup III mGluR

mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8

2.3.2.1. İyonotropik Reseptörler

İyonotropik reseptörler (ligand kapılı iyon kanalları), uyarıldıklarında hücre membranındaki iyon kanallarının açılmasını ve hücre içine iyon geçişini sağlayan reseptörlerdir. Na^+ , K^+ ve Ca^{++} 'a olan farklı geçirgenliklerine göre 3 farklı iyonotropik reseptör vardır (147-151).

a. NMDA reseptörleri; hipokampus (stratum radiatum), striatum, talamus, serebral ve serebellar korteksde yoğun olarak bulunurlar. En çok postsinaptik dendritlerde ve dentritik uçlarda lokalizedirler. Bu reseptörler üzerinde çeşitli bağlanma bölgeleri vardır. Bunlar; NMDA ve diğer agonist tanıma bölgesi, Mg^{++} bağlanma bölgesi, glisin bağlanma bölgesi, poliamin bağlanma bölgesi, çinko bağlanma bölgesi ve antagonist tanıma ve bağlanma bölgesidir. Glutamat, reseptörün agonist bölgesine bağlandığında iyon kanalı açılır, Na^+ , K^+ ve Ca^{++} iyonlarının hücre membranından geçişini sağlar. NMDA reseptörleri, diğer iyonotropik reseptörlere göre glutamata daha fazla selektivite gösterirler, Ca^{++} 'a karşı daha fazla geçirgendirler, daha uzun süre açık kalırlar, daha yavaş gelişen ve daha uzun süren nörotransmisyona (uzun süreli potansiyalizasyon) yol açarlar. Bu reseptörlerin nöral

uyarım, nöral gen ekspresyonu ve sinaptik plastisite, öğrenme, bellek, hareketin düzenlenmesi, büyüme ve sağkalımda rol aldığı kabul edilmektedir. NMDA reseptörlerinin çok aşırı eksitasyonu, muhtemelen hücre içi Ca^{++} düzeylerinin aşırı yükselmesine yol açarak hücre ölümüne neden olur (147-151).

b. AMPA reseptörleri; dağılımı NMDA reseptörlerine benzer. Monovalan katyonlar (Na^+ , K^+ , H^+) için daha seçici olup iyon kanallarının açılması ile Na^+ hücre içine girer ve depolarizasyon oluşur. GluR2 subunitini içeren AMPA reseptörleri genel olarak Ca^{++} 'a geçirgen değildirler. NMDA reseptörlerine göre glutamata daha az seçicilik gösterirler. Hızlı eksitator sinaptik geçişde rol oynarlar ve kısa süreli potansiyalizasyona yol açarlar, presinaptik nöronlarda glutamat salıverilmesinin feedback kontrolünde, öğrenme, bellek, SSS gelişiminde ve sinaptik plastisitede rol oynarlar. Bu reseptörlerin aşırı eksitasyonu nörodejeneratif hastalıklara yol açabilmektedir (148-151).

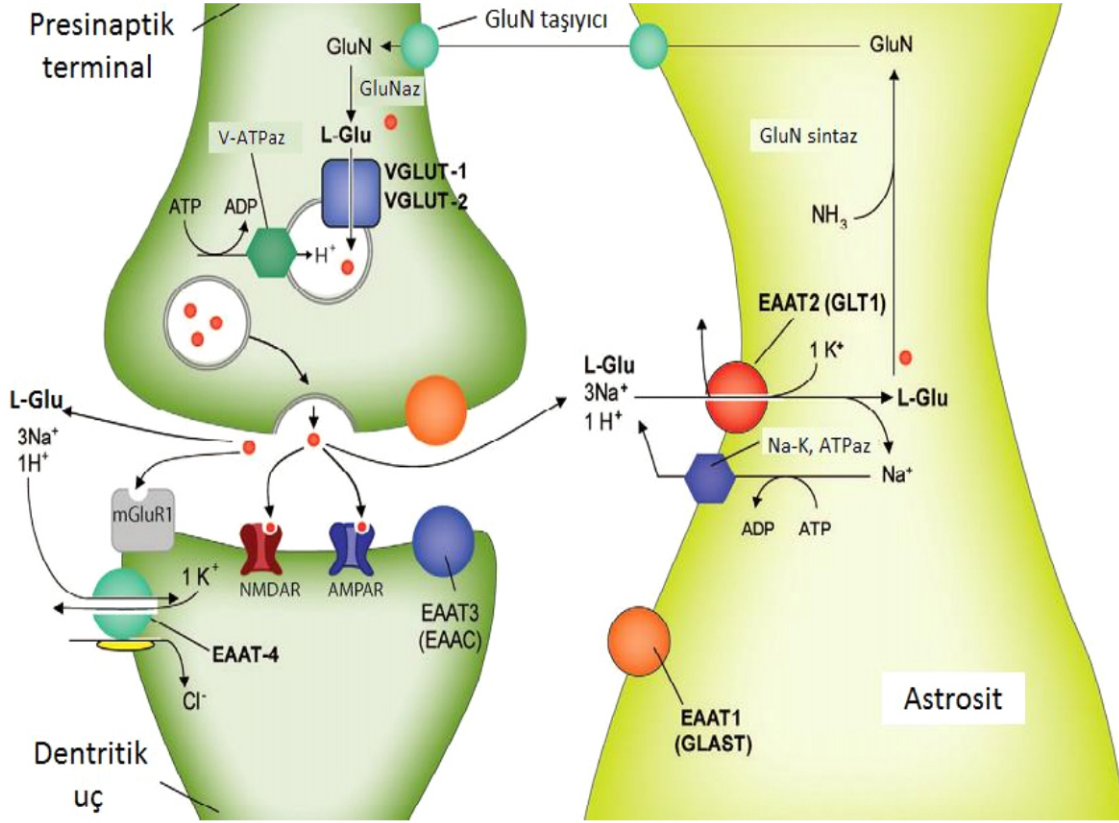
c. Kainat reseptörleri; hipokampusda (stratum lucidum), neokorteksin iç ve dış tabakalarında, glial hücreler ve korpus kallosumda bulunur. Fonksiyonel rolleri AMPA reseptörlerine benzer, postsinaptik alanda uzamış depolarizasyon oluşturur, sinaptik transmisyon ve nöronal eksitabilitede rol oynarlar (148-151).

2.3.2.2. Metabotropik Reseptörler (mGluR)

Metabotropik reseptörler (G protein-bağlı glutamat reseptörleri) sekans benzerliği, farmakolojik ve intrasellüler sinyal mekanizması özelliklerine göre 3 alt gruba (Grup I, II ve III) ayrılırlar ve medulla spinalis, talamus, amigdala ve serebral kortekste nosiseptif olaylarla ilişkili santral SS bölgelerinde başlıca glial hücrelerde yaygın olarak yer alırlar. Bu reseptörler aktive olduklarında ikincil haberciler olan inozitol trifosfat (IP_3) ve diaçil gliserol açığa çıkararak voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarının açılmasına, hücre içi Ca^{++} düzeyinin artmasına ve PKC aktivasyonuna yol açarlar. Metabotropik glutamat reseptörleri uzun süreli sinaptik plastisite, öğrenme ve nöroproteksiyonda rol oynarlar (150-152).

2.3.3. Glutamat Taşıyıcıları

Presinaptik aralığa salıverilen glutamatın postsinaptik hücre membranındaki reseptörleriyle etkileşmesi hücre dışı glutamat konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir. Presinaptik alanda glutamat konsantrasyonu çok arttığında reseptörler aşırı uyarılır ve bu da hücre için toksiktir. Bu nedenle hücre dışı glutamat konsantrasyonunun düşük tutulması gerekir. Glutamata hücre dışı alanda metabolize eden bir enzim bulunmadığından reseptörleri çevreleyen hücre dışı alandan glutamata uzaklaştırmanın başlıca yolu glutamat taşıyıcıları denilen bazı proteinler aracılığıyla glutamatın geri alınmasıdır. Hücre dışı alandaki glutamat, nöronlar ve glial hücrelerin membranlarında bulunan eksitatör amino asit taşıyıcıları (EATT1, EATT2, EATT3, EATT4 ve EATT5) aracılığıyla hücre içine geri alınırlar. EATT1; serebellum, korteks ve spinal korda astrositler ve oligodendrositlerde, EATT2; tüm beyin ve spinal korda astrositler ve oligodendrositlerde, EATT3; hipokampus, striatum ve serebellumda nöronlarda, EATT4; serebellumda Purkinje hücrelerinde ve EATT5 ise retinada fotoreseptörler ve bipolar hücrelerde ekspresse olurlar ve sodyum bağımlı olarak etkilerini gösterirler. EATT'ler aracılığıyla hücre içine giren glutamatın bir kısmı veziküller glutamat taşıyıcıları (VGLUT1, VGLUT2 ve VGLUT3) aracılığıyla sinaptik veziküller içine taşınır ve daha sonra salıverilmek üzere orada depolanır. VGLUT1; başlıca serebral ve serebellar korteks ve hipokampusta, VGLUT2; subkortikal nöronlarda ve VGLUT3 ise astrosit ve nöronların soma ve dendritlerinde ekspresse olurlar. Glutamatin salıverilmesi çok hızlı olduğundan, EATT inhibitörleri (glutamat uptake inhibitörleri) aracılığıyla glutamat geri alınımının inhibe edilmesi saniyeler içerisinde hücre dışı alanda glutamat miktarının aşırı artmasına, reseptörlerin aşırı uyarılmasına ve hücre içinde glutamat eksitotoksitesinin ortaya çıkmasına neden olur (153-155). VGLUT'lar ve EATT'lerin dağılımı ve mekanizması Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT'lar) ve eksitator amino asit taşıyıcılarının (EATT'lar) dağılımı ve mekanizması. L-Glutamat presinaptik terminallerde glutaminaz aracılığıyla sentezlenir ve başlıca VGLUT1 ve daha az olarak VGLUT2 ve VGLUT3 aracılığıyla sinaptik veziküllerde depolanır. Vezikül içine L-Glutamat alımı bir proton (H^+) bağımlı veziküler (V)-ATPaz aracılığıyla olur. Salıverilen glutamat kendi reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. Glutamatın postsinaptik etkileri çeşitli EATT'ler (astrositlerde başlıca EAAT2 ve daha az olarak EATT1) aracılığıyla sonlandırılır. Glutamatın EATT'ler aracılığıyla hücre içine taşınması hücre içine $3 Na^+$ ve $1 H^+$ iyonunun girişi ve $1 K^+$ çıkışıyla olur. EATT4 ve EATT5 glutamat kapılı klorid (Cl^-) kanalları gibi fonksiyon görebilir (154 nolu kaynaktan alınmıştır).

2.3.4. Glutamat Metabolizması

Hücre dışı alandan EATT'ler aracılığıyla hücre içine alınan glutamatın bir kısmı protein sentezi ve enerji metabolizması gibi metabolik süreçlerde kullanılırken, bir kısmı VGLUT'lar aracılığıyla sinaptik veziküller içine taşınarak depolanır ve gerektiğinde ekzositoz yoluyla salıverilerek nörotransmitter olarak fonksiyon görür. Astrositlere giren glutamatın bir kısmı ise farklı yollarla glutamin veya α -KT'a dönüşebilir. Glutamatın glutamine dönüşümü enerji gerektiren bir reaksiyonla glutamin sentetaz aracılığıyla olur ve oluşan glutamin hücre dışı ortama salıverilir. Glutamin hücre dışı ortamdaki glutamin taşıyıcıları aracılığıyla nöronların içine taşınır ve burada bir kısmı glutamat prekürsörü olarak kullanılarak enerji gerektirmeyen bir reaksiyonla glutaminaz enzimi ile tekrar

glutamata dönüştürülür. Bu döngüye “glutamat-glutamin döngüsü” adı verilir. Nöronlara giren glutaminin bir kısmı ise enerji substratı olarak kullanılmaktadır. Glutamatın α -KG’ya dönüşümü ise iki şekilde olabilir. Ya glutamat dehidrogenaz aracılığıyla deaminasyon reaksiyonu sonucu veya transaminazlar aracılığıyla transaminasyon reaksiyonu sonucu α -KG oluşur. α -KG, Krebs döngüsüne katılarak süksinat, fumarat ve malata metabolize edilebilir ve malatın dekarboksile edilmesiyle piruvata ve bunun indirgenmesiyle de laktata dönüşebilir. Glutamin ve laktat astrositlerce hücre dışı alana salıverilir ve buradan da glutamin taşıyıcıları ve monokarboksilat taşıyıcıları (MCT) aracılığıyla nöronlar tarafından alınıp kullanılabilir (155-160).

2.3.5. Glutamat Eksitotoksitesi

Glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu sonucu nöron ölümüne yol açmasına glutamat eksitotoksitesi denir. Bu reseptörlerin aşırı aktivasyonu, presinaptik alana aşırı glutamat salıverilmesine veya hücrelere glutamat geri alım yetersizliğine bağlı olarak hücre dışı alanda glutamat konsantrasyonunun aşırı artması nedeniyle oluşabilir. Eksitotoksitede rolü olan faktörlerin başlıcaları; proteazlar, protein kinazlar, fosfolipazlar, endonükleazlar ve NOS gibi enzimatik yollardaki anormallikler nedeniyle kalsiyum homeostazisinin bozulması ve hücre içi kalsiyum düzeylerinin aşırı artması, hücre içi SOR artışı, hücre dışı glutamat konsantrasyonundaki aşırı artış nedeniyle sistemin hücre içine yeterli derecede girememesine bağlı hücre içi glutatyon eksikliği, kaspaz aktivasyonu ve hücre içi proteinlerin parçalanmasıdır. Akut glutamat eksitotoksitesinin akut şişme ve geç dejenerasyon olmak üzere iki ayrı fazı vardır. İlk fazda, nöronun depolarizasyonu ile hücre içine sodyum ve klor iyonları ile birlikte su girer ve akut nöronal şişmeye neden olur. İkinci faz sırasında nöronal NMDA reseptörleri, bazı AMPA reseptörleri ve voltaj kapılı kalsiyum kanallarından kalsiyum hücre içine girer, hücre içi kalsiyum homeostazı bozulur ve doğrudan veya SOR’nin oluşumuna yol açarak dolaylı olarak hücre hasarına neden olur. İskemik beyin hasarı, strok, hipoglisemik beyin hasarı, epilepsi, kafa travması ve toksik ensefalopatiler gibi bazı nörolojik hastalıkların oluşumunda akut eksitotoksitenin rolü vardır (148,161-165).

2.4. Alfa-Ketoglutarat (α -KG)

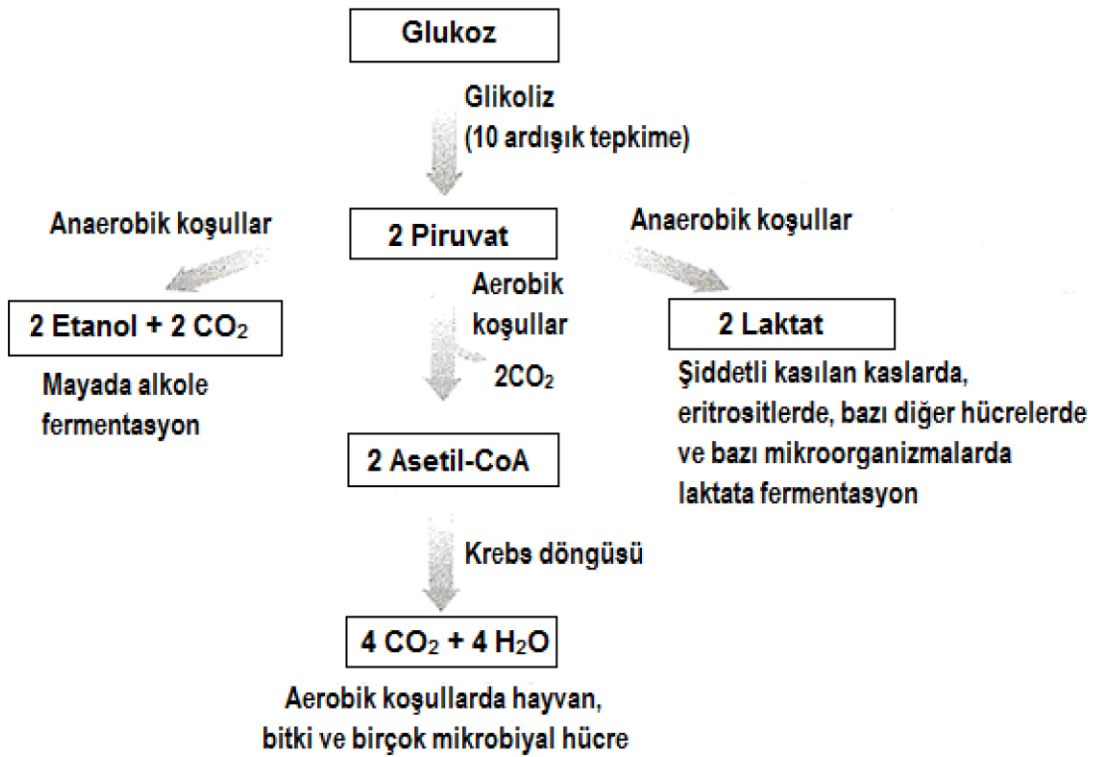
α -KG; Krebs döngüsünde yer alan anahtar moleküllerden olup metabolik yollarda en önemli nitrojen taşıyıcılarından biridir. Glutamattan glutamat dehidrogenaz aracılığıyla oksidatif deaminasyon ile veya transaminasyon yoluyla oluşur (bakınız 2.3.1). Krebs döngüsünde de izositrattan izositrat dehidrogenaz aracılığıyla oksidatif dekarboksilasyon ile oluşur ve α -KG dehidrogenaz aracılığıyla süksinil CoA'ya dönüşür (137,166). Bir enerji substratı olan α -KG'nin sitoprotektif etkileri de vardır. Kalp ameliyatına giden hastalarda yapılan bir çalışmada α -KG verilen grupta kontrol grubuna göre 30 dk'lık klempten sonra daha az ciddi doku hasarı bulguları (myokardiyal tip kreatinin kinaz ve troponin düzeyleri daha düşük), daha yüksek myokardiyal oksijen ve daha düşük laktat düzeyleri bildirilmiştir (167). α -KG'nin antioksidan etkileri de vardır. Beyinde eksitotoksik bir ajan olan kainik asit aracılığıyla oluşturulan mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarı ve nöbetler üzerine α -KG ve oksaloasetatın (OA) etkisinin in vivo ve in vitro koşullarda araştırıldığı bir çalışmada, farelere intraperitoneal kainik asit enjeksiyonu nöbet oluştururken kainik asitten 1 dk önce zerkedilen α -KG ve OA'nın nöbetleri önlediği, bu farelerin frontal korteksinden izole edilen mtDNA'nın agar jel elektroforez ile yapılan değerlendirmesinde kainik asit, mtDNA hasarına yol açarken kainik asit öncesi α -KG ve OA enjeksiyonu yapılan gruplarda bu hasarın önlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada kainik asit lipid peroksidasyonunda artışa yol açmış, α -KG ve OA ise lipid peroksidasyonundaki bu artışı inhibe etmiştir (168). Çeşitli α -keto asitlerin H_2O_2 temizleyici kapasiteleri ve nöroprotektif özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada α -KG, nöronları H_2O_2 nedenli toksisiteye karşı piruvat, OA ve 2-KB'a benzer şekilde korumuştur (169).

2.4. Piruvat

Piruvat; piruvik asitin karboksilat iyonu (CH_3COCOO^-) olup glikoliz metabolik yolağının son ürünüdür. Glikoliz, glukozun çeşitli enzimler aracılığıyla bir seri reaksiyon sonucunda enerji ve diğer metabolik yollara ara ürün sağlamak için piruvata kadar yıkılması olayıdır ve tüm canlılarda aynı şekilde gerçekleşir. Glikoliz sonucu her bir glukoz ($C_6H_{12}O_6$) molekülünden 2 molekül piruvat ($C_3H_6O_3$), 2 NADH + H^+ (indirgenmiş nikotin amid adenin dinükleotit) ve kazanç olarak 2 ATP oluşur. Piruvat bundan sonra ortamın oksijenizasyon derecesine, dokunun mitokondrisi olup olmaması gibi faktörlere bağlı olarak başlıca 3 yıkım yolundan biriyle daha fazla enerji sağlamak üzere metabolize edilir (170-172).

1. Mitokondrisi ve yeterli oksijeni olan hücrelerde (aerobik koşullarda); pirüvat → asetil-koenzim A'ya dönüşerek Krebs döngüsüne girer ve sonunda CO₂ ve H₂O moleküllerine kadar parçalanır. Bu oksidasyonlardan açığa çıkan elektronlar H₂O oluşturmak üzere mitokondrideki bir dizi taşıyıcı aracılığıyla O₂'e geçirilir. Elektron transfer reaksiyonları sonucunda 36 ATP sentezlenmiş olur.
2. İnsan ve hayvanlarda hipoksik (anaerobik) koşullarda; pirüvat → laktat'a dönüşür. İskelet kasları düşük oksijenli koşullarda (hipoksi) uzun süre kasıldıkları zaman NADH yeniden NAD⁺'a oksitlenemez ve pirüvatın daha ileri oksidasyonu için bir elektron alıcısı olarak NAD⁺'a gereksinim duyulur. Bu koşullar altında pirüvat NADH'dan elektronları alarak glikolizin devamı için gerekli olan NAD⁺'ı yenilerken laktata indirgenir. Bazı dokular ve hücre tipleri (retina, beyin, eritrositler) glukozu aerobik şartlar altında dahi laktata çevirir.
3. Bazı bitki dokularında, bazı omurgasızlarda ve bira mayası gibi mikroorganizmalarda hipoksik (anaerobik) koşullarda; pirüvat → alkol (veya etanol) fermentasyonu denilen bir işlemle etanol ve CO₂'e dönüştürülür.

Glikoliz sonrası pirüvatın yıkımı Şekil 10'da gösterilmiştir.

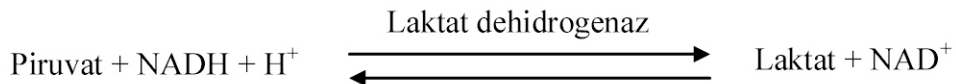


Şekil 10. Glikoliz sonucu pirüvatın yıkım yolları (170 nolu kaynaktan alınmıştır).

Piruvat, hücreler için bir enerji substratı olmanın yanısıra antioksidan özelliklere de sahiptir. Piruvatın nöroprotektif etkisi çeşitli in vivo ve in vitro oksidatif stres modellerinde gösterilmiştir (12,173-179). Piruvat; hücre kültürleri ile yapılan bir çalışmada nöronları hem dış ortama eklenen eksojen ve hem de deneysel olarak oluşturulan endojen H₂O₂'ye karşı güçlü bir şekilde korumuş (12), bir başka çalışmada ise fare nöroblastoma hücrelerinde H₂O₂ toksisitesine karşı koruyucu etki göstermiştir (173). Nöronal hücre kültürlerinde β-amyloid proteinin SOR üretimini artırarak oksidatif stres aracılığı ile neden olduğu nöronal ölümün ortama eklenen piruvat ve malat tarafından önlendiği gösterilmiştir (174). Etil piruvat (EP), multivisseral İ/R hasarı sonrası hepatik lipid peroksidasyonunu iyileştirmiş, organ hasarına karşı korumuştur (175). Sodyum piruvat insan nöroblastoma hücre dizisi SK-N-MC'de H₂O₂'nin neden olduğu apoptozise karşı SOR temizleyici etki göstermiş (176), yine kültür ortamında hipotalamik nöronlarda çinkonun neden olduğu nörotoksisiteyi inhibe etmiştir (177). Piruvatın bir in vivo çalışmada çinko toksisitesi ile geçici ön beyin iskemisine maruz bırakılan sıçanlarda nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (178). Domuzda uzamış kontrollü arteriyel hemoraji ile yapılan şok-iskemi modelinde piruvatın beyin metabolizması ve fonksiyonlarını koruduğu gösterilmiştir (179). Geçici ve kalıcı orta serebral arter oklüzyonu yapılan fokal serebral iskemili sıçan modellerinde piruvatın koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada piruvat tedavisinin hem geçici (1 saat) ve hem de kalıcı oklüzyon modellerinde infarkt volümünü %50'den fazla azalttığı rapor edilmiştir (180). Piruvat, özgül bir MCT aracılığıyla hücre membranından hücre içine veya dışına taşınabilir ve böylece H₂O₂ tutucu etkisini hem intrasellüler ve hem de ekstrasellüler ortamlarda gösterebilir (181,182).

2.5. Laktat

Laktik asit (CH₃CHOHCOOH), kimyasal adı α-hidroksipropanoik asit olan bir organik hidroksi asittir. Laktat, laktik asitin sodyum veya potasyum tuzudur. Glikoliz sonucu oluşan piruvatın anaerobik koşullarda yıkılmasıyla, LDH enzimi aracılığıyla laktik asit oluşur (bakınız bölüm 2.5). Fizyolojik pH'daki aköz bir solüsyonda laktik asit hemen tamamen laktat ve H⁺ iyonuna ayrılır. Bu nedenle laktik asit ve laktat terimleri birbirinin yerine kullanılabilir (170-172).



Yukarıdaki reaksiyon tersinir olup anaerobik metabolizma sonrası tekrar O₂'li ortam oluştuğunda laktat, piruvat ve NADH+H⁺ya dönüşür, daha sonra bu maddeler oksidasyona girerek çok miktarda ATP oluşturur. Anaerobik metabolizmanın uzun sürmesi durumunda sitoplazmada biriken laktat daha sonra hücre dışına çıkar ve kan yoluyla dokulardan uzaklaştırılır. Büyük kısmı karaciğerde glukoneogenezde kullanılarak daha az kısmı da CO₂ ve H₂O'ya oksidasyon şeklinde metabolize edilir (170-172,183-185). “Beyin tüm ATP’yi glukoz oksidasyonu ile sağlar” şeklindeki klasik görüşe karşın son yıllarda ileri sürülen ve kabul gören astrosit-nöron mekik hipotezine (*astrocyte-neuron shuttle hypothesis*; ANLSH) göre, beyin enerjisinin önemli bir kısmı astrositlerde glukozun laktata dönüşmesi ve takiben laktatın nöronlarda oksidasyonu ile elde edilir (186-189).

Laktatın bu enerji substratı olma özelliklerinin yanısıra antioksidan özelliğe sahip olduğu da gösterilmiştir. Groussard ve arkadaşları (190) elektron paramanyetik rezonans metodu kullanarak yaptıkları in vitro bir çalışmada hem superoksit anyonu (O₂⁻) ve hem de hidroksil radikaline ([•]OH) karşı laktatın SOR temizleyici etkisi olduğunu göstermişlerdir. Herz ve arkadaşları da (191) laktatın indirekt antioksidan etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Yazarlar laktatın bir antioksidan ajan olan piruvat oluşturarak ve sonuçta onu asetat ve CO₂'ye ayrıştırarak [•]OH'ı temizlediğini ileri sürmüşlerdir.

2.6. 2-Ketobutirat (2-KB) (Alfa-Ketobutirat)

Bir çok aminoasidin metabolizmasında rol oynayan 2-KB, treonin dehidrataz aracılığıyla treoninden, sistatyoninaz aracılığıyla sistationinden ve homosistein metabolizması sırasında metioninin sisteine transsülfürasyonu sonucu oluşur. 2-KB, mitokondriyal matriks içine taşınır ve dallı zincirli α -keto asit dehidrogenaz kompleksi aracılığıyla propionil-CoA'ya dönüşür. Bu da mitokondride daha sonraki reaksiyonlarla bir Krebs döngüsü ara ürünü olan suksinil-CoA'ya dönüşerek bir enerji substratı olarak etki eder (192-194).

2.9 Menadion

Menadion (2-metil-1,4-naftakinon, menafton, K₃ vitamini), sentetik olarak yapılan ve yağda çözünen en basit yapıya sahip K vitamini türüdür. Menadionun türevleri olan menadion sodyum bisülfid ve menadiol sodyum difosfat ise menadion ve diğer doğal K vitaminlerinin tersine suda çözünen K vitaminleridir. K vitamini preparatları genel olarak bu vitamin eksikliğine bağlı hipoprotrombinemi ve ona bağlı kanamaların önlenmesi ve tedavisi için

kullanılırlar. Menadion ve onun suda çözünen türevleri, eritrositlerinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği olanlarda hemolize neden olabilirler (195). Menadionun SOR oluşturuıcı etkileri vardır ve pek çok çalışmada bu amaçla kullanılmıştır (196-199). Kossenjans ve arkadaşları (196) bir in vitro çalışmada öküz kalbi mikrovasküler endotelial hücrelerinde menadiona bağılı oksidatif strese bağılı vasküler hasar modelinde menadiona maruz kalmakla O_2^- , H_2O_2 ve $\cdot OH$ radikallerinin arttığını göstermişlerdir. Criddle ve arkadaşları (197) pankreatik asiner hücre kültürlerinde yaptıkları bir çalışmada menadiona maruz kalma ile belirgin SOR artışı olduğunu ve bir antioksidan olan N-asetil sistein ile bu SOR oluşumunun önlendiğini göstermişlerdir.

2. 9 Laktat Dehidrogenaz (LDH)

LDH; glikolitik yolakta rolü olan sitoplazmik bir enzim olup laktat ve piruvatın birbirlerine dönüşmesini katalize eder (170). Hipoksi, iskemi, nekroz, neoplastik hastalıklar, bakteriel toksinlere maruziyet, dehidratasyon, hemoliz, kimyasal maddelerle zehirlenmeler gibi hücre hasarı veya hücre ölümüne yol açan durumlarda stoplazmadan ekstrasellüler aralığa permeabilitesi bozulmuş membrandan geçerek çıkar. Bu nedenle hücre hasarı veya hücre ölümünü belirlemede kullanılır (200,201).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Materyaller

Protein S100B; BioVendor (Brno, Czech Republic), L-Glutamik asit HCl; Research Biochemicals International (Natick, MA, USA), α -Ketoglutarik asit, 2-Ketobutirik asit, Sodyum piruvat, etil piruvat, L(+)-Laktik asit, Menadione, Albumin Bovine, (+)-MK-801 hidrojen malate (MK-801), CNQX-disodyum tuzu (CNQX), (+)- α -Metil-4-karboksi-fenilglisin (MCPG) ve L-trans-Pirolidin-2,4-dikarboksilik asit (L-trans-PDC); Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA), Laktat dehidrogenaz ise Biolabo Sa (Maizy, France) firmalarından temin edildi.

3.2 Beyin Dilimlerinin Hazırlanması ve İnkübasyonu

Bu çalışmada Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen 3 aylık, ağırlığı 250-300 gr olan dişi Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı. Tüm deneysel protokol için Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alındı (Karar no: 2008-15/5). Çalışma sırasında hayvan etik kurallarına uygun olarak deneyde kullanılan hayvan sayısını azaltmak ve hayvanların acı çekmesini en aza indirmek için azami çaba gösterildi.

Deney Büyükuysal'ın (3) beyin dilimlerinde iskemi-reoksijenasyon modeline uygun olarak yapıldı. Sıçanlar dekapite edildikten sonra beyinleri hızla çıkartıldı ve önceden soğutulmuş, oksijenlenmiş (%95 O₂ ve %5 CO₂ ile) ve içinde 120 mmol/L NaCl, 1.3 mmol/L CaCl₂, 1.2 mmol/L MgSO₄, 1.2 mmol/L NaH₂PO₄, 3.5 mmol/L KCl, 25 mmol/L NaHCO₃ ve 10 mmol/L glukoz bulunan fizyolojik sıvı (Krebs) içine alındı. Daha sonra hızlı bir şekilde korteks disseke edildi ve doku dilimleyicisine (McIlwain) yerleştirilerek 0.3 mm kalınlığında dilimlendi. Dilimlenmiş doku, içinde soğuk ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvı bulunan petri kabına alındı ve dilimler fırça yardımıyla birbirinden ayrıldı. Ayrılan dilimler pipet kullanılarak fizyolojik sıvı ile yıkandı ve böylece ortamdaki ufak doku parçaları uzaklaştırıldı. Yıkamış dilimler fırça yardımıyla içlerine oksijenlenmiş fizyolojik çözelti konmuş (2 ml), dilimlerin birbiriyle temas etmediği 4 ayrı bölmesi olan inkübasyon tüplerine, her bölmede bir dilim olacak şekilde yerleştirildi. Dilimler 37°C'deki su banyosunda inkübasyona bırakıldı ve dilimlerin içinde inkübe edildikleri bölmeli tüplerdeki sıvı her 10 dk'da bir taze oksijenlenmiş sıvıyla değiştirildi. 90 dk'lık denge döneminden sonra dilimler kontrol veya iskemik ortamda olmak üzere 37°C'de 60 dk

süreyile inkübe edildi. İskemik ortam, glukoz ve oksijen içermeyen Krebs çözeltilisinin vakum altında degaze edilmesi ve ardından %95 N₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılmasıyla hazırlandı. Glukoz yokluğunda ortamın osmolaritesi NaCl konsantrasyonunda ekivalan miktardaki artışla korundu. İskemik inkübasyon döneminin sonunda dilimler glukoz ve oksijen içeren ortama aktarıldı ve bu koşullarda 60 dk süreyile inkübe edildi (REO). İskemi ve REO dönemleri sonunda inkübasyon, dilimlerin 2 ml 0.4 N HClO₄ bulunan tüplere alınması ile sonlandırıldı. İskemi ve REO dönemlerinde toplanan inkübasyon ortamları dilimlerden salıverilen protein S100B ve LDH ölçümü için kullanıldı. Dilimlerin 2 ml 0.4 N HClO₄ içinde homojenize edilmesiyle elde edilen homojenat doku protein düzeyinin ölçümü için kullanıldı.

Çalışmada glutamat (1 mM) ile α -KG, piruvat, laktat (H₂O₂ tutucusu ve enerji substratı) ve 2-KB (enerji substratı), iskemi ve REO dönemlerinde farklı konsantrasyonlarda (1 mM, 2 mM, 4 mM) inkübasyon ortamlarına eklenerek etkileri incelendi.

Etkileri test edilmek istendiğinde glutamat reseptör antagonistleri MK-801 (NMDA reseptör antagonisti), CNQX (AMPA/Kainat reseptör antagonisti) ve MCPG (metabotropik reseptör antagonisti) ile glutamat uptake inhibitörü olan L-trans-PDC glutamatın bulunduğu inkübasyon ortamlarına eklendi.

Menadion (hücre içinde O₂ ve H₂O₂ açığa çıkarır) etkisi ise sadece normoksik koşullarda test edildi. Bu nedenle preinkübasyon döneminden sonra farklı konsantrasyonlarda menadion (1 μ M - 1 mM) ortama eklendi ve dilimler menadion içeren ortamda 60 dk süreyile inkübe edildi. Ardından aynı dilimler menadionsuz ortama alınarak 60 dk daha inkübe edildi. Menadionlu ve menadionsuz dönemler sonunda toplanan inkübasyon ortamları dilimlerden salıverilen protein S100B ve LDH ölçümü için kullanıldı.

3.3 Protein S100B Ölçümü

İnkübasyon ortamına salıverilen protein S100B miktarı, söz konusu proteinin β -subünitine özgü olan ve proteinin hem $\beta\beta$ ve hem de $\alpha\beta$ izoformlarında β -subünit konsantrasyonlarını ölçen bir enzim immünoassay test kiti (BioVendor, Laboratori medicina a.s. Czech Republic) ile ölçüldü. Örnekler önce distile su ile dilüe edildi (dilüsyon oranı 1/20) ve dilüe örneğin 50 μ l'si protein S100B ölçümü için kullanıldı.

3.4 Laktat Dehidrogenaz Ölçümü

İnkübasyon ortamındaki LDH aktivitesi ticari bir spektrofotometrik kit kullanılarak (Biolabo Sa, Maizy, France) ölçüldü. 50 µl inkübasyon ortamı 0.6 ml LDH reaksiyon çözeltisiyle karıştırıldı ve karışımın absorbansı birer dk arayla 37°C'de 340 nm'de ölçüldü. LDH aktivitesi bu absorbans değerleri arasındaki farka göre hesaplandı ve daha sonra dilimlerin protein düzeylerine göre düzeltilerek verildi.

3.5 Total Protein Ölçümü

Dilimlerden salıverilen protein S100B ve LDH miktarı total doku proteinine oranlanarak verildi. Bu nedenle inkübasyon tüplerindeki kortikal dilimlerin total protein düzeyleri ölçüldü. İnkübasyonu 2 ml 0.4 N HClO₄ içinde sonlandırılan dilimler sonikatör yardımıyla homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra doku protein düzeyleri Lowry ve arkadaşlarının (202) yöntemine göre 50 µl'lik doku homojenatı kullanılarak ölçüldü. Protein standartları 0.4 N HClO₄ içinde hazırlandı ve doku örnekleriyle birlikte çalışıldı.

3.6 Veri Analizi

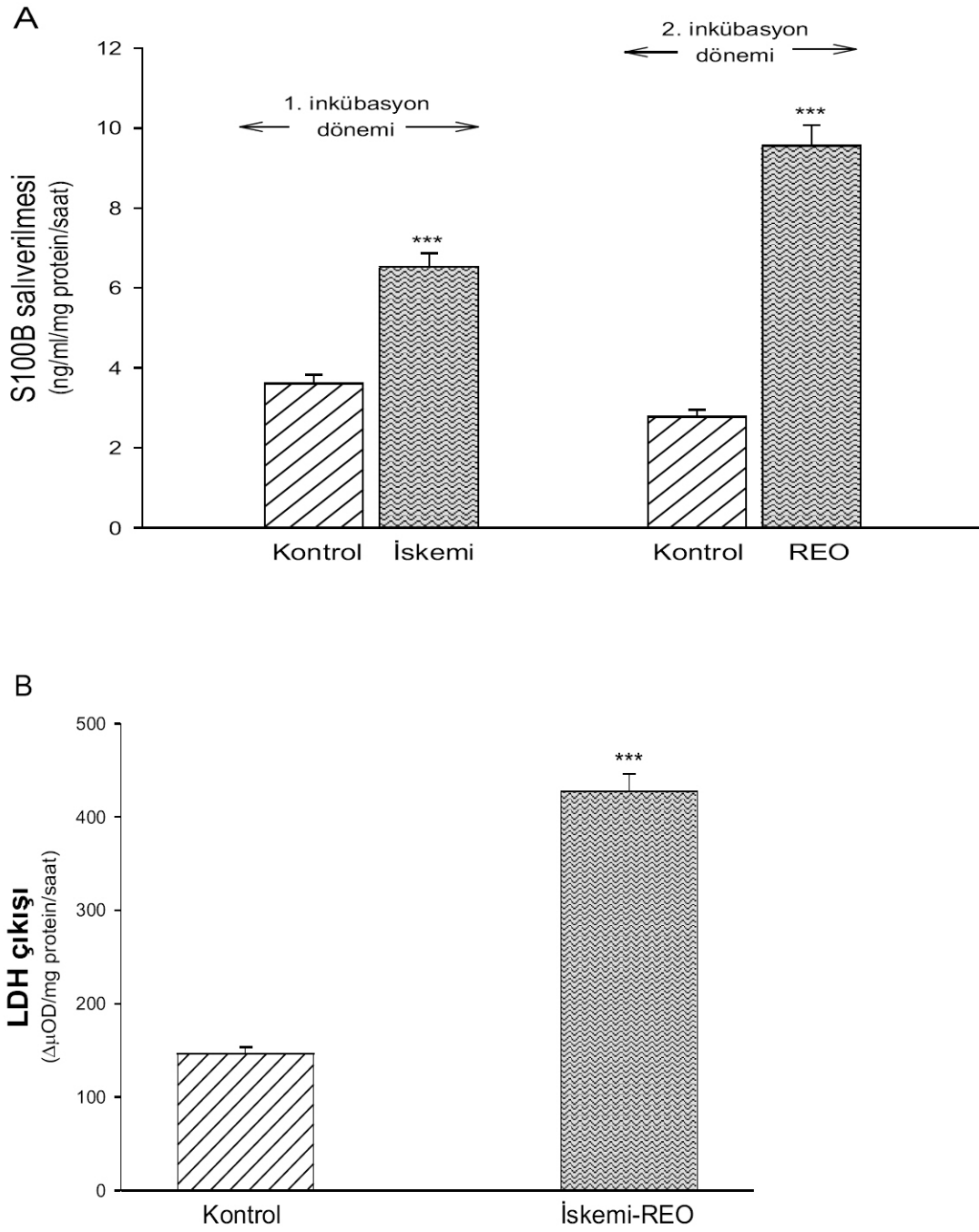
Çalışmada elde edilen değerler ortalama ± standart hata şeklinde verildi ve sonuçların anlamlılığı one-way ANOVA varyans analizi sonrası Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi ve Student's *t*-testi kullanılarak değerlendirildi. $p < 0.05$ değeri anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Kontrol, İskemi ve REO Dönemlerinde Kortikal Dilimlerden S100B ve LDH Salıverilmesi

Kontrol koşullarda oksijen ve glukoz içeren ortamda 1 saat süreyle inkübe edilen kortikal dilimlerden 3.6 ± 0.2 ng/ml/mg protein S100B salıverildi. İnkübasyon ortamından oksijen ve glukozun çıkartılması (iskemi) salıverilen protein S100B miktarını 6.5 ± 0.3 ng/ml/mg'a yükseltti ($p < 0.001$; Şekil 11A). REO döneminde kontrol dilimlerden salıverilen protein S100B miktarı 2.8 ± 0.2 ng/ml/mg iken iskemik dilimlerden REO döneminde salıverilen S100B miktarı 9.6 ± 0.5 ng/ml/mg bulundu ($p < 0.001$; Şekil 11A). Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında iskemik dönemdeki S100B artışının %81, REO dönemindeki artışın ise %244 olduğu hesaplandı.

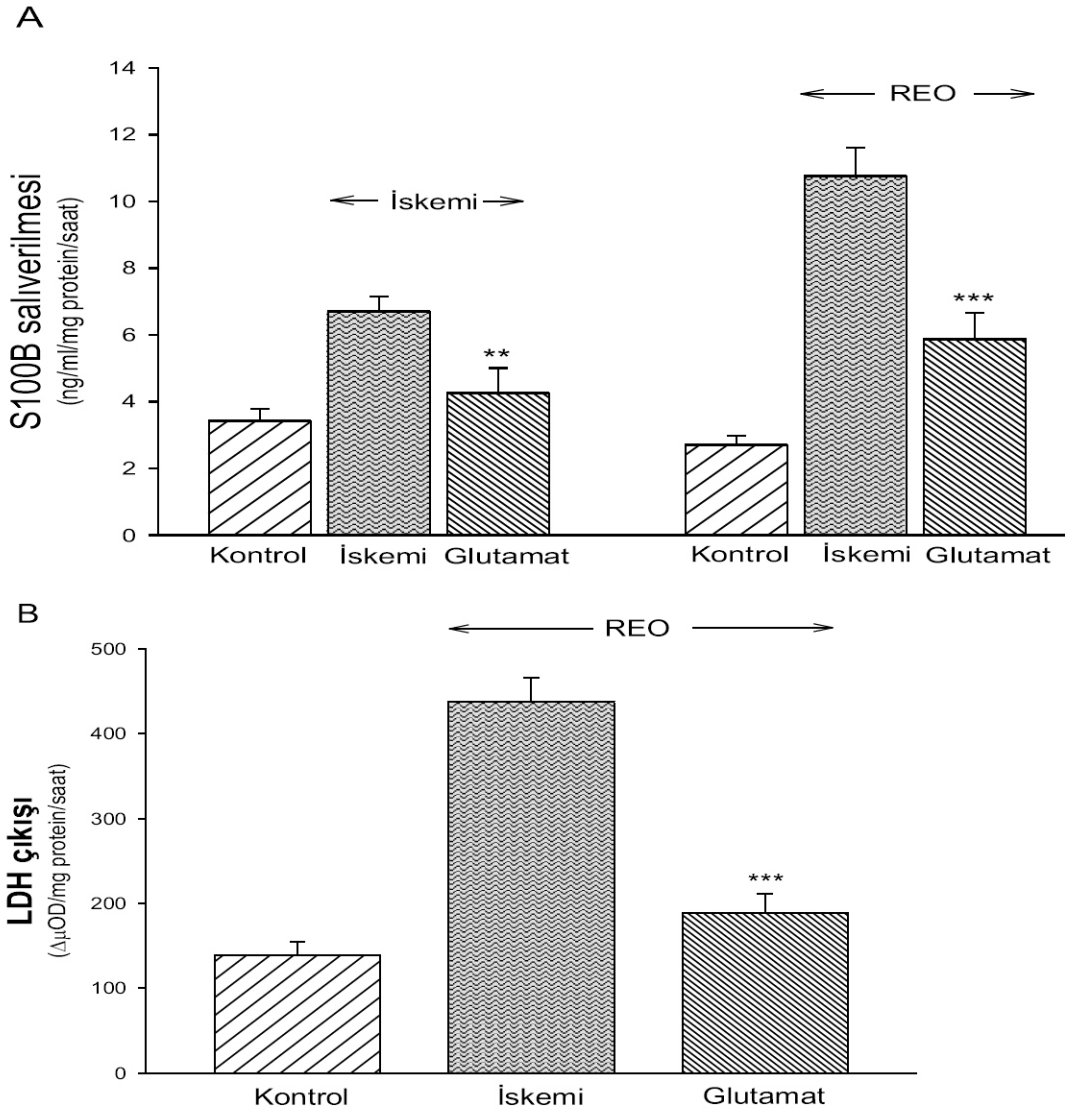
Anabilim Dalımızda daha önce yapılan bir çalışmada (3) kortikal dilimlerin 1 saat süreyle iskemik ortamda inkübe edilmesinin LDH çıkışını etkilemediği, aksine bu dilimlerden REO döneminde salıverilen LDH'nin anlamlı şekilde arttığı rapor edilmişti. Bu nedenle çalışmamızda LDH çıkışları sadece REO dönemi sonrası ölçüldü. Şekil 11B'de görüldüğü gibi iskemik dilimlerin REO'ya alınmasının LDH çıkışını kontrol değerlere göre %192 oranında arttırdığı ($146 \pm 7 \Delta\mu\text{OD}/\text{mg}$ proteine karşılık $427 \pm 19 \Delta\mu\text{OD}/\text{mg}$ protein) gözlemlendi ($p < 0.001$).



Şekil 11. İskemi ve REO'nun kortikal dilimlerden protein S100B (Şekil 11A) ve LDH (Şekil 11B) saliverilmesi üzerine etkisi. Kortikal dilimler 90 dk'lık preinkübasyon dönemi sonrasında 1 saat süreyle kontrol veya iskemik koşullarda inkübe edildi. Ardından bütün dilimler 1 saatlik REO dönemine alındı. İskemi ve REO dönemi sonrası toplanan örnekler protein S100B ve LDH ölçümü için kullanıldı. Sonuçlar 26-30 ölçümün ortalama \pm standart hatası olarak verilmiştir. *** $p < 0.001$ kontrole göre anlamlı derecede farklıdır.

4.2. İskemi ve REO'nun Neden Olduğu Protein S100B ve LDH Salıverilmesi: Glutamatın Etkisi

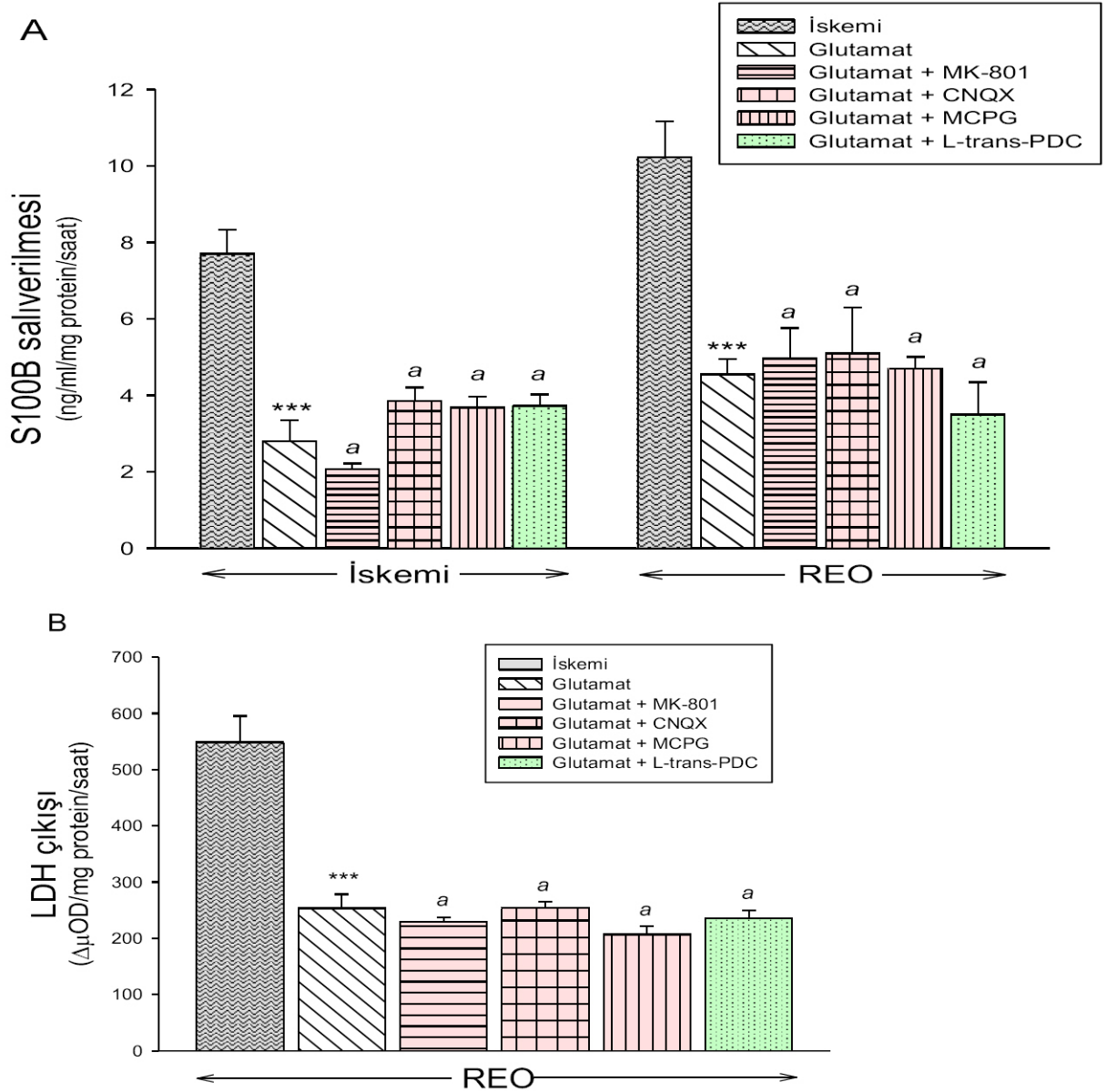
İnkübasyon ortamında yüksek konsantrasyonda glutamat varlığı (1 mM), iskemi ve bunu takip eden REO dönemlerinde gözlenen protein S100 salıverilmesini anlamlı bir şekilde azalttı (sırasıyla 6.7 ± 0.5 'e karşılık 4.3 ± 0.8 , $p < 0.05$ ve 10.8 ± 0.9 'a karşılık 5.9 ± 0.8 , $p < 0.001$; Şekil 12A). Benzer şekilde, REO'nun neden olduğu LDH çıkışının da glutamat tarafından kontrol düzeylerine düşürüldüğü (437 ± 29 $\Delta\mu\text{OD}/\text{mg}$ proteine karşılık 189 ± 22 $\Delta\mu\text{OD}/\text{mg}$ protein, $p < 0.05$) gözlemlendi (Şekil 12B).



Şekil 12. İskemi ve REO'nun neden olduğu protein S100B (Şekil 12A) ve LDH (Şekil 12B) salıverilmesi üzerine glutamatın etkisi. Preinkübasyon dönemi ardından kortikal dilimler 1 saat boyunca kontrol veya iskemik koşullarda ve sonrasında yine 1 saat boyunca oksijen-glukoz içeren ortamda inkübe edildi. Glutamat (1 mM) inkübasyon ortamına iskemi ve REO dönemlerinde eklendi. Sonuçlar 7-9 ölçümün ortalama \pm standart hatası olarak verilmiştir. $**p < 0.01$ ve $***p < 0.001$ iskemi ve/veya iskemi-REO grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

4.3. İskemi ve REO Ortamında Kortikal Dilimlerde Glutamatın Sağladığı S100B ve LDH Saliverilmesini Azaltıcı Etki Üzerine Glutamat Reseptör Antagonistlerinin ve Glutamat Uptake İnhibitörünün Etkileri

İskemi ve REO dönemlerinde gözlenen S100B ve LDH çıkışlarındaki artış üzerine glutamatın sağladığı bu koruyucu etki üzerine glutamat reseptör antagonistleri (MK-801, CNQX ve MCPG) ve glutamat uptake inhibitörünün (L-trans-PDC) etkisi gözlenmedi (Şekil 13A ve 13B).

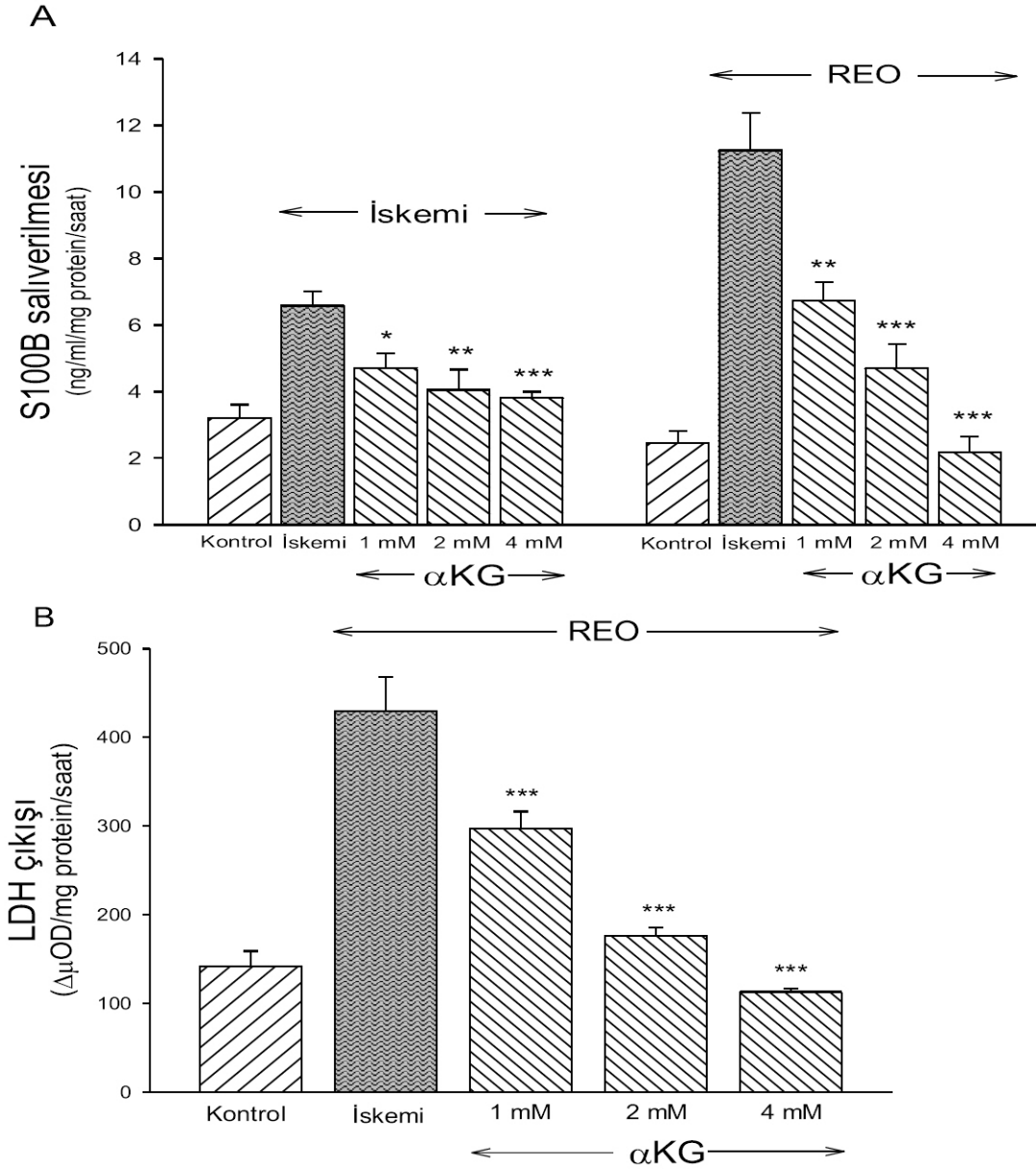


Şekil 13. Glutamatın iskemi ve REO'nun neden olduğu S100B (Şekil 13A) ve LDH (Şekil 13B) saliverilmesini azaltıcı etkisi üzerine glutamat reseptör antagonistleri ve glutamat uptake inhibitörünün etkileri. Sonuçlar 4 ölçümün ortalama ± standart hatası olarak verilmiştir. ***, $p < 0.001$ iskemi grubuna göre anlamlı farklıdır. a ; $p > 0.05$ glutamat grubuna göre anlamlı fark yoktur.

4.4. İskemi ve REO'nun Neden Olduğu Protein S100B ve LDH Saliverilmesi:

α -Ketoglutaratın Etkisi

α -KG, glutamat ile gözleendiği gibi, dilimlerden iskemi ve REO'nun neden olduğu S100B saliverilmesindeki artışı doza bağlı bir şekilde azalttı (Şekil 14A). Benzer şekilde α -KG, kortikal dilimlerden REO'nun neden olduğu LDH çıkışı belirgin şekilde azalttı (Şekil 14B).

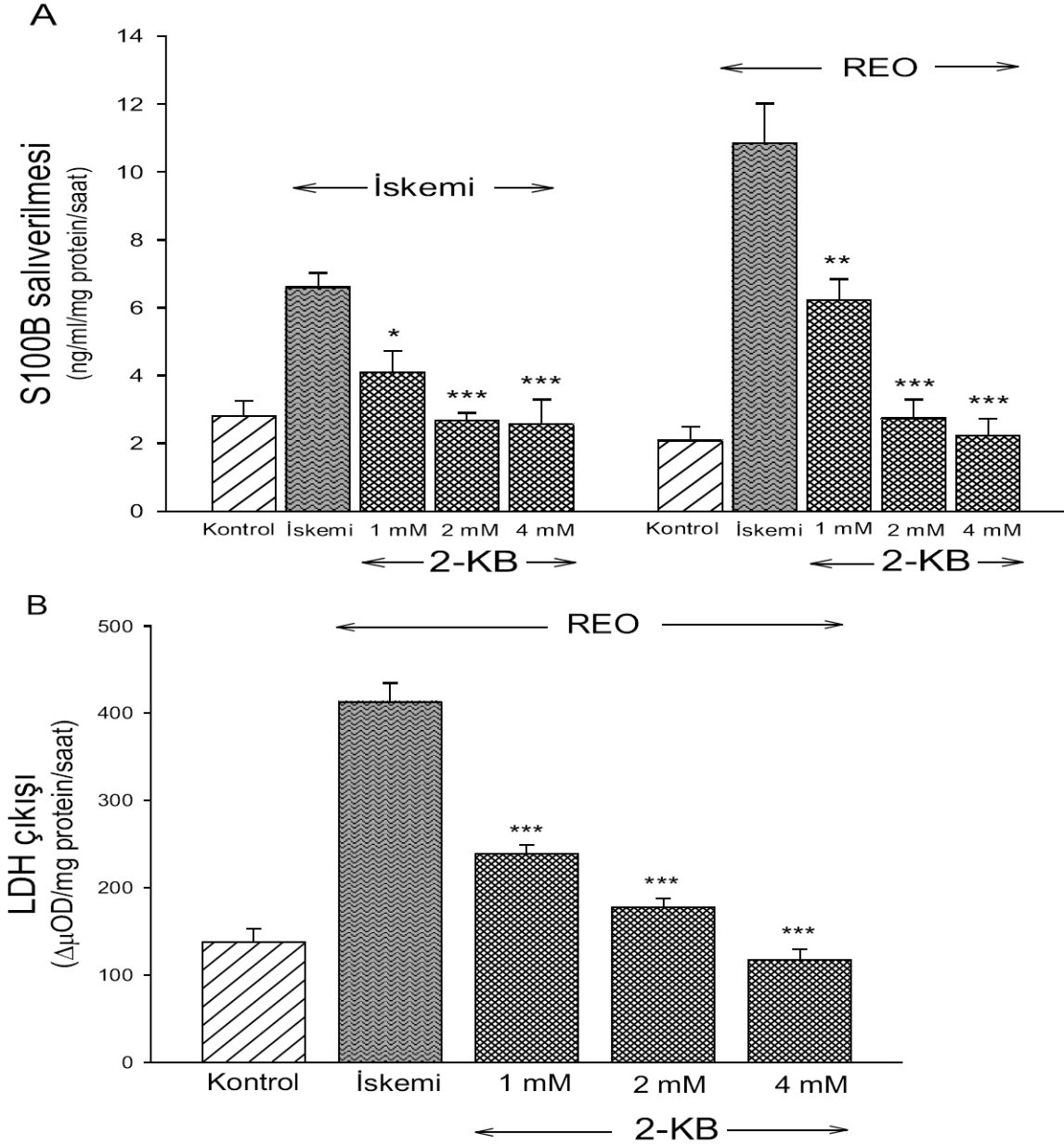


Şekil 14. İskemi ve REO dönemlerinde kortikal dilimlerden protein S100B (Şekil 14A) ve LDH (Şekil 14B) saliverilmesi üzerine α -ketoglutaratın etkisi. Preinkübasyon döneminde kortikal dilimler 1 saat boyunca kontrol veya iskemik koşullarda ve sonrasında yine 1 saat boyunca oksijen-glukoz içeren ortamda inkübe edildi. α -KG (1, 2 ve 4 mM) inkübasyon ortamına iskemi ve REO dönemlerinde eklendi. Sonuçlar 5-8 ölçümün ortalama \pm standart hatası olarak verilmiştir. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ ve ***; $p < 0.001$ iskemi ve/veya iskemi-REO grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

4.5. İskemi ve REO'nun Neden Olduğu Protein S100B ve LDH Salıverilmesi:

2-Ketobutiratın Etkisi

İnkübasyon ortamına 2-KB (1, 2 ve 4 mM) kortikal dilimlerden iskemi ve REO 'nun neden olduğu S100B salıverilmesini konsantrasyona bağlı bir şekilde azalttı (Şekil 15A). Benzer şekilde 2-KB, REO'nun neden olduğu LDH çıkışını da kontrol düzeylere kadar düşürdü (Şekil 15B).

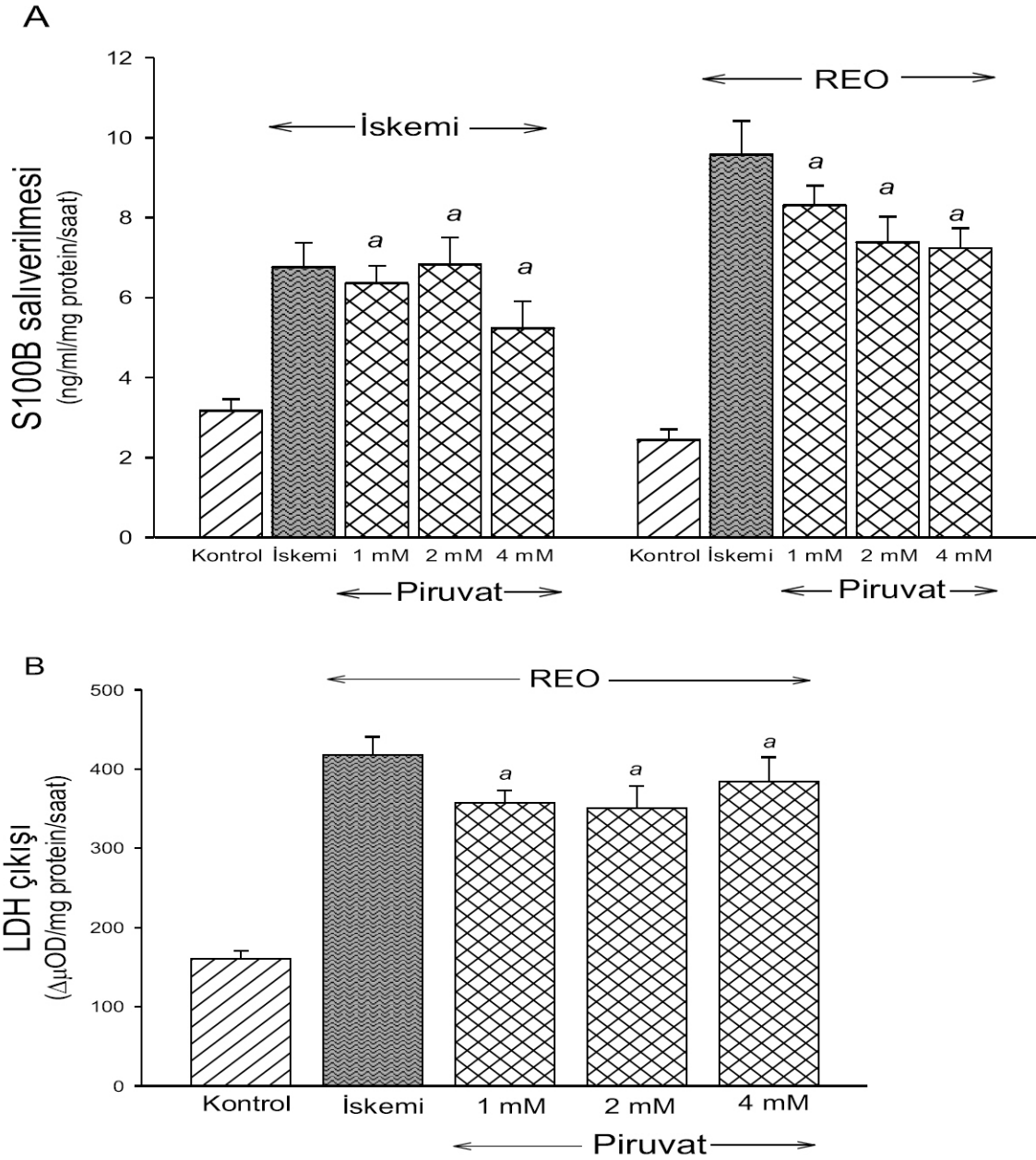


Şekil 15. İskemi ve REO dönemlerinde kortikal dilimlerden protein S100B (Şekil 15A) ve LDH (Şekil 15B) salıverilmesi üzerine 2-ketobutiratın etkisi. Preinkübasyon dönemi ardından kortikal dilimler 1 saat boyunca kontrol veya iskemik koşullarda ve sonrasında yine 1 saat boyunca oksijen-glukoz içeren ortamda inkübe edildi. 2-KB (1, 2 ve 4 mM) inkübasyon ortamına iskemi ve REO dönemlerinde eklendi. Sonuçlar 3-8 ölçümün ortalama \pm standart hatası olarak verilmiştir. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ ve ***, $p < 0.001$ iskemi ve/veya iskemi-REO grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

4.6. İskemi ve REO'nun Neden Olduğu Protein S100B ve LDH Salıverilmesi:

Piruvatın Etkisi

İnkübasyon ortamına sodyum piruvat (1, 2 ve 4 mM) eklenmesi ne iskemi ve REO'nun neden olduğu protein S100B salıverilmesini (Şekil 16A), ne de REO'nun neden olduğu LDH çıkışı (Şekil 16B) anlamlı bir şekilde etkilemedi.

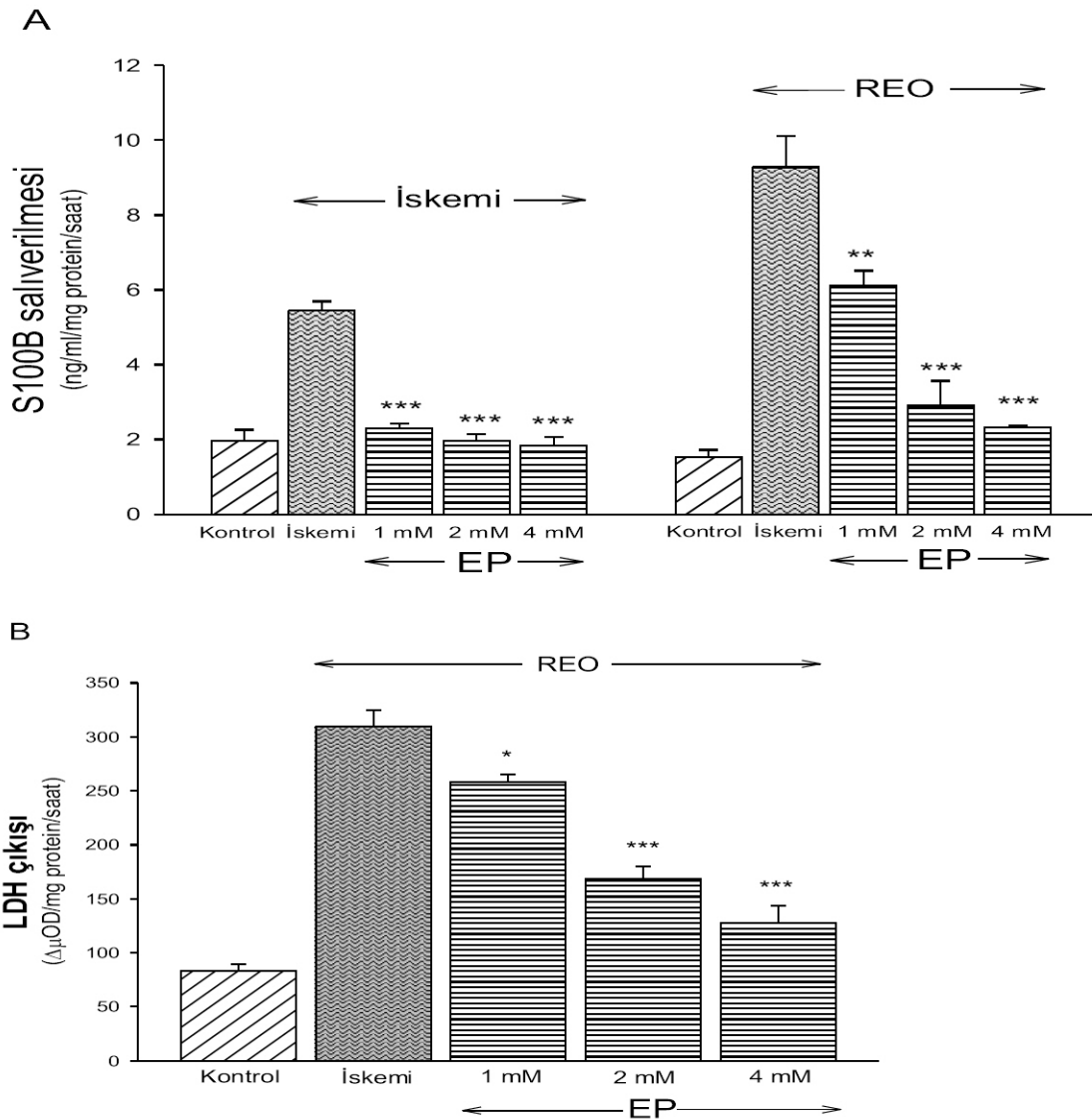


Şekil 16. İskemi ve REO dönemlerinde kortikal dilimlerden protein S100B (Şekil 16A) ve LDH (Şekil 16B) salıverilmesi üzerine piruvatın etkisi. Preinkübasyon dönemi ardından kortikal dilimler 1 saat boyunca kontrol veya iskemik koşullarda ve sonrasında yine 1 saat boyunca oksijen-glukoz içeren ortamda inkübe edildi. Piruvat (1, 2 ve 4 mM) inkübasyon ortamına iskemi ve REO dönemlerinde eklendi. Sonuçlar 4-12 ölçümün ortalama ± standart hatası olarak verilmiştir. *a*; $p > 0.05$ iskemi ve/veya iskemi-REO grubuna göre anlamlı farklılık yoktur.

4.7. İskemi ve REO'nun Neden Olduğu Protein S100B ve LDH Salıverilmesi:

Etil Piruvatın Etkisi

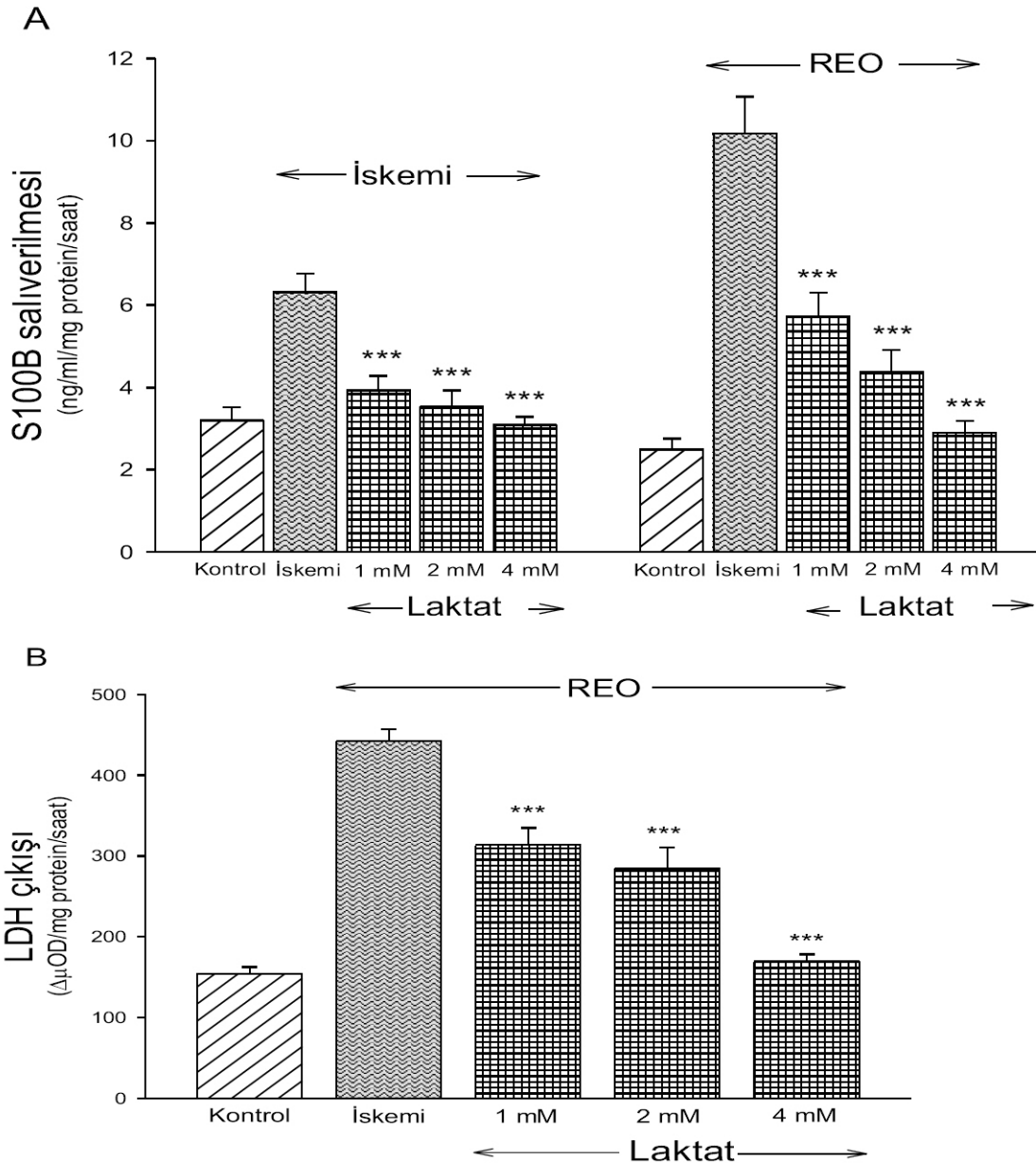
İnkübasyon ortamına eklenen sodyum piruvatın iskemi ve REO'nun neden olduğu protein S100B salıverilmesi ve REO'nun neden olduğu LDH çıkışı üzerine etkisiz olduğunun görülmesi üzerine, hücre içine monokarboksilat taşıyıcıları aracılığı ile girebilen piruvat yerine bu taşıyıcıları kullanmadan hücre içine girebilen etil piruvat (EP) ile deney tekrarlandı. İnkübasyon ortamına eklenen EP; iskemi ve REO'nun neden olduğu protein S100B salıverilmesini ve REO'nun neden olduğu LDH çıkışını doza bağlı bir şekilde azalttı (Şekil 17A, 17B).



Şekil 17. İskemi ve REO dönemlerinde kortikal dilimlerden protein S100B (Şekil 17A) ve LDH (Şekil 17B) salıverilmesi üzerine etil piruvatın etkisi. Preinkübasyon dönemi ardından kortikal dilimler 1 saat boyunca kontrol veya iskemik koşullarda ve sonrasında yine 1 saat boyunca oksijen-glukoz içeren ortamda inkübe edildi. EP (1, 2 ve 4 mM) inkübasyon ortamına iskemi ve REO dönemlerinde eklendi. Sonuçlar 5 ölçümün ortalama \pm standart hatası olarak verilmiştir. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ iskemi ve/veya iskemi-REO grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

4.8. İskemi ve REO'nun Neden Olduğu Protein S100B ve LDH Salıverilmesi: Laktatın Etkisi

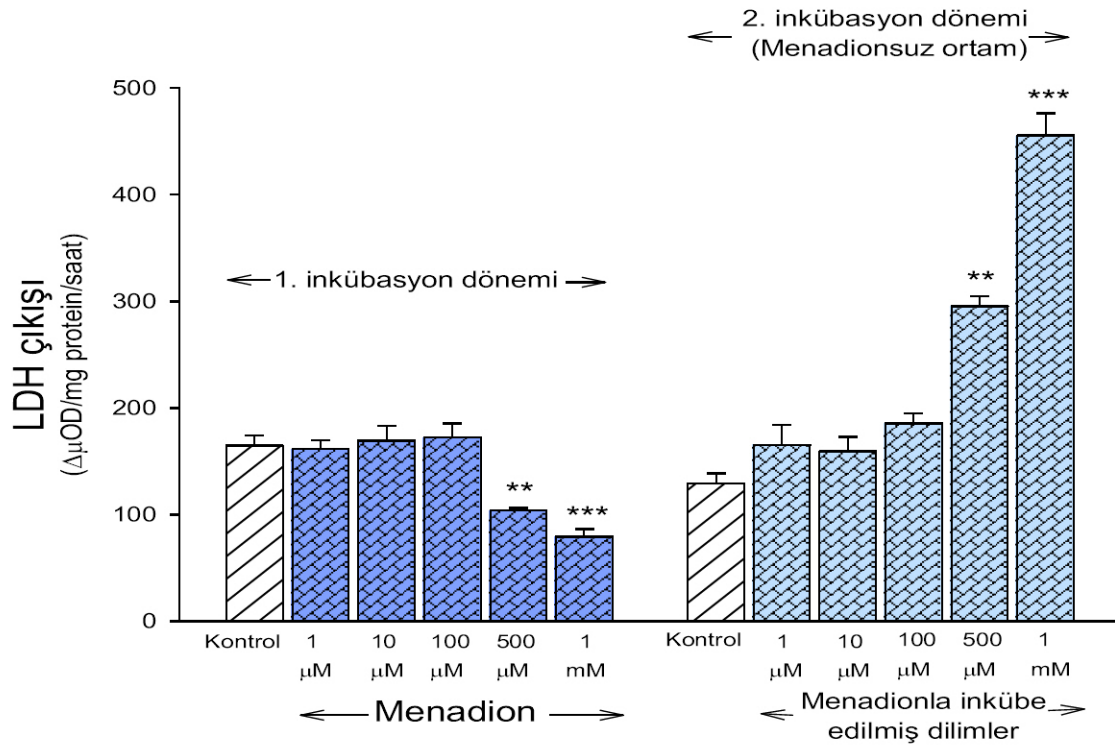
α -KG ve 2-KB ile gözlemlendiği gibi, inkübasyon ortamına laktatın eklenmesi iskemi ve REO'nun neden olduğu protein S100B salıverilmesindeki artışı doza bağlı bir şekilde azalttı (Şekil 18A). Diğer taraftan laktat, kortikal dilimleri REO'nun neden olduğu LDH çıkışına karşı da korudu (Şekil 18B).



Şekil 18. İskemi ve REO dönemlerinde kortikal dilimlerden protein S100B (Şekil 18A) ve LDH (Şekil 18B) salıverilmesi üzerine laktatın etkisi. Preinkübasyon dönemi ardından kortikal dilimler 1 saat boyunca kontrol veya iskemik koşullarda ve sonrasında yine 1 saat boyunca oksijen-glukoz içeren ortamda inkübe edildi. Laktat (1, 2 ve 4 mM) inkübasyon ortamına iskemi ve REO dönemlerinde eklendi. Sonuçlar 8-12 ölçümün ortalama \pm standart hatası olarak verilmiştir. ***, $p < 0.001$ iskemi ve/veya iskemi-REO grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

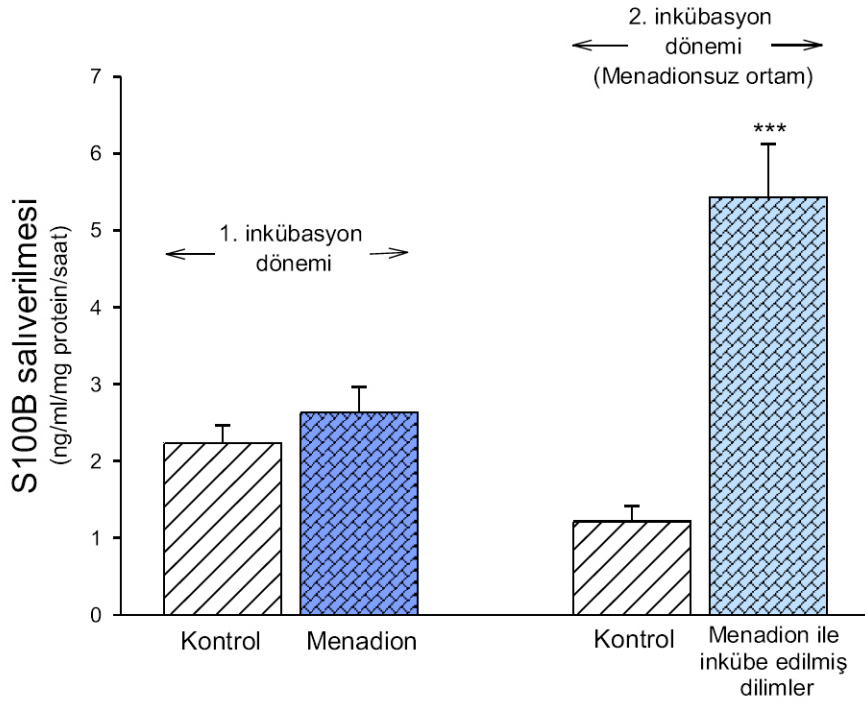
4.9. Serbest Oksijen Radikali Oluşturan Menadionun S100B ve LDH Saliverilmesi Üzerine Etkisi

Düşük konsantrasyonlardaki (1, 10, 100 μM) menadion normoksik koşullarda inkübe edilen kortikal dilimlerden LDH çıkışını etkilemezken, yüksek konsantrasyonlarda (500 μM ve 1 mM) menadion LDH çıkışında anlamlı bir azalmaya neden oldu. Diğer taraftan, yüksek konsantrasyonda menadionla inkübe edilen dilimlerin menadion içermeyen normoksik koşullarda inkübasyonu LDH çıkışında REO-benzeri bir artışa neden oldu (Şekil 19).



Şekil 19. Menadionun kortikal dilimlerden LDH çıkışı üzerine etkileri. 1. inkübasyon döneminde kortikal dilimler farklı konsantrasyonlarda menadion içeren normoksik ortamda 1 saat süreyle inkübe edildi. Ardından aynı dilimler menadion içermeyen normoksik koşullarda 1 saat daha inkübe edildi. ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ kontrola göre anlamlı farklıdır.

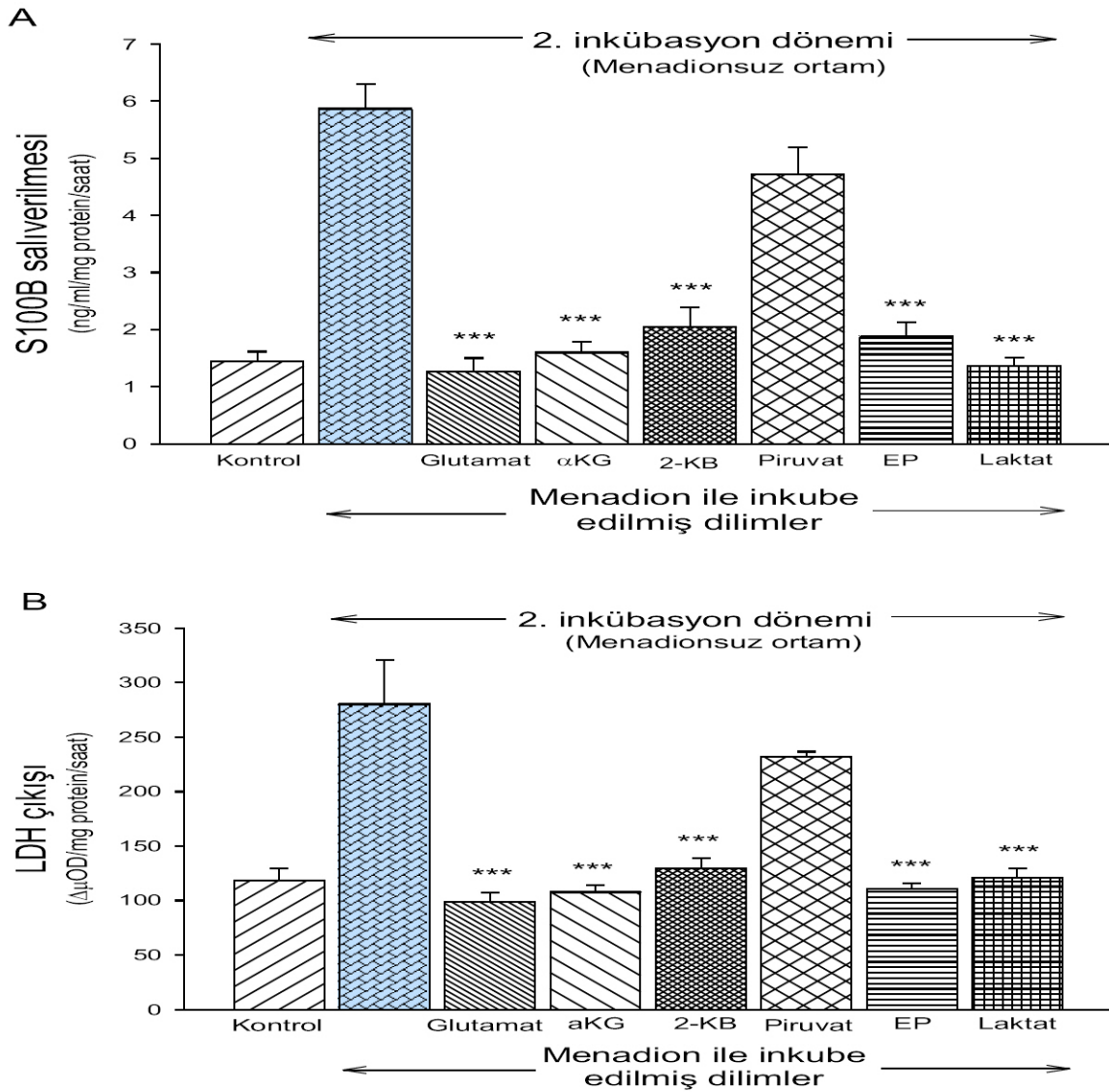
Bunun üzerine dilimlerden S100B saliverilmesi 1 mM menadionla test edildi. Normoksik koşullarda inkübe edilen kortikal dilimlere menadion eklenmesi protein S100B saliverilmesini anlamlı bir şekilde etkilemedi. Buna karşılık, menadion inkübasyonu sonrası dilimlerin menadion içermeyen normoksik koşullarda inkübasyonu S100B saliverilmesinde REO-benzeri bir artışa neden oldu (Şekil 20).



Şekil 20. Menadionun kortikal dilimlerden S100B saliverilmesi üzerine etkileri. 1. inkübasyon döneminde kortikal dilimler menadion içeren normoksik ortamda 1 saat süreyle inkübe edildi. Ardından aynı dilimler menadion içermeyen normoksik koşullarda 1 saat daha inkübe edildi. ***; $p < 0.001$ kontrole göre anlamlı farklıdır.

4.10. Kortikal Dilimlerden Menadionun Neden Olduğu S100B ve LDH Saliverilmesi Üzerine Glutamat, α -Ketoglutarat, 2-Ketobutirat, Piruvat ve Laktatın Etkileri

Bir saat süreyle menadionlu ortamda inkübe edildikten sonra menadionsuz ortamda 1 saat daha inkübasyona bırakılan kortikal dilimlerden saliverilen S100B ve LDH miktarları glutamat (1 mM), α -KG (2 mM), 2-KB (2 mM), etil piruvat (2 mM) ve laktat (2 mM) ile kontrol düzeylere kadar azaltılırken, sodyum piruvatın (2 mM) herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 21A ve 21B).



Şekil 21. Kortikal dilimlerde menadionun neden olduğu S100B (Şekil 20A) ve LDH (Şekil 20B) saliverilmesi üzerine glutamat, α -ketoglutarat, 2-ketobutirat, piruvat ve laktatın etkileri. Kortikal dilimler 1. inkübasyon döneminde normoksik koşullarda ortama 1 mM menadion eklenerek 1 saat süreyle inkübe edilmiş, aynı dilimler 2. inkübasyon döneminde normoksik koşullarda ortama menadion eklenmeden inkübe edilmiştir. Glutamat, α -KG, 2-KB, sodyum piruvat, EP ve laktat ise her iki inkübasyon döneminde de ortama eklenmiştir. ***; $p < 0.001$ menadion grubuna göre anlamlı farklıdır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Birçok in vivo ve in vitro çalışma ile iskemi ve reperfüzyon hasarlarında protein S100B'nin saliverilmesinin arttığı ve bu artışta rolü olan çeşitli faktörler gösterilmiş olmasına rağmen saliverilme mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (1).

İskemide glutamat-kalsiyum eksitotoksosite hipotezine (18,19) göre hücre membranında ATP enerjisi gerektiren Na^+ , K^+ -ATPaz aktivitesi inhibe olur ve hücre içinde Na^+ ve Ca^{++} miktarındaki aşırı artış glutamat saliverilmesini tetikleyen membran depolarizasyonuna (anoksik depolarizasyon) yol açar. Ekstrasellüler alanda artmış glutamat düzeyleri, glutamat reseptörlerini aktive eder ve sonrasında muhtemelen iskemi ve/veya takibeden reperfüzyon hasarıyla ilişkili olan hücresel süreçleri başlatır. Glutamat-reseptör aracılıklı eksitotoksositeye ek olarak glutamatın yüksek konsantrasyonlarının neden olduğu oksidatif stres de glutamat nörotoksitesine katkıda bulunur (203-205). Hem in vitro ve hem de in vivo iskemik koşullarda glutamat saliverilmesinde önemli bir artış olduğu gösterilmiştir (206-209). Bununla birlikte, gerek in vitro koşullarda (210-212) ve gerekse klinik çalışmalarda (213,214) glutamat reseptör antagonistlerinin etkisizliği veya sınırlı etkileri gibi glutamat eksitotoksitesine hipotezine karşı çelişkili sonuçlar da bildirilmiştir.

Anabilim dalımızda daha önce yapılan ve beyin dilimlerinin kullanıldığı I/R modelinde, OGD ve REO'un S100B ve LDH saliverilmesinde önemli artışa neden olduğunu gözlenmişti (3). Bu çalışmada S100B artışı ile glutamat arasındaki ilişkiler de araştırılmış; iskeminin dilimlerden glutamat saliverilmesini artırdığı ve bu artışın iskemi ve REO'un neden olduğu S100B ve LDH saliverilmesini tetikleme olasılığı, inkubasyon ortamına glutamat reseptör antagonistleri ekleyerek veya normoksik ve/veya iskemik ortama eksojen glutamat eklenerek test edilmişti. Glutamat reseptör antagonistlerinin (sırasıyla NMDA, kainat/AMPA ve metabotrop glutamat reseptörlerini bloke eden MK-801, CNQX ve MCPG) dilimlerden S100B ve LDH saliverilmesi üzerine etkisi olmadığı, aksine ortama eksojen glutamat (2 mM) eklenmesinin iskemi ve/veya REO'nun neden olduğu S100B ve LDH saliverilmesindeki artışı önlediği bulunmuştu (3).

Tramontina ve arkadaşları (8) hipokampal astrosit kültürlerinde glutamatın S100B saliverilmesini azaltıcı etkisinin mekanizmalarını araştırdıkları bir çalışmada, serum çıkarılmış ortamın (serum deprivasyonu) neden olduğu S100B saliverilmesindeki artışı düşük konsantrasyonda (0.025 ve 0.1 mM) glutamatın etkilemediğini, yüksek

konsantrasyonda (1 mM) glutamatın ise S100B salıverilmesini azalttığını gösterdiler. Gonçalves ve arkadaşlarının (7) hipokampal astrosit kültürlerinde yaptıkları bir başka çalışmada da, serum çıkarılmış ortamın neden olduğu S100B artışının 1 mM glutamat ile belirgin derecede azaldığı rapor edilmiştir. Yine anabilim dalımızda yaptığımız, sıçan kortikal dilimlerinden S100B salıverilmesi üzerine I/R hasarında rolü olan bazı yolların etkilerinin incelendiği bir çalışmada (6), inkubasyon ortamlarına yüksek konsantrasyonlarda glutamat (2 mM) ve α -ketoglutarat (1 mM) eklenmesinin hem OGD ve hem de REO'nun neden olduğu S100B salıverilmesini ve REO'nun neden olduğu LDH çıkışını önlediği bulunmuştur.

Glutamat, tersinir transaminasyon reaksiyonları ile α -KG'a dönüştüğü için, gerçekte glutamat metabolizması Krebs döngüsü aracılığıyla enerji üreten de bir yoldur. α -KG, bu döngüde ara ürün olarak yer alan bir enerji substrat metabolitidir (9,10) ve ayrıca H₂O₂ temizleyici (11,12,167-169) etki gösteren bir α -keto asittir. Yüksek konsantrasyonda glutamatın iskemi ve REO nedeniyle S100B salıverilmesini bu metabolik ürün aracılığıyla azaltması bir olasılıktır. Bu sonucu desteklemek için bu çalışmamızda inkubasyon ortamına yüksek konsantrasyonlarda α -KG ekleyerek beyin dilimlerinden S100B ve LDH salıverilmesini incelediğimizde hem 1 mM glutamat ve hem de değişik konsantrasyonlarda (1, 2 ve 4 mM) α -KG'in OGD ve REO nedeniyle S100B salıverilmesindeki artışa ve REO nedeniyle LDH çıkışındaki artışa karşı dilimleri koruduğunu gözledik. Daha önceki çalışmamızda (6) gözlediğimiz gibi glutamatın sağladığı bu koruyucu etki üzerine ne glutamat reseptör antagonistlerinin (MK-801, CNQX ve MCPG) ve ne de glutamat uptake inhibitörünün (L-trans-PDC) etkisi gözlenmedi (Şekil 13).

Bu çalışmada α -KG'in beyin dilimlerinden S100B ve LDH salıverilmesini azaltıcı etkisinin, onun enerji substratı ve/veya H₂O₂ temizleyici etkisine bağlı olup olmadığı olasılığı, ona benzer özelliklere sahip α -keto asitler olan 2-KB, piruvat ve laktat kullanılarak test edildi. Şekil 4'de görüldüğü gibi, sadece enerji substratı özelliğine sahip olduğu bilinen 2-KB (192-194) doz bağımlı olarak OGD ve REO'nun neden olduğu S100B ve LDH salıverilmesini azalttı. Benzer şekilde, hem bir enerji substrat metaboliti olan ve hem de serbest radikal temizleyici antioksidan etkileri olduğu bilinen laktatın da (12,190,191) aynı koşullarda S100B ve LDH çıkışlarını azalttığı gözlendi (Şekil 5). α -KG, 2-KB ve laktatın tersine hem bir enerji substratı (170-172) ve hem de H₂O₂ temizleyici (12,173) özelliği bilinen piruvat dilimlerden hem OGD ve hem de REO nedeniyle S100B ve LDH salıverilmesindeki artışları önlemede yetersiz kaldı. Deneyde kullandığımız sodyum

piruvatın, solüsyon içinde stabil olmayıp kendiliğinden bir aldol benzeri kondensasyon reaksiyonuyla parapiruvata dönüşebilmesi (214,215) veya kendiliğinden hidrate olarak piruvat hidrata dönüşebilmesi (216) bu çalışmada etkisiz kalmasından sorumlu olabilir. Daha sonra piruvatın stabil ve lipofilik türevi olan etil piruvat (EP) ile çalışma tekrarlandığında, EP'in da dilimlerden S100B ve LDH salıverilmesi üzerine diğer α -keto asitler gibi benzer etkisi olduğu gözlemlendi. EP'in hücre içine monokarboksilat taşıyıcılarının yardımı olmaksızın kolayca girdiği ve intrasellüler esteraz aracılığıyla piruvata dönüştüğü bilinmektedir (217).

Yukarıda tartışıldığı gibi, EP ve laktatla elde edilen sonuçlar glutamat ve α -KG'in dilimlerden S100B ve LDH salıverilmesini azaltıcı etkilerinde, enerji substratı olma özellikleri yanında, H_2O_2 temizleyici etkilerinin de katkısının olması muhtemeldir. Yaptığımız bu çalışmada söz konusu olasılık, hücre içine giren ve bir elektron transfer reaksiyonu aracılığıyla serbest radikaller oluşturan menadion (197,198) kullanılarak test edildi. Şekil 8'de gösterildiği gibi, kortikal dilimlerin artan konsantrasyonlarda menadionla inkübasyonu S100B ve LDH salıverilmesinde bir artışa neden olmadı. Sürpriz şekilde, menadionun yüksek konsantrasyonları kortikal dilimlerden LDH çıkışını, S100B salıverilmesinde bir değişiklik olmaksızın önemli derecede azalttı (Şekil 8A). İnkübasyon ortamı içine salıverilen LDH'nin ortamda menadion gibi bazı kimyasallar bulunduğunda degradasyona duyarlı olduğu daha önceden gösterilmiştir (199). Bu nedenle, reaksiyon karışımında 0.5 and 1 mM konsantrasyonlarda menadion varlığının piruvatın substrat olduğu ticari bir spektrofotometrik kit ile ölçülen LDH aktivitesinin saptanmasını bozması olasıdır. Gerçekten de, reaksiyon karışımına eklendiğinde menadionun kontrol örneklerinden hesaplanan absorbans değişikliklerini önemli derecede azalttığını saptadık (sonuçlar kısmında bu bulgulara yer verilmemiştir).

Menadionun metabolizması sırasında 1 elektron indirgeyici enzimler önce stabil olmayan bir semikinon radikali oluşturur ve daha sonra onu stabil hidrokinona indirgerler, moleküler oksijen varlığında ise semikinon ve hidrokinon metabolitlerinin yeniden oksidasyonu SOR oluşmasına neden olur (197,198). Bu nedenle menadionla inkübe edilen dilimlerin daha sonra menadionsuz normoksik ortama nakledilmesi SOR üretimine yol açabilir. Gerçekten de Desagher ve arkadaşları (12), menadionun H_2O_2 oluşturduğunu, hatta bu bileşik inkübasyon ortamından çıkarıldığında dahi H_2O_2 oluşumunun devam ettiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda Şekil 19 ve 20'de gösterildiği gibi daha önce menadionlu ortamda inkübe edilmiş sıçan kortikal dilimlerinin normoksik koşullarda

yeniden inkubasyonu iskemi ve/veya REO'nun etkisine benzer şekilde S100B ve LDH saliverilmesinde belirgin artışa neden oldu. Bu bulgularımız yukarıda bahsedilen çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur ve menadion inkübasyonu sonrası ortama eklenen oksijenin daha fazla SOR oluşumuna neden olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Glutamat, OGD ve REO koşullarında olduğu gibi menadion preinkübasyonun neden olduğu S100B ve LDH saliverilmesini de anlamlı derecede azalttı (Şekil 21). Benzer şekilde, α -KG, 2-KB, laktat ve EP'in da menadion preinkübasyonunun neden olduğu S100B ve LDH saliverilmesindeki artışları önlediği gözlemlendi. Menadion kullanılarak elde edilen bu bulgular, glutamat ve diğer α -keto asitlerin OGD ve/veya REO koşullarında ortaya çıkan SOR'ni bağlama yeteneklerinin olabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Gerçekten de, α -keto asitlerin koruyucu etkilerinin nöronal enerji metabolizmasındaki düzelmeden çok, onların H₂O₂ temizleyici yeteneklerinin bir sonucu olabileceği yönünde gözlemler rapor edilmiştir (172,173).

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen bulgular inkübasyon ortamına mM konsantrasyonda eklenen glutamatın beyin dilimlerini OGD ve/veya REO'nun neden olduğu S100B ve LDH saliverilmesindeki artışa karşı koruduğunu açık bir şekilde göstermektedir. Glutamatın bir metabolik ürünü olan α -KG'ın diğer α -keto asitler gibi hem enerji substratı ve hem de antioksidan özelliğe sahip olması ve özellikle OGD ve REO koşullarında gözlenen etkilerinin menadion koşullarında da gözlenmesi, glutamatın S100B ve LDH saliverilmesi üzerine olan koruyucu etkisinde enerji substratı olması yanında antioksidan özelliğinin de önemli olduğunu düşündürmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. DONATO R, SORCI G, RIUZZI F, ARCURI C, BIANCHI R, BROZZI F, TUBARO C, GIAMBANCO I. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793: 1008-1022, 2009.
2. GERLACH R, DEMEL G, KONIG HG, GROSS U, PREHN JH, RAABE A, SEIFERT V, KOGEL D. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience*, 141: 1697-1701, 2006.
3. BÜYÜKUYSAL RL. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochemistry International*, 47: 580-588, 2005.
4. EDWARDS MM, ROBINSON SR. TNF- α affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 113: 1709-1715, 2006.
5. NARDIN P, TORTORELLI L, QUINCOZES-SANTOS A, DE ALMEIDA LMV, LEITE MC, THOMAZI AP, GOTTFRIED C, WOFCHUK ST, DONATO R, GONÇALVES CA. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca²⁺ and K⁺. *Neurochemical Research*, 34: 1603-1611, 2009.
6. GÜRSOY M, BÜYÜKUYSAL RL. Mechanism of S100b release from rat cortical slices determined under basal and stimulated conditions. *Neurochemical Research*, 35: 429-436, 2010.
7. GONÇALVES D, KARL L, LEITE M, ROTTA L, SALBEGO C, ROCHA E, WOFCHUK S, GONÇALVES A. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport*, 13: 1533-1535, 2002.
8. TRAMONTINA F, LEITE MA, GONÇALVES D, TRAMONTINA AC, SOUZA DF, FRIZZO JK, NARDIN P, GOTTFRIED C, WOFCHUK ST, GONÇALVES CA. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochemical Research*, 31: 815-820, 2006.
9. WEINBERG JM, VENKATACHALAM MA, ROESER NF, NISSIM I. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 2826-2831, 2000.
10. YOSHIOKA K, NISIMARU N, YANAI S, SHIMODA H, YAMADA K. Characteristics of monocarboxylates as energy substrates other than glucose in rat brain slices and the effect of selective glial poisoning- a ³¹P NMR study. *Neuroscience Research*, 36: 215-226, 2000.
11. PUNTEL RL, NOGUERIA CW, ROCHA BT. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro. *Neurochemical Research*, 30: 225-235, 2005.

12. DESAGHER S, GLOWINSKI J, PREMONT J. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *Journal of Neuroscience*, 17: 9060-9067, 1997.
13. WOOLF N. Ischemia and infarction. Editors: MCGEE JO'D, ISAACSON PG, WRIGHT NA. *Oxford Textbook of Pathology*, Oxford University Press, Oxford, page 524-530, 1992.
14. GRACE PA. Ischemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*, 81: 637-647, 1994.
15. MITCHELL RN, COTRAN RS. Cellular pathology I: Cell injury and cell death. Editors: KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N, ASTER JC. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed, Saunders Elsevier Inc, Philadelphia, page 3-31, 2003.
16. ŞENER G, YEĞEN BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*, 22: 5-13, 2009.
17. DE GROOT H, RAUEN U. Ischemia-reperfusion injury: Processes in pathogenetic networks: a review. *Transplantation Proceedings*, 39: 481-484. 2007.
18. KRISTIAN T, SIESJO BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, 29: 705-718, 1998.
19. SATTLER R, TYMIANSKI M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *Journal of Molecular Medicine*, 78: 3-13, 2000.
20. MOENS AL, CLAEYS MJ, TIMMERMANS JP, VRINTS CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *International Journal of Cardiology*, 100: 179-190, 2005.
21. NEUMAR RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Annals of Emergency Medicine*, 36: 483-506, 2000.
22. RODRIGO J, FERNANDEZ AP, SERRANO J, PEINADO MA, MARTINEZ A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*, 39: 26-50, 2005.
23. FRANGOIANNIS NG. Chemokines in ischemia and reperfusion injury. *Thrombosis and Haemostasis*, 97: 738-747, 2007.
24. ELTZSCHIG HK, COLLARD CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin*, 70: 71-86, 2004.
25. VINTEN-JOHANSEN J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 61: 481-497, 2004.
26. SEEKAMP A, WARREN JS, REMICK DG, TILL GO, WARD PA. Requirements of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury associated with lung injury. *American Journal of Pathology*, 143: 453-463, 1993.
27. SCHULZ R, KELM M, HEUSCH G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 61: 402-413, 2004.

28. D'AMBROSIO AL, PINSKY DJ, CONNOLLY S. The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: Implications for neuroprotection. *Molecular Medicine*, 7: 367-382, 2001.
29. LIPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, 79: 1431-1568, 1999.
30. MOORE BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 19: 739-744, 1965.
31. HYDEN H, LANGE PW. S100 brain protein: correlation with behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67: 1959-1966, 1970.
32. ROTHERMUNDT M, PETERS M, PREHN JH, AROLT V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microscopy Research and Technique*, 60: 614-632, 2003.
33. ISOBE T, TSUGITA A, OKUYAMA T. The amino acid sequence and the subunit structure of bovine brain S-100 protein (PAP I-b). *Journal of Neurochemistry*, 30: 921-923, 1978.
34. ZIMMER DB, CORNWALL EH, LANDAR A, SONG W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Research Bulletin*, 37: 417-429, 1995.
35. DONATO R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1450: 191-231, 1999.
36. SANTAMARIA-KISIEL L, RINTALA-DEMPSEY AC, SHAW GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochemical Journal*, 396: 201-214, 2006.
37. SCHAFFER BW, WICKI R, ENGELKAMP D, MATTEI MG, HEIZMANN CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics*, 25: 638-643, 1995.
38. MARENHOLZ I, LOVERING RC, HEIZMANN CW. An update of the S100 nomenclature. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763: 1282-1283, 2006.
39. BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L. *Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York, page 395-424, 2002.
40. SCHAFFER BW, HEIZMANN CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 21: 134-140, 1996.
41. DONATO R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy Research and Technique*, 60: 540-551, 2003.
42. DONALDSON C, BARBER KR, KAY CM, SHAW GS. Human S100b protein: formation of a tetramer from synthetic calcium-binding site peptides. *Protein Science*, 4: 765-772, 1995.

43. TSOPORIS JN, MARKS A, KAHN HJ, BUTANY JW, LIU PP, HANLON D, PARKER TG. Inhibition of norepinephrine-induced cardiac hypertrophy in S100 β transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 102: 1609-1616, 1998.
44. DONATO R. S-100 proteins. *Cell Calcium*, 7: 123-145, 1986.
45. NISHIKAWA T, LEE IS, SHIRAISHI N, ISHIKAWA T, OHTA Y, NISHIKIMI M. Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 23037-23041, 1997.
46. ALLORE R, O'HANLON D, PRICE R, NEILSON K, WILLARD HF, COX DR, MARKS A, DUNN RJ. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science*, 239: 1311-1313, 1988.
47. VAN ELDIK LJ, ZIMMER DB. Secretion of S100 from rat C6 glioma cells. *Brain Research*, 436: 367-370, 1987.
48. GERLAI R, WOJTOWICZ JM, MARKS A, RODER J. Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learning Memory*, 2: 26-39, 1995.
49. HACHEM S, AGUIRRE A, VIVES V, MARKS A, GALLO V, LEGRAVEREND C. Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia*, 51: 81-97, 2005.
50. STEINER J, BERNSTEIN HG, BIELAU H, BERNDT A, BRISCH R, MAWRIN C, KEILHOFF G, BOGERTS B. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neuroscience*, 8: 1-10, 2007.
51. VIVES V, ALONSO G, SOLAL AC, JOUBERT D, LEGRAVEREND C. Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology*, 457: 404-419, 2003.
52. ADAMI C, SORCI G, BLASI E, AGNELETTI AL, BISTONI F, DONATO R. S100B expression in and effects on microglia. *Glia*, 33: 131-142, 2001.
53. YANG Q, HAMBERGER A, KHATIBI N, STIGBRAND T, HAGLID KG. Presence of S100 β in cholinergic neurones of the rat hindbrain. *Neuroreport*, 7: 3093-3099, 1996.
54. GONZALEZ-MARTINEZ T, PEREZ-PINERA P, DIAZ-ESNAL B, VEGA JA. S-100 proteins in the human peripheral nervous system. *Microscopy Research and Technique*, 60: 633-638, 2003.
55. HAIMOTO H, HOSODA S, KATO K. Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Laboratory Investigation*, 57: 489-498, 1987.
56. SUZUKI F, KATO K, NAKAJIMA T. Regulation of nervous system specific S100 protein and enolase levels in adipose tissue by catecholamines. *Journal of Neurochemistry*, 42: 130-134, 1984.

57. ISHIKAWA H, NOGAMI H, SHIRASAWA N. Novel clonal strains from adult rat pituitary producing S100 protein. *Nature*, 303: 711-713, 1983.
58. BONI R, BURG G, DOGUOGLU A, ILG EC, SCHAFFER BW, MULLER B, HEIZMANN CW. Immunohistochemical localization of the Ca²⁺ binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. *British Journal of Dermatology*, 137: 39-43, 1997.
59. TAKAHASHI K, ISOBE T, OHTSUKI Y, SONOBE H, TAKEDA I, AKAGI T. Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system. *American Journal of Pathology*, 116: 497-503, 1984.
60. SORCI G, BIANCHI R, GIAMBANCO I, RAMBOTTI MG, DONATO R. Replicating myoblasts and fused myotubes express the calcium-regulated proteins S100A1 and S100B. *Cell Calcium*, 25: 93-106, 1999.
61. ARCURI C, GIAMBANCO I, BIANCHI R, DONATO R. Annexin V, annexin VI, S100A1 and S100B in developing and adult avian skeletal muscles. *Neuroscience*, 109: 371-388, 2002.
62. RAMBOTTI MG, SACCARDI C, SPRECA A, AISA MC, GIAMBANCO I, DONATO R. Immunocytochemical localization of S-100 beta beta protein in olfactory and supporting cells of lamb olfactory epithelium. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 37: 1825-1833, 1989.
63. DONATO R. S100B: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33: 637-668, 2001.
64. UCHIDA T, ENDO T. Immunoelectron microscopic demonstration of S-100b protein-like in centriole, cilia, and basal body. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 36: 693-696, 1988.
65. BAUDIER J, DELPHIN C, GRUNWALD D, KHOCHBIN S, LAWRENCE JJ. Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100B-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 11627-11631, 1992.
66. BAUDIER J, COLE RD. Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 5876-5883, 1988.
67. BIANCHI R, GIAMBANCO I, DONATO R. S100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca²⁺-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 12669-12674, 1993.
68. ZIEGLER DR, INNOCENTE CE, LEAL RB, RODNIGHT R, GONÇALVES CA. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 23: 1259-1263, 1998.

69. DONATO R. Quantitative analysis of the interaction between S-100 proteins and brain tubulin. *Cell Calcium*, 8: 283-297, 1987.
70. SKRIPNIKOVA EV, GUSEV NB. Interaction of smooth muscle caldesmon with S-100 protein. *FEBS Letters*, 257: 380-382, 1989.
71. GENTIL BJ, DELPHIN C, MBELE GO, DELOULME JC, FERRO M, GARIN J, BAUDIER J. The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein: potential implications for Ca²⁺ homeostasis regulation by S100B. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 23253-23261, 2001.
72. SHEU FS, HUANG FL, HUANG KP. Differential responses of protein kinase C substrates (MARCKS, neuromodulin and neurogranin) phosphorylation to calmodulin and S100. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316: 335-342, 1995.
73. SORCI G, AGNELETTI AL, BIANCHI R, DONATO R. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1448: 277-289, 1998.
74. LIN LH, VAN ELDIK LJ, OSHEROFF N, NORDEN JJ. Inhibition of protein kinase C- and casein kinase II-mediated phosphorylation of GAP-43 by S100 beta. *Brain Research and Molecular Brain Research*, 25: 297-304, 1994.
75. IVANENKOV VV, JAMIESON GA JR, GRUENSTEIN E, DIMLICH RV. Characterization of S-100b binding epitopes: identification of a novel target, the actin capping protein, CapZ. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 14651-14658, 1995.
76. GARBUGLIA M, VERZINI M, DONATO R. Annexin VI binds to S100A1 and S100B and blocks the ability of S100A1 and S100B to inhibit desmin and GFAP assemblies into intermediate filaments. *Cell Calcium*, 24: 177-191, 1998.
77. CAMBY I, NAGY N, LOPES MB, SCHAFER BW, MAURAGE CA, RUCHOUX MM, MURMANN P, POCHET R, HEIZMANN CW, BROTTCHI J, SALMON I, KISS R, DECAESTECKER C. Supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas are characterized by a differential expression of S100 proteins. *Brain Pathology*, 9: 1-19, 1999.
78. BOTTONI U, IZZO P, RICETTA A, MANNOORANPARAMPIL TJ, DEVIRGILIIS V, DEL GIUDICE M, REALE MG, FRATI L, CALVIERI S. S100 serum level: a tumour marker for metastatic melanoma. *Melanoma Research*, 13: 427-429, 2003.
79. AKHISAROGLU M, MANEV R, AKHISAROGLU E, UZ T, MANEV H. Both aging and chronic fluoxetine increase S100B content in the mouse hippocampus. *Neuroreport*, 14: 1471-1473, 2003.
80. CHAVES ML, CAMOZZATO AL, FERREIRA ED, PIAZENSKI I, KOCHHANN R, DALL'IGNA O, MAZZINI GS, SOUZA DO, PORTELA LV. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *Journal of Neuroinflammation*, 7: 6, 2010.

81. LU C, LI J, SUN W, FENG L, LI L, LIU A, LI J, MAO W, WEI H, GAO L, ZHANG X, HUANG Z, MENG X, WANG Y. Elevated plasma S100B concentration is associated with mesial temporal lobe epilepsy in Han Chinese: A case-control study. *Neuroscience Letters*, 484: 139-142, 2010.
82. SCHROETER ML, STEINER J. Elevated serum levels of the glial marker protein S100B are not specific for schizophrenia or mood disorders. *Molecular Psychiatry*, 14: 235-237, 2009.
83. SEN J, BELLI A, PETZOLD A, RUSSO S, KEIR G, THOMPSON EJ, SMITH M, KITCHEN N. Extracellular fluid S100B in the injured brain: A future surrogate marker of acute brain injury? *Acta Neurochirurgica (Wien)*, 147: 897-900, 2005.
84. HERGENROEDER GW, REDELL JB, MOORE AN, DASH PK. Biomarkers in the clinical diagnosis and management of traumatic brain injury. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 12: 345-358, 2008.
85. FOERCH C, OTTO B, SINGER OC, NEUMANN-HAEFELIN T, YAN B, BERKEFELD J, STEINMETZ H, SITZER M. Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 35: 2160-2164, 2004.
86. JAUCH EC, LINDSELL C, BRODERICK J, FAGAN SC, TILLEY BC, LEVINE SR. NINDS rt-PA Stroke Study Group. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke*, 37: 2508-2513, 2006.
87. TSOPORIS JN, MARKS A, KAHN HJ, BUTANY JW, LIU PP, O'HANLON D, PARKER TG. S100beta inhibits alpha1-adrenergic induction of the hypertrophic phenotype in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 31915-31921, 1997.
88. SHENG JG, ITO K, SKINNER RD, MRAK RE, ROVNAGHI CR, VAN ELDIK LJ, GRIFFIN WS. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiology of Aging*, 17: 761-766, 1996.
89. PENA LA, BRECHER CW, MARSHAK DR. Beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Brain Research and Molecular Brain Research*, 34: 118-126, 1995.
90. MANEV H, UZ T, MANEV R. Glia as a putative target for antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders*, 75: 59-64, 2003.
91. DJALALI S, HOLTJE M, GROSSE G, ROTHE T, STROH T, GROSSE J, DENG DR, HELLWEG R, GRANTYN R, HORTNAGL H, AHNERT-HILGER G. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *Journal of Neurochemistry*, 92: 616-627, 2005.
92. SHASHOUA VE, HESSE GW, MOORE BW. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *Journal of Neurochemistry*, 42: 1536-1541, 1984.

93. SUZUKI F, KATO K, NAKAJIMA T. Hormonal regulation of adipose S-100 protein release. *Journal of Neurochemistry*, 43: 1336-1341, 1984.
94. WHITAKER-AZMITIA PM, MURPHY R, AZMITIA EC. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Research*, 528: 155-158, 1990.
95. CICCARELLI R, DI IORIO P, BRUNO V, BATTAGLIA G, D'ALIMENTO I, D'ONOFRIOM, NICOLETTI F, CACIAGLI F. Activation of A₁ adenosine or mGlu₃ metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S100 β protein from cultured astrocytes. *Glia*, 27: 275-281, 1999.
96. DONATO R. Calcium independent, pH regulated effects of S-100 proteins on assembly-disassembly of brain microtubule protein in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 106-110, 1988.
97. BAUDIER J, COLE RD. Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 5876-5883, 1988.
98. MBELE GO, DELOULME JC, GENTIL BJ, DELPHIN C, FERRO M, GARIN J, TAKAHASHI M, BAUDIER J. The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 49998-50007, 2002.
99. MILLWARD TA, HEIZMANN CW, SCHAFER BW, HEMMINGS BA. Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *EMBO Journal*, 17: 5913-5922, 1998.
100. RUSTANDI RR, DROHAT AC, BALDISSERI DM, WILDER PT, WEBER DJ. The Ca²⁺-dependent interaction of S100B($\beta\beta$) with a peptide derived from p53. *Biochemistry*, 37: 1951-1960, 1998.
101. ARCURI C, BIANCHI R, BROZZI F, DONATO R. S100B increases proliferation in PC12 neuronal cells and reduces their responsiveness to nerve growth factor via Akt activation. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 4402-4414, 2005.
102. LE GRAND F, RUDNICKI MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 19: 628-633, 2007.
103. SAITO T, IKEDA T, NAKAMURA K, CHANG UI, KAWAGUCHI H. S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Reports*, 8: 504-509, 2007.
104. BROZZI F, ARCURI C, GIAMBANCO I, DONATO R. S100B protein regulates astrocyte shape and migration via interaction with Src Kinase: implications for astrocyte development, activation, and tumor growth. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 8797-8811, 2009.

105. XIONG Z, O'HANLON D, BECKER LE, RODER J, MACDONALD JF, MARKS A. Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellars cultures derived from S100B null mice. *Experimental Cell Research*, 257: 281-289, 2000.
106. HAASE H, PODZUWEIT T, LUTSCH G, HOHAUS A, KOSTKA S, LINDSCHAU C, KOTT M, KRAFT R, MORANO I. Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK. *The FASEB Journal*, 13: 2161-2172, 1999.
107. RAMBOTTI MG, GIAMBANCO I, SPRECA A, DONATO R. S100B and S100A1 proteins in bovine retina: their calcium-dependent stimulation of a membrane-bound guanylate cyclase activity as investigated by ultracytochemistry. *Neuroscience*, 92: 1089-1101, 1999.
108. ZIMMER DB, VAN ELDIK LJ. Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100: fructose-1,6-biphosphate aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 11424-11428, 1986.
109. LANDAR A, CADDELL G, CHESSHER J, ZIMMER DB. Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium*, 20: 279-285, 1996.
110. SCHAFER BW, HEIZMANN CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 21: 134-140, 1996.
111. FUJII T, MACHINO K, ANDOH H, SATOH T, KONDO Y. Calcium-dependent control of caldesmon-actin interaction by S100 protein. *Journal of Biochemistry*, 107: 133-137, 1990.
112. YU WH, FRASER PE. S100 β interaction with τ is promoted by zinc and inhibited by hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 21: 2240-2246, 2001.
113. RUSTANDI RR, BALDISSERI DM, WEBER DJ. Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B ($\beta\beta$). *Nature Structural Biology*, 7: 570-574, 2000.
114. HAGLID KG, YANG Q, HAMBERGER A, BERGMAN S, WIDERBERG A, DANIELSEN N. S100 β stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Research*, 753: 196-201, 1997.
115. VAN ELDIK LJ, CHRISTIE-POPE B, BOLIN LM, SHOOTER EM, WHETSEL WO JR. Neurotrophic activity of S100 β in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Research*, 542: 280-285, 1991.
116. HUTTUNEN HJ, KUJA-PANULA J, SORCI G, AGNELETTI AL, DONATO R, RAUVALA H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through RAGE activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 40096-40105, 2000.

117. ESPOSITO G, IMITOLA J, LU J, DE FILIPPIS D, SCUDERI C, GANESH VS, FOLKERTH R, HECHT J, SHIN S, IUUVONE T, CHESTNUT J, STEARDO L, SHEEN V. Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury. *Human Molecular Genetics*, 17: 440-457, 2008.
118. SELINFREUND RH, BARGER SW, PLEDGER WJ, VAN ELDIK LJ. Neurotrophic protein S100 β stimulates glial cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 3554-3558, 1991.
119. HU J, CASTETS F, GUEVARA JL, VAN ELDIK LJ. S100 β stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 2543-2547, 1996.
120. LAM AG, KOPPAL T, AKAMA KT, GUO L, CRAFT JM, SAMY B, SCHAVOCKY JP, WATTERSON DM, VAN ELDIK LJ. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NF κ B. *Neurobiology of Aging*, 22: 765-772, 2001.
121. HU J, VAN ELDIK LJ. S100 β induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1313: 239-245, 1996.
122. HU J, VAN ELDIK LJ. Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance β -amyloid-induced glial activation. *Brain Research*, 842: 46-54, 1999.
123. PONATH G, SCHETTLER C, KAESTNER F, VOIGT B, WENTKER D, AROLT V, ROTHERMUNDT M. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *Journal of Neuroimmunology*, 184: 214-222, 2007.
124. REALI C, SCINTU F, PILLAI R, DONATO R, MICHETTI F, SOGOS V. S100B counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 81: 677-686, 2005.
125. BIANCHI R, GIAMBANCO I, DONATO R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP-1, Co-regulation of COX-2 expression by S100B and IL-1 β and TNF- α . *Neurobiology of Aging*, 31: 665-677, 2008.
126. SHANMUGAM N, KIM YS, LANTING L, NATARAJAN R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 34834-34844, 2003.
127. ESPOSITO G, DE FLIPPIS D, CIRILLO C, SARNELLI G, CUOMO R, IUUVONE T. Astroglial-derived S100 β protein stimulates the expression of nitric oxide synthase in rodent macrophage through p38 MAP kinase activation. *Life Sciences*, 78: 2707-2715, 2006.
128. OMORI K, OHIRA T, UCHIDA Y, AYILAVARAPU S, BATISTA EL JR, YAGI M, IWATA T, LIU H, HASTURK H, KANTARCI A, VAN DYKE TE. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. *Journal of Leukocyte Biology*, 84: 292-301, 2008.

129. HOFMANN MA, DRURY S, FU C, QU W, TAGUCHI A, LU Y, AVILA C, KAMBHAM N, BIERHAUS A, NAWROTH P, NEURATH MF, SLATTERY T, BEACH D, MCCLARY J, NAGASHIMA M, MORSER J, STERN D, SCHMIDT AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97: 889-901, 1999.
130. CHAVAKIS T, BIERHAUS A, AL-FAKHRI N, SCHNEIDER D, WITTE S, LINN T, NAGASHIMA M, MORSER J, ARNOLD B, PREISSNER KT, NAWROTH PP. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *Journal of Experimental Medicine*, 198: 1507-1515, 2003.
131. SHAW SS, SCHMIDT AM, BANES AK, WANG X, STERN DM, MARRERO MB. S100B-RAGE-mediated augmentation of angiotensin II-induced activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells is dependent on PLD2. *Diabetes*, 52: 2381-2388, 2003.
132. RIUZZI F, SORCI G, DONATO R. S100B protein regulates myoblast proliferation and differentiation by activating FGFR1 in a bFGF-dependent manner. *Journal of Cell Science*, 124: 2389-2400, 2011.
133. SORCI G, RIUZZI F, AGNELETTI AL, MARCHETTI C, DONATO R. S100B causes apoptosis in a myoblast cell line in a RAGE-independent manner. *Journal of Cellular Physiology*, 199: 274-283, 2004.
134. SEDAGHAT F, NOTOPOULOS A. S100 proteins family and its application in clinical practice. *Hippokratia*, 12: 198-204, 2008.
135. MULLER K, TOWNEND W, BIASCA N, UNDEN J, WATERLOO K, ROMNER B, INGEBRIGTSEN T. S100B serum level predicts computed tomography findings after minor head injury. *Journal of Trauma*, 62: 1452-1456, 2007.
136. VON SCHOULTZ E, HANSSON LO, DJUREEN E, HANSSON J, KARNELL R, NILSSON B, STIGBRAND T, RINGBORG U. Prognostic value of serum analyses of S-100 beta protein in malignant melanoma. *Melanoma Research*, 6: 133-137, 1996.
137. NELSON DL, COX MM. *Lehninger Principles of Biochemistry (Lehninger Biyokimyanın İlkeleri)*. Çeviren: KILIÇ N. 3. baskı, Palme Yayıncılık, sayfa 623-658. 2005.
138. MELDRUM BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition*, 130: 1007S-1015S, 2000.
139. NEWSHOLME P, LIMA MMR, PROCOPIO J, PITHON-CURI TC, DOI SQ, BAZOTTE RB, CURI R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36: 153-163, 2003.
140. BEHER KL, ROTHMAN DL. In vivo NMR studies of glutamate-GABA-glutamine cycling in rodent and human cortex: the central role of glutamine. *Journal of Nutrition*, 131: 2498-2504, 2001.

141. ROTHMAN DL, SIBSON NR, HYDER F, SHEN J, BEHER KL, SHULMAN RG. In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy studies on the relationship between the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle and functional neuroenergetics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 354: 1165-1177, 1999.
142. HERTZ L, DRINGEN R, SCHOUSE A, ROBINSON SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 57: 417-428, 1999.
143. BROSNAN JT. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. *Journal of Nutrition*, 130: 988S-990S, 2000.
144. SCHOUSBOE A, HERTZ L. Role of astroglial cells in glutamate homeostasis. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 27: 103-113, 1981.
145. STORM-MATHISEN J, DANBOLT NC, ROTHE F, TORP R, ZHANG N, AAS JE, KANNER BI, LANGMOEN I, OTTERSEN OP. Ultrastructural immunocytochemical observations on the localization, metabolism and transport of glutamate in normal and ischemic brain tissue. *Progress in Brain Research*, 94: 225-241, 1992.
146. MALARKEY EB, PARPURA V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochemistry International*, 52: 142-154, 2008.
147. AKILLIOĞLU K, KOCAHAN S, MELİK EB, MELİK E. Beyin gelişimi ve N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörleri. *Arşiv*, 17: 185-208, 2008.
148. GÖRGÜLÜ A, KIRIŞ T. Eksitör aminoasitler ve eksitotoksisite-Bölüm I. *Türk Nöroşirurji Dergisi*, 15: 33-38, 2005.
149. KULLMANN DM, ASZTELY F, WALKER MC. The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 1551-1561, 2000.
150. MONAGHAN DT, BRIDGES RJ, COTMAN CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 29: 365-402, 1989.
151. NAKANISHI S, NAKAJIMA Y, MASU M, UEDA Y, NAKAHARA K, WATANABE D, YAMAGUCHI S, KAWABATA S, OKADA M. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Research Brain Research Reviews*, 26: 230-235, 1998.
152. NISWENDER CM, CONN PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50: 295-322, 2010.
153. BEART PM, O'SHEA RD. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *British Journal of Pharmacology*, 150: 5-17, 2007.

154. BENARROCH EE. Glutamate transporters diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology*, 74: 259-264, 2010.
155. SHIGERI Y, SEAL RP, SHIMAMOTO K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Brain Research Reviews*, 45: 250-265, 2004.
156. McKENNA MC, TILDON JT, STEVENSON JH, HUANG X. New insights into the compartmentation of glutamate and glutamine in cultured rat brain astrocytes. *Developmental Neuroscience*, 18: 380-390, 1996.
157. HASSEL B, SONNEWALD U, FONNUM F. Glial-neuronal interactions as studied by cerebral metabolism of [2-13C]acetate and [1-13C]glucose: an ex vivo 13C NMR spectroscopic study. *Journal of Neurochemistry*, 64: 2773-2782, 1995.
158. SONNEWALD, QU H, ASCHNER M. Pharmacology and toxicology of astrocyte-neuron glutamate transport and cycling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301: 1-6, 2002.
159. DAIKHIN Y, YUDKOFF M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *Journal of Nutrition*, 130: 1026S-1031S, 2000.
160. VERKHRATSKY A, KIRCHHOFF F. Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *Journal of Anatomy*, 210: 651-660, 2007.
161. DOBLE A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 81: 163-221, 1999.
162. MURPHY TH, MIYAMOTO M, SASTRE A, SCHNAAR RL, COYLE JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 2: 1547-1558, 1989.
163. DOBREK L, THOR P. Glutamate NMDA receptors in pathophysiology and pharmacotherapy of selected nervous system diseases. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 65: 338-346, 2011.
164. MILLER RJ, MURPHY SN, GLAUM SR. Neuronal Ca²⁺ channels and their regulation by excitatory amino acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 568: 149-158, 1989.
165. CHOI DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in Neurosciences*, 11: 465-469, 1988.
166. BHAVAGAN NV. *Medical Biochemistry*. 4th edition, San Diego, page 17-33, 2002,
167. KJELLMAN UW, BJÖRK K, EKROTH R, KARLSSON H, JAGENBURG R, NILSSON FN, SVENSSON G, WERNERMAN J. Addition of α -Ketoglutarate to blood cardioplegia improves cardioprotection. *Annals of Thoracic Surgery*, 63: 1625-1633, 1997.

168. YAMAMOTO H, MOHANAN PV. Effect of α -ketoglutarate and oxaloacetate on brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice. *Toxicology Letters*, 143; 115-122, 2003.
169. DESAGHER S, GLOWINSKI J, PREMONT J. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *Journal of Neuroscience*, 17: 9060-9067, 1997.
170. NELSON DL, COX MM. *Lehninger Principles of Biochemistry (Lehninger Biyokimyanın İlkeleri)*. Çeviren: KILIÇ N. 3. baskı, Palme Yayıncılık, sayfa 527-544. 2005.
171. NELSON DL, COX MM. *Lehninger Principles of Biochemistry (Lehninger Biyokimyanın İlkeleri)*. Çeviren: KILIÇ N. 3. baskı, Palme Yayıncılık, sayfa 567-592, 2005.
172. RAMAKRISHNAN N, CHEN R, McCLAIN DE, BUNGER R. Pyruvate prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Free Radical Research*, 29: 283-295, 1998.
173. MAZZIO EA, SOLIMAN KF. Cytoprotection of pyruvic acid and reduced beta-nicotinamide adenine dinucleotide against hydrogen peroxide toxicity in neuroblastoma cells. *Neurochemical Research*, 28:733-741, 2003.
174. ALVAREZ G, RAMOS M, RUIZ F, SATRUSTEGUI J, BOGONEZ E. Pyruvate protection against beta-amiloid-induced neuronal death: role of mitochondrial redox state. *Journal of Neuroscience Research*, 73:260-269, 2003.
175. CRUZ RJ, HARADA T, SASATOMI E, FINK MP. Effects of ethyl pyruvate and other α -keto carboxylic acid derivates in a rat model of multivisceral ischemia and reperfusion. *Journal of Surgical Research*, 165;151-157, 2011
176. WANG X, PEREZ E, LIU R, YAN L-J, MALLETT RT, YANG S-H. Pyruvate protects mitochondria from oxydative stres in human neuroblastoma SK-S-NH cells. *Brain Research*, 1132:1-9, 2007.
177. KAWAHARA M, KATO-NEGISHI M, KURODA Y. Pyruvate blocs zinc-induced neurotoxicity in immortalized hypothalamic neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22:87-93, 2002.
178. LEE JY, KIM YH, KOH JY. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *Journal of Neuroscience*, 21:RC171(1-6), 2001.
179. MONGAN PD, CAPACCHIONE J, FONTANA JL, WEST S, BUNGER R. Pyruvate improves cerebral metabolism during hemorrhagic shock. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 281:H854-H864, 2001.
180. YI J-S, KIM T-Y, KIM DK, KOH J-Y. Systemic pyruvate administration markedly reduces infarcts and motor deficits in rat models of transient and permanent focal cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease*, 26:94-104, 2007.

181. PIERRE K, PELLERIN L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *Journal of Neurochemistry*, 94:1-14, 2005.
182. POOLE RC, HALESTRAP AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *American Journal of Physiology*, 264:C761-C782, 1993.
183. PHILP A, MACDONALD AL, WATT PW. Lactate - a signal coordinating cell and systemic function. *Journal of Experimental Biology*, 208:4561-4575, 2005.
184. MAGISTRETTI PJ, PELLERIN L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 354:1155-1163, 1999.
185. DIARMUID S, PERNET A, HALLETT WA, BINGHAM E, MARSDEN PK, AMIEL SA. Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23:658-664, 2003.
186. CHIH C-P, ROBERTS EL. Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23:1263-1281, 2003.
187. PELLERIN L. Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochemistry International*, 43:331-338, 2003.
188. POOLE RC, HALESTRAP AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *American Journal of Physiology*, 264:C761-C782, 1993.
189. PELLERIN L, MAGISTRETTI PJ. Sweet sixteen for ANLS. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32:1152-1166, 2012.
190. GROUSSARD C, MOREL I, CHEVANNE M, MONNIER M, CILLARD J, DELAMARCHE A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *Journal of Applied Physiology*, 89:169-75, 2000.
191. HERZ H, BLAKE DR, GROOTVELD M. Multicomponent investigations of the hydrogen peroxide- and hydroxyl radical-scavenging antioxidant capacities of biofluids: the roles of endogenous pyruvate and lactate. Relevance to inflammatory joint diseases. *Free Radical Research*, 26:19-35, 1997.
192. GIMAN M, SILIPRANDI N. On the oxidation of α -oxobutyrate by isolated mammalian mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 162:164-169, 1968.
193. STEELE RD, WEBER H, PATTERSON JI. Characterization of α -ketobutyrate metabolism in rat tissues: effects of dietary protein and fasting. *Journal of Nutrition*, 114:701-710, 1984.

194. FRIEDMAN AN, BOSTOM AG, SELHUB J, LEVEY AS, ROSENBERG IH. The kidney and homocysteine metabolism. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12: 2181-2189, 2001.
195. KAYAALP O, AKICI A. Yağda çözünen vitaminler. Editör: KAYAALP O. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. 32. baskı, PelikanYayıncılık Ltd. Şti., Ankara, sayfa 1314-1317, 2009.
196. KOSENJANS W, RYMASZEWSKI Z, BARANKIEWICZ J, BOBST A, ASHRAF M. Menadione-induced oxidative stress in bovine heart microvascular endothelial cells. *Microcirculation*, 3: 39-47, 1996.
197. CRIDDLE DN, GILLIES S, BAUMGARTNER-WILSON HK, JAFFAR M, CHINJE EC, PASSMORE S, CHVANOV M, BARROW S, GERASIMENKO OV, TEPIKIN AV, SUTTON R, PETERSEN OH. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 40485-40492, 2006.
198. NATH KA, NGO EO, HEBBEL RP, CROATT AJ, ZHOU B, NUTTER LM. Alpha-Ketoacids scavenge H₂O₂ in vitro and in vivo and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 268: C227-C236, 1995.
199. ABE K, SAITO H. Menadione toxicity in cultured rat cortical astrocytes. *Japanese Journal of Pharmacology*, 72: 299-306, 1996.
200. VALENTOVIC MA, BALL JG. 2-Aminophenol and 4-aminophenol toxicity in renal slices from Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 55: 225-240, 1998.
201. SKILLEN AW. Clinical biochemistry of lactate dehydrogenase. *Cell and Biochemistry and Function*, 2: 140-144, 1984.
202. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275, 1951.
203. SCHUBERT D, PIASECKI D. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *Journal of Neuroscience*, 21: 7455-7462, 2001.
204. HIMI T, IKEDA M, YASUHARA T, MUROTA SI. Oxidative neuronal death caused by glutamate uptake inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 71: 679-688, 2003.
205. ALBRECHT P, LEWERENZ J, DITTMER S, NOACK R, MAHER P, METHNER A. Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system xc⁻ as a neuroprotective drug target. *CNS and Neurological Disorders Drug Targets*, 9: 373-382, 2010.

206. SHIMIZU H, GRAHAM SH, CHANG LH, MINTOROVITCH J, JAMES TL, FADEN AI, WEINSTEIN PR. Relationship between extracellular neurotransmitter amino acids and energy metabolism during cerebral ischemia in rats monitored by microdialysis and in vivo magnetic resonance spectroscopy. *Brain Research*, 605: 33-42, 1993.
207. YANG Y, LI Q, MIYASHITA H, YANG T, SHUAIB A. Different dynamic patterns of extracellular glutamate release in rat hippocampus after permanent or 30-min transient cerebral ischemia and histological correlation. *Neuropathology*, 21: 181-187, 2001.
208. OJA SS, SARANSAARI P. Release of endogenous amino acids from the striatum from developing and adult mice in ischemia. *Neurochemical Research*, 36: 1444-1451, 2011.
209. BUYUKUYSAL RL. Ischemia and reoxygenation induced amino acid release release and tissue damage in the slices of rat corpus striatum. *Amino Acids*, 27: 57-67, 2004.
210. OKA M, ITOH Y, UKAI Y. Preferential inhibition by a novel Na(+)/Ca(2+) channel blocker NS-7 of severe to mild hypoxic injury in rat cerebrocortical slices: A possible involvement of a highly voltage-dependent blockade of Ca(2+) channel. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293: 522-529, 2000.
211. JOSHI I, ANDREW RD. Imaging anoxic depolarization during ischemia-like conditions in the mouse hemi-brain slice. *Journal of Neurophysiology*, 85: 414-424, 2001.
212. JARVIS CR, ANDERSON TR, ANDREW RD. Anoxic depolarization mediates acute damage independent of glutamate in neocortical brain slices. *Cerebral Cortex*, 11: 249-259, 2001.
213. DE KEYSER J, SULTER G, LUITEN PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends in Neurosciences*, 22: 535-540, 1999.
214. FINK MP. Ethyl pyruvate. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 21: 160-167, 2008.
215. PLUM F. Neuroprotection in acute ischemic stroke. *Journal of the American Medical Association*, 285: 1760-1761, 2001.
216. VONKORFF RW. Pyruvate-C14, purity and stability. *Analytical Biochemistry*, 18: 171-178, 1964.
217. MARGOLIS SA, COXON B. Identification and quantitation of the impurities in sodium pyruvate. *Analytical Chemistry*, 58: 2504-2510, 1986.

7. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince başta her türlü bilimsel bilgi, uygulama becerisi eğitimi ve deneyim desteğini gördüğüm tez danışmanım Prof.Dr. R. Levent Büyükuysal olmak üzere kendilerinden doktora dersleri aldığım Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Vahide Savcı, Prof Dr. M. Sibel Gürün, Prof.Dr. İsmail H. Ulus, Prof.Dr. Sinan Çavun ve bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım anabilim dalının tüm diğer öğretim üyelerine, beraber çalıştığım ve yardımlarını gördüğüm anabilim dalının tüm araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencileri ve personeline, yine doktora dersi aldığım tüm diğer anabilim dalları öğretim üyelerine, tez çalışmamın istatistiksel hesaplamalarında yardımcı olan Çağatay Büyükuysal'a ve son olarak da bu eğitim sürecinde bana destek olan eşim ve oğluma çok teşekkür ederim.

8. ÖZGEÇMİŞİM

1957, Eskişehir doğumluyum. İlk, orta ve lise eğitimimi Eskişehir’de tamamladım. 1983 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. 1992 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında uzmanlık eğitimimi tamamladım. Pratisyen hekim olarak Mardin, Tekirdağ ve İstanbul’da, Dahiliye uzmanı olarak Samsun, Bilecik ve Bursa’da çalıştım. 1999 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İlk ve Acil Yardım Anabilim Dalında Öğretim Görevlisi olarak çalışmaya başladım. 2001 yılından itibaren de İç Hastalıkları Anabilim Dalında Öğretim Üyesi olarak görev yapmaktayım. 2006 yılında Doçent oldum. 2003-2006 yılları arasında Acil Tıp Anabilim Dalı Başkanlığı yaptım. 2010 yılından beri Genel Dahiliye Bilim Dalı Başkanlığını sürdürmekteyim. Ulusal ve uluslararası indekslere giren dergilerde yayınlanmış 40 makalem, ulusal ve uluslararası kongrelerde sunulmuş 55 bildirim vardır.