

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİTRO SİNİR HASARINDA SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ (NGF)
İLE ASLAN YELESİ MANTARININ (*Hericium erinaceus*)
REJENERATİF ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Biyolog Peray AYHAN
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÜSTÜN

VAN-2017

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİTRO SİNİR HASARINDA SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ (NGF)
İLE ASLAN YELESİ MANTARININ (*Hericium erinaceus*)
REJENERATİF ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Biyolog Peray AYHAN
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÜSTÜN

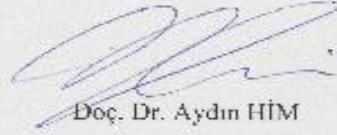
VAN-2017

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2014-SBEYL148 nolu proje olarak desteklenmiştir.

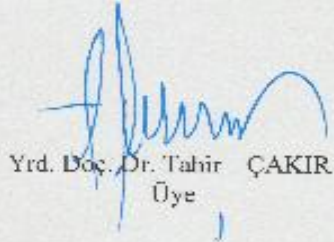
I.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**IN VITRO SİNİR HASARINDA SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ
(NGF) İLE ASLAN YELESİ MANTARININ (*Hericium
erinaceus*) REJENERATİF ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Biyolog Peray AYHAN
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ



Doç. Dr. Aydın HİM
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Tahir ÇAKIR
Üye



Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÜSTÜN
Üye

TEZ KABUL TARİHİ
18/ 08/ 2017

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgileriyle bana yol gösteren, fikirlerimi destekleyerek çalışmalarım da beni cesaretlendiren değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÜSTÜN'e, Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Tahir Çakır'a, eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Elif KAVAL OĞUZ'a, çalışmam boyunca bana destek olan Arş. Gör Ayşe ŐEKER ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme teşekkürü borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL DİZİNİ	vii
TABLO DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. Sinir Sistemi	3
2. 1. 1. Periferik sinir sistemi.....	3
2. 1. 2. Dorsal kök gangliyonu	3
2. 1. 3. Sinir hücresi.....	4
2. 2. Periferik Sinir Dejenerasyonu	6
2. 2. 1. Hücresel hasar mekanizmaları.....	6
2. 2. 2. Mekanik hasar tipleri.....	8
2. 2. 3. Periferik hasar tipleri	9
2. 3. Hücre Gövdesinin Dejenerasyona Yanıtı	13
2. 4. Periferik Sinir Rejenerasyonu	14
2. 4. 1. Büyüme konisinin yapısı ve rejenerasyona etkisi	14
2. 4. 2. Sinir rejenerasyonunda immün hücrelerin rolü	19
2. 4. 3. Sinir rejenerasyonunda sitokinlerin rolü	20
2. 4. 4. Sinir rejenerasyonunda nörotrofik faktörlerin etkinliği.....	22
2. 5. Aslan Yelesi Mantarı.....	26
2. 5. 1. Aslan yelesi mantarının özellikleri.....	26
2. 5. 2. Aslan yelesi mantarının mineral organizasyonu ve gıda olarak kullanımı	30
2. 5. 3. Aslan yelesi mantarının antibiyotik özelliği.....	30
2. 5. 4. Aslan yelesi mantarının antikarsinojenik etkileri.....	31
2. 5. 5. Aslan yelesi mantarının nöroprotektif etkileri.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3. 1. Materyaller	32

3. 1. 1. Deney hayvanı	32
3. 1. 2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	32
3. 2. Yöntem	33
3. 2. 1. Aslan yelesi mantar ekstraktının hazırlanması	33
3. 2. 2. Çalışmada kullanılan vasatların hazırlanması	33
3. 2. 3. Farelerden arka kök gangliyonların çıkarılması	34
3. 2. 4. Hücre kültürü	34
3. 2. 5. Mikroskopik görüntüleme ve aksotomi	36
3. 2. 6. Gruplar	39
4. BULGULAR	41
4. 1. Kontrol Grubu	42
4. 2. NGF Grubu	43
4. 3. AYM Grubu	44
4. 4. AYM ve NGF Grubu	45
5. TARTIŞMA	47
5. 1. Yöntem Tartışması	47
5. 2. Etkinlik Değerlendirmesi	48
5. 3. Sonuç	50
ÖZET	52
SUMMARY	53
6. KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	65
EKLER	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

+TIPs	Pozitif Uç Taşıyıcı Proteinler
µg	Mikrogram
µJ	Mikro Joule
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
AYM	Aslan Yelesi Mantarı
BDNF	Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
CGRP	Kalsitonin Gen İlişkili Peptidin
CNTF	Sillier Nörotrofik Faktör
CT-26	Fare Kolon Kanseri Hücresi
DKG	Dorsal Kök Ganglionu
DLK	İkili Lösin Zincirli Kinaz
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
GABA	γ-aminobutirik asit
GTPaz	Guanozin Trifosfataz
HE	Heridium erinaceus Mantarı
HPLC	Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi
Ig SF	İmmunoglobülin Süper Ailesi
IL	İnterlökin
JIP3	JNK ile Etkileşen Protein 3
KIF2	Kinezin Süperaikesi Üyesi 2
LIF	Lösemi İnhibe Edici Faktör
MAPs	Mikrotübül Bağlı Proteinler
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Stafilococcus aureus</i>
ng	Nanogram
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
nM	Nano Molar
NT	Nörotrofin

P0	Miyelin Protein Zero
P75 ^{NTR}	Pan-Nörotrofin Reseptör
PC12	Fiokromositom Hücresi
PPVs	Plazmalemma Prekürsör Vezikülleri
SF	Serum Fizyolojik
SOCS3	Sitokin Sinyal Baskılayıcı Protein 3
SP	P Maddesi
STAT3	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsyon Aktive Edici Proteinler
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
Trk	Tropomiyozin Reseptör Kinaz
TRPV1	Geçici Reseptör Potansiyeli Vallanoid-1
w/v	Çözünen Maddenin Ağırlığı (g) / Çözeltinin Hacmi (mL)
WD	Waller Dejenerasyonu

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Dorsal kök gangliyonu anatomisi	4
Şekil 2. Sinir hücre anatomisi.	5
Şekil 3. Periferik sinir histolojisi.....	6
Şekil 4. Waller dejenerasyonu.....	8
Şekil 5. Yaralanma Sınıflandırmaları.....	10
Şekil 6. Sinir travma sınıflandırması.....	13
Şekil 7. Büyüme konisine etkiyen kuvvetler.....	16
Şekil 8. Nörotrofinlerin X-ray kristalize yapısı.....	22
Şekil 9. NGF alt ünitelerinin etkileşimi.	23
Şekil 10. NGF sinyal yolları.....	24
Şekil 11. Aslan Yelesi Mantarı.	26
Şekil 12. AYM erinasinlerin kimyasal yapısı.....	28
Şekil 13. <i>Hericium erinaceus</i> B12 lakton	29
Şekil 14. Diseksiyonu sırasında kullanılan malzemeler.....	34
Şekil 15. Zaman aralıklı mikroskopla akson uzunluğunun ölçümü.	37
Şekil 16. PALM Mikrolazer sistemi	38
Şekil 17. Transeksiyon yapılacak nöronun görüntüleri.....	39
Şekil 18. Kontrol grubu hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	42
Şekil 19. NGF grubu hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.	43
Şekil 20. AYM grubu hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	44
Şekil 21. NGF + AYM grubu hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.	45
Şekil 22. Deney grupları canlılık karşılaştırması.	46
Şekil 23. Akson uzunluğu ölçümlerinin Karşılaştırılması.....	46

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Sarf Malzemeler.....	31
-------------------------------	----

1. GİRİŞ

Periferik sinir sistemi merkezi sinir sistemine oranla daha az korunaklı olduğundan travma sonucu hücre hasarı görülme sıklığı daha yüksektir. Travma dışında bazı hastalıklar, tümörler ve iyatrojenik lezyonlar da hücre hasarına neden olabilir. Yirmi milyon Amerikalı, travmatik ve tıbbi rahatsızlıkların neden olduğu periferik sinir yaralanmasından müzdariptir (Grinsell ve Keating, 2014) ve travmatik hasarlı hastalara her yıl 500.000' den fazla yeni hasta eklendiği tahmin edilmektedir (Rodriguez ve ark., 2004).

Periferik sinir sistemi hasar gördüğünde ya da hastalıklardan zarar gördüğünde merkezi sinir sisteminden daha fazla kendini onarabilme yeteneğine sahiptir. Periferik sinir sistemindeki hücreler canlı kalabilen nöronlarla bağlantı kurarak hasara yanıt verebilir. Fonksiyonel sinir hasarını tedavi edebilmek için uygulanan pek çok yöntem; yalnızca rejeneratif sürecin başlayabilmesi için uygun çevre koşulları sağlayarak iyileşmeye katkıda bulunur (Oberlin ve ark., 1994). Nörotrofinler ile yapılan çalışmalar, lokal uygulamaların fonksiyonel işlevin geri kazanılmasında daha etkin olduklarını ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2001). Bununla birlikte sistemik olarak dağılan nörotrofinler protein toksisitesi gösterebilmektedirler. Hayvanlardan elde edilen nörotrofinlerin eksojen uygulanması, bağışıklık sistemini lezyonlu bölgeye karşı aktive edebilir (Aloe, 2004). Nerve growth factor (NGF) bu nörotrofinlerden en çok çalışılanı ve rejeneratif etkinliği en çok saptananıdır. Bu nedenle NGF stimülatörü olan her madde dejeneratif nöral hastalık ve periferik sinir hastalıkları için ilaç olmaya adaydır. NGF ekspresyonunu aktive eden aslan yelesi mantarının da aralarında bulunduğu birçok doğal ürün bulunmaktadır (Kawagashi ve ark., 1991, 1994, 1996; Yamaguchi ve ark., 1993,1994).

Hericium erinaceus birçok Asya ülkesinde geleneksel tıp alanında çok uzun süredir tedavi edici bir mantar olarak kullanılmaktadır. Polisakkaridler, lektinler, proteinler, erinasinler, herisenonlar gibi birçok aktif bileşen içermektedir ve biyolojik aktiviteleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Chang ve ark., 2015; Raman ve ark., 2015; Phan ve ark., 2014; 2015; 2017; Seow ve ark., 2013; Eik ve ark., 2012; Mizuno,

1999; Kawagishi ve ark., 1991; 1993; 1996; Arnone ve ark., 1994; Kimura ve ark., 1991).

Bu tezin amacı Aslan Yelesi Mantarı (AYM) sıcak su ekstraktının fare dorsal kök gangliyon (DKG) nöronları (periferik duysal nöronlar) üzerindeki rejeneratif etkisini Sinir Büyüme Faktörü (NGF) ile karşılaştırarak ortaya koymaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, santral ve periferik sinir sistemi olarak ikiye ayrılır. Beyin ve omurilik, santral sinir sistemini, kranial sinirler, spinal sinirler ve gangliyonlar ise periferik sinir sistemini oluşturur. Merkezi sinir sistemindeki nöron topluluklarına nükleus denirken, periferik sinir sistemindeki nöron topluluklarına ganglion denir. Aynı şekilde merkezi sinir sistemindeki akson topluluklarına traktus, periferik sinir sistemindeki akson topluluklarına ise sinir denir (Öge ve Baykan, 2015).

2. 1. 1. Periferik sinir sistemi

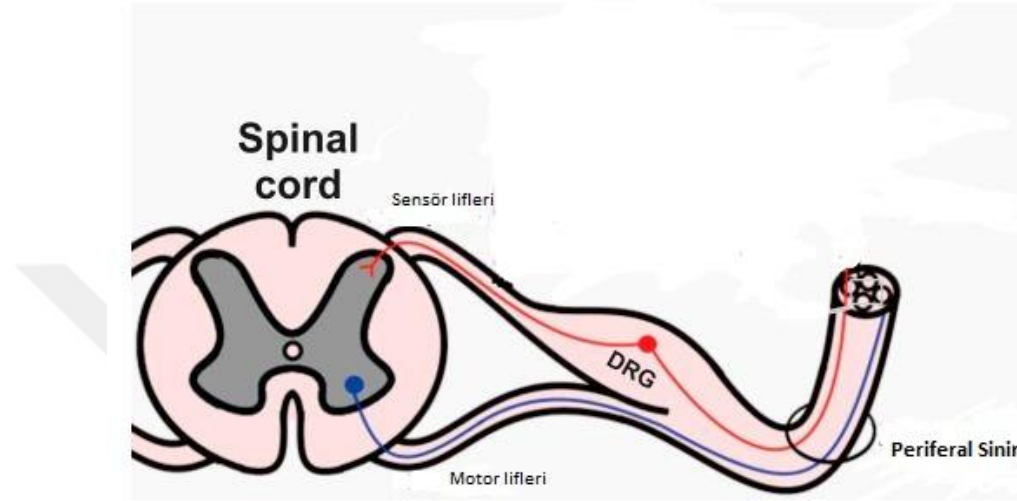
Embriyonel hayatın üçüncü haftasının başlarında ektodermden nöral plağın oluşmasıyla sinir sisteminin tüm yapısını meydana getiren gelişim başlamış olur. Yirmi beşinci günde sinir sistemi gelişiminin tamamlanmasıyla birlikte tubus nöralisin oluşumu dördüncü hafta itibari ile de tubus nöralisin üst kısmından encephalon, alt kısmından medulla spinalis ve spinal sinirlerin gelişimi gözlenir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Periferik sinir sistemi; yapısal olarak çiftler halinde yer alan kranial ve spinal sinirler ile bunlarla bağlantılı gangliyonlardan oluşur. Gangliyonlar, bağ dokusu tarafından desteklenen nöron hücre gövdeleriyle, glia hücrelerini içeren oval yapılardır, sinir uyarılarının aktarımında dağıtım istasyonu olarak görev alırlar. Bir periferik sinir; duysal, motor ve sempatik, parasempatik liflerden oluşur. Kranial sinirler beyinden çıkarak gövdenin üst bölümündeki organlara uzanan 12 çift, spinal sinirler ise omurilikten çıkarak tüm vücuda uzanan 31 çift sinir içermektedir. Periferik sinir sisteminde afferent lifler, gelişmiş reseptör sistemleri ile çevreden alınan uyarıları santral sinir sistemine iletirlerken, efferent lifler ise santral sinir sisteminin çeşitli kademelerinde oluşan uyarıları son organlara iletmektedir (Campbell ve Reece, 2006).

2. 1. 2. Dorsal kök gangliyonu

Periferik sinir sisteminde nöronların toplandığı bölgelere gangliyon denir (Şekil 2.1). Duysal nöronların ilk hücreleri burada bulunurlar ve farklı reseptör tiplerine

sahiptirler. Reseptör tiplerine göre mekanoreseptör, termoreseptör, nosiseptör, elektromanyetik reseptörler ve kemoreseptörler olarak adlandırılırlar ve sırasıyla basınç, sıcaklık, ağrı, ışık ile tat ve kokuyu algılayarak iletirler. Pseudounipolar olan bu hücrelerin bir uzantısı uyarılacak periferik bölgeye doğru uzanırken, bir diğeri merkezi sinir sistemine giden merkezi dalı oluşturur (Guyton ve Hall 2007).

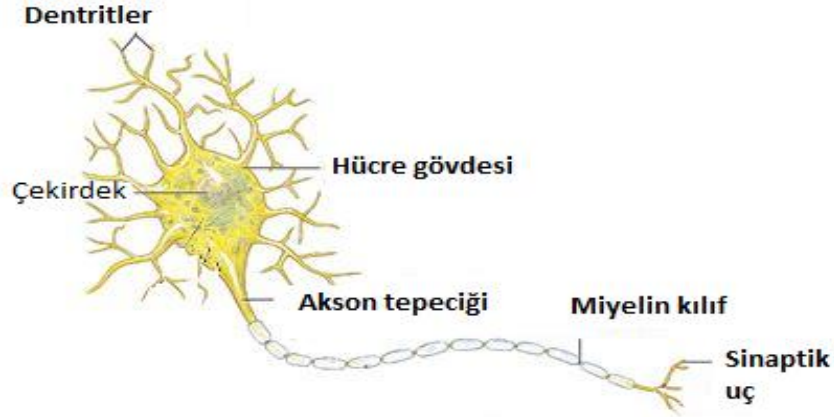


Şekil 1. Dorsal kök gangliyonu anatomisi (Barton ve ark., 2017)

2. 1. 3. Sinir hücresi

Sinir sisteminin yapısal ve işlevsel birimi sinir hücreleridir. Bu hücreler bir hücre gövdesi ile genellikle iki farklı ipliksi uzantı tipinden oluşmuştur (Şekil 2.2). Dentritler, hücre dışından gelen sinyalleri alıp hücre gövdesi boyunca taşıyan, kısa ve çok dallanmış uzantılar, aksonlar ise mesajları akson tepeciği ile bağlı olduğu hücreden diğer hücrelere ileten, uzunluğu bir metreyi aşabilen uzantılardır. Yarı jel kıvamında olan nöroplazmadan aksone doğru devamlı bir sıvı akışı vardır ve akson içindeki sıvı aksoplazma adını alır. Aksoplazma çevredeki yapılardan aksolemma denilen bir membranla ayrılır (Junqueira ve Carneiro, 2006). Miyelinli sinir liflerinde sinir hücresinden sonra kısa bir uzaklık çıplak olarak devam eder. Daha sonra aksonun çevresinde lipid ve protein karışımından oluşan miyelin kılıf bulunur. En çok miyelinize olan hücreler motor nöronlarken, duysal nöron aksonlarının bir bölümü miyelinsizdir. Miyelin kılıfın devamlılığı yoktur, ranvier boğumlarında 1 mikronluk kesintiye uğrar. Sinir lifinin iki ranvier boğumu arasındaki kısmına internod denir. Bu bölgelerde adhezyon molekülleri ve sodyum iyon kanalları bulunur. Ranvier boğumları, elektriksel

iletinin aktarılmasından sorumludur ve böylece elektriksel iletinin akson boyunca hızlandırılmasını sağlar (Guyton ve Hall, 2007).



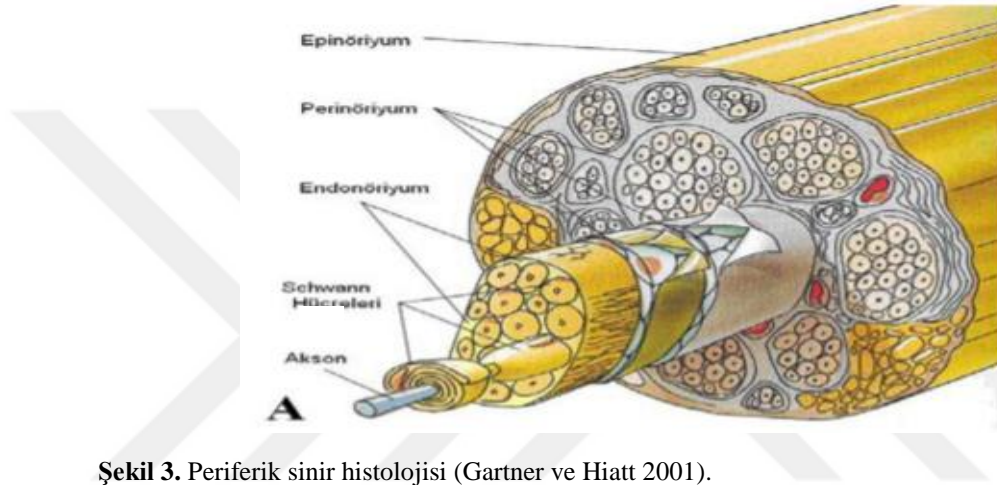
Şekil 2. Sinir hücre anatomisi (Campbell ve Reece, 2006).

Periferik sinirler, içten dışa doğru endonöryum, perinöryum ve epinöryum adı verilen bağ dokusu kılıfları tarafından sarılmışlardır (Şekil 2.3). Sinirler dıştan epinöryum denen lenf, kan damarı ve yağ hücrelerini de içeren bağ dokusundan oluşan fibröz bir kılıftan oluşur. Her demet çevresinde yassılaştırmış epitelyum benzeri hücrelerden oluşan ve intranöral basıncı koruyan perinöryum ile schwann hücreleri tarafından oluşturulan miyelin ve tip 4 kollajen fibrillerden oluşan endonöryumdan meydana gelir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Schwann hücreleri nöral tüpten köken alan yalnızca periferik sinir sistemde bulunan ve tek bir hücrenin miyelinizasyonunu gerçekleştirebilen nöroglial hücrelerdir (Junqueira ve Carneiro, 2006). Birçok farklı sistem miyelinizasyonu düzenlemekle beraber schwann hücrelerinde Notch sinyali aracılığıyla gerçekleşen negatif modülasyon miyelin oluşumunun temel sebeplerindendir. Akson çapı schwann hücrelerinin miyelinizasyonu gerçekleştirmesi için bir anahtardır. Aktin filamentleri (F-aktin), mikrotübüller, ara filamentler ve P0 proteini periferik miyelin iskeletinin temel elemanlarını, lipid bileşenleri ise içeriğinin kuru ağırlığının %75' ini oluşturmaktadır (Nave ve Werner, 2014).

Hasar sonrası Schwann hücreleri fenotipik değişikliğe uğrar. Bu esnada miyelinizasyon genleri inaktif olurken rejenerasyon genleri düzenlenir. Gözlenen

fenotipik değişimle beraber büyüme faktörlerinin salınımı artar, belirli faktörleri salgılayarak makrofajların hasarlı bölgeye müdahale etmesini sağlar ve hasar sonrası hücresel atıkların temizlenmesinde ilk fazı gerçekleştirir. Schwann hücreleri otofajik yöntemle miyelin atıklarını stoplazmasında yıkıma uğratar ve böylece hasar bölgesinin temizliğinin yaklaşık yarısını gerçekleştirmiş ve rejenerasyonu hızlandırmış olur (Barton ve ark., 2017).



Şekil 3. Periferik sinir histolojisi (Gartner ve Hiatt 2001).

Nöronlar fonksiyonel rollerine göre, motor nöronlar, duysal nöronlar ve ara nöronlar olmak üzere üçe ayrılır. Motor nöronların hücre gövdeleri, spinal kordun ön boynuzunda yerleşiktir, aksonları motor son plaklarda sonlanır. Duysal nöronların hücre gövdeleri arka kök ganglionunda yerleşiktir, aksonal uzantısının bir ucu periferde özelleşmiş reseptörlerde sonlanır, diğer ucu merkezi sinir sisteminde sonlanır.

2. 2. Periferik Sinir Dejenerasyonu

2. 2. 1. Hücresel hasar mekanizmaları

Şimdiye kadar tanımlanmış olan tüm hasar modelleri hücresel olarak belirli bir yol izlemektedir. Sinirsel hasar için şu ana kadar iki ayrı alternatif model belirlenmiştir.

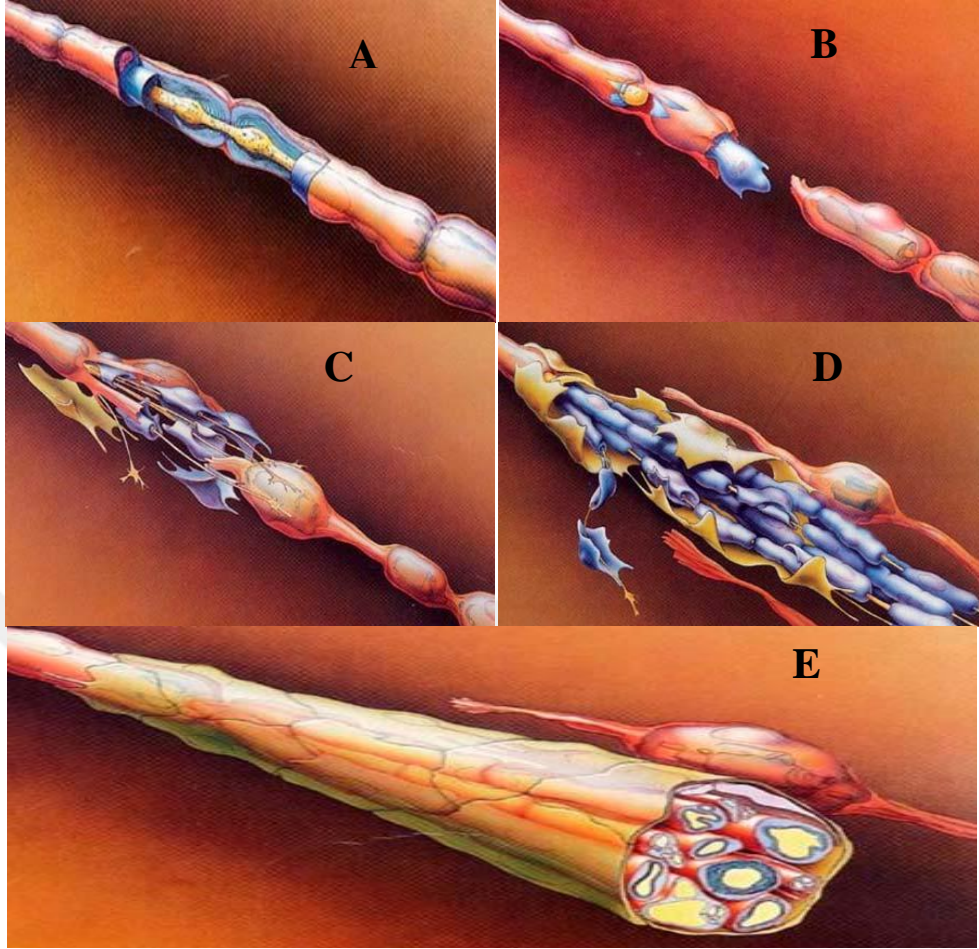
***Dying back* mekanizması**

Sağlıksız bir nöronda distalden hücre gövdesine doğru gerçekleşen dejenerasyona *Dying back* mekanizması denir. Dejenerasyon süreci haftalar hatta ayları kapsayan bir sürede gerçekleşir. Bu mekanizma, periferik sinirlerde en yaygın gözlenen patolojidir. Toksik, metabolik ve enfeksiyonel nedenlerden kaynaklanmaktadır (Raff ve ark., 2002).

Waller dejenerasyonu

1850 yılında August Waller gövdesinden ayrılmış kraniyel sinir aksonlarındaki değişiklikleri gözlemlemiştir. 1989 yılında Stoll ve arkadaşlarının konuyu tekrar ele almasıyla birlikte aksonun distal kısmının hızlıca parçalanması ve yıkım sonucu oluşan kalıntıların temizlenmesi için immün sistem hücrelerinin alana geçişini kapsayan bu süreç Waller Dejenerasyonu (WD) olarak kabul edilmiştir (Şekil 2.4).

WD bir akson bütünlüğü tamamen bozulduğunda meydana gelmektedir. Hızla dejenere olan aksonda endoplazmik retikulum yıkıma uğrar, nöroflamentler parçalanır, mitokondri şişer ve akson fagosite olacak fragmentlere parçalanır. Periferik hücre dejenerasyonunun, 48 saat içerisinde sonlandığı ifade edilirse de bu WD' nin başlangıcı olarak kabul edilir. Periferik hücre hasarlandığında schwann hücreleri aksondan ayrılarak değişime uğrar, fibroblastlarla birlikte immün hücre geçişini destekleyen sitokinleri salgılar. Nötrofiller bölgeye ilk gelen immün sistem hücreleridir. Hasar sonrasındaki 8 saat içerisinde aksonun distal ucunda toplanırlar. Kısa süre sonra monositlerin bölgeye akışı ve makrofajlara dönüşümü gerçekleşir. Birkaç gün içerisinde hematogenik makrofajlar lökositler tarafından tutulur. Bu durumun WD'yi tamamlamada kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir (Defrancesco-Lisowitz ve ark., 2015).



Şekil 4. Waller dejenerasyonu (Mackinnon ve Dellon., 2014). Sağlıklı sinir hücresi üzerinde yapılan kesilme hasarı (A), Kesme işleminden sonra distalden hasarın olduğu yöne kadar dejenerasyon gerçekleşmesi (B), Proksimal segmentten rejenerasyon için uzayan sinir lifi dallarının büyüme konisiyle schwann hücreleri laminasına tutunması (C), rejenere olan bölgenin olgunlaştıkça her bir sinir dalının miyelinize olması (D), Başlangıçta kesim yapılan tek lifin sonuçta miyelinize olmuş çok sayıda fiber içeren bir yapıya dönüşmesi (E).

2. 2. 2. Mekanik hasar tipleri

Crush (Ezilme) hasarı

Bu hasar yaralanma şeması içinde değerlendirilmezse de 1. derece yaralanmadan daha hafif ya da nöropraksi hasarından daha hafif dereceli olduğu vurgulanarak ifade edilebilir. Genel olarak anatomik açıklıklara yakın lokasyonlarda meydana gelir. Üst ekstremitelerde en yaygın görüldüğü bölgeler Carpal Tunnel ve Cubital Tunnel'dir. Periferik sinir ezilmesi akut ya da kronik olabilir. Akut ezilme, radyal mononöropatide gözlendiği gibi belirli bir süre eksternal ezilme oluşumu sonrasında geçici uyuşma, hissizlik ve bilek düşmesi bulgularıyla ifade edilir. Tamamen iyileşme süreci

haftalardan yıllara kadar değişebilir. Kronik ezilme ise Carpal Tunnel sendromunda gözlenir. Semptomlar uyuşma ve distal hissizlikle başlar zamanla kaslar zayıflar, harap olur ve aksonal hasar derecesine ulaşır. Sinir morfolojisi ve nöromusküler kavşaklar normal yapısını korurken, miyelin kılıflarının daha ince ve bozulmuş olduğu gözlenmektedir (Netscher ve ark., 2012).

Double crush

Ezilme alanında bir diğer hasar şekli *double crush* olarak bilinir. İlk olarak 1973 yılında Upton ve McComas tarafından carpal tunnel ya da cubital tunnel tanısı olan 115 hastanın 81'inde aynı zamanda boyun bölgesinde nöral lezyon oluşumunu gözlemlenmeleri sonucunda tanımlanmıştır. Buna göre bir hücrede proksimal bölgede lezyon oluşması sonrasında transport yoluyla başka bir bölgenin nöropati geliştirmeye yönelik artan bir hassasiyetinin meydana geldiğini ifade eder. Double crushtaki lezyon morfolojisi kronik lezyon morfolojisi ile aynıdır. Daha sonra 1990 yılında Dahlin ve Lundborg bilekte ulnar sinir sıkışması görülen hastaların dirsekte benzer proksimal hasar geliştirdiklerini gözlemleyerek double crush'ın ters formunu (*Reverse Double Crush*) tanımlamışlardır (Molinari ve Elfar, 2013).

Çarpma ve transeksiyon hasarı

Çarpma hasarı tipik olarak akut travmatik ezilmenin kesici olmayan bir alet (sopa, cerrahi clamp vb.) yoluyla gerçekleşen yaralanma modeli iken transeksiyon hasarı ise delici ya da kesici bir alet (cam, bıçak silah vb.) aracılığıyla sinir bütünlüğünün tamamen bozulduğu yaralanma modelidir. Transeksiyon modeli hasar sınıflandırmasında nörotmezis veya 5. derece yaralanma ile tanımlanabilir (Zochodne ve Levi, 2005).

2. 2. 3. Periferik hasar tipleri

Seddon 1943 yılında 650 hasta üzerinde çalışma yaparak demiyelinizasyon varlığı ve akson ile sinirlerin bağlı olduğu dokulardaki hasarın boyutunu göz önüne alarak akson hasarlarını üç farklı kategoride ele almıştır (Seddon, 1943) (Şekil 2.5). Daha sonra Sunderland 1951 yılında aksonların bağlı olduğu dokuların hasar derecelendirmesini yapabilmek amacıyla Seddon'un geliştirdiği sınıflandırmayı

genişleterek sınıflandırmayı beş kategoride incelemiştir (Sunderland, 1951) (Şekil 2. 5). 1988 yılında Mackinnon ve Dellon Sunderland'ın sınıflandırmasına altıncı grubu da eklemiştir (Mackinnon ve Dellon 1988).

SEDDON	SUNDERLAND	TANIM
Nöropraksia	1.Derece Yaralanma	Segmental demiyelinizasyon, lokalize iletim bloğu
Aksonometsiz	2. Derece Yaralanma	Aksonal yaralanma, distalde
	3. Derece Yaralanma	Waller Dejenerasyonu
	4. Derece Yaralanma	Waller Dejenerasyonu endonöryumda fibrozis ile birlikte.
Nörometsiz	5. Derece Yaralanma	İntakt olan tek yapı eksternal epinöryumdur.
	6. Derece Yaralanma	Sinir tamamen ayrılmıştır.

Şekil 5. Yaralanma Sınıflandırmaları.

Seddon sınıflandırması

a) Nöropraksi

Gözlenen en hafif sinir hasarıdır. Yalnızca fokal demiyelinizasyon gerçekleşir, aksonda ya da bağlı olduğu dokularda herhangi bir hasar söz konusu değildir. Hafif derecede ezilme ya da çarpma sonucu meydana gelir. Sinirde lokalize bir iletim bozukluğu mevcuttur ve iletim hızında düşmeyle sonuçlanır. Demiyelinizasyon derecesine bağlı olarak etkisi asenkronik iletimden kas zayıflığına neden olan iletim bloklanmasına kadar değişim gösterebilir (Şekil 2.6).

b) Aksonotmezis

Fokal demiyelinizasyona ek olarak aksonal hasar gerçekleşmesine rağmen destek dokunun devamlılığının korunduğu daha ağır bir yaralanma türüdür. Hasarlı

aksonun distalinde Wallerian dejenerasyonun (WD) olduğu, proksimalinde ise aksondaki miyelin çapının ve ileti hızının azaldığı görülür (Şekil 2.6).

c) Nörotmezis

Çoğu hasar derecelendirmesi nörotmezis olarak yapılır. Periferik sinir yaralanmasının en şiddetli formudur. Sinirin ve destek dokularının lazer uygulaması sonucu anatomik bütünlüğünün tamamen kaybolmasıdır. Cerrahi müdahale olmaksızın iyileşme mümkün değildir (Şekil 2.6).

Sunderland sınıflandırması

a) Birinci derece yaralanma

Seddon'un nöropraksia kategorisindeki özelliklerle aynı özellikleri taşımaktadır. Rejenerasyon sonucunda eski haline gelebilmektedir.

b) İkinci derece yaralanma

Bağ dokusu kılıf yapıları sağlam olmasına karşın aksonal bütünlük kesintiye uğramıştır. Seddon sınıflandırmasında aksonotmezisde yer alan bir hasar derecesidir. Distal segmentte WD gelişir.

c) Üçüncü derece yaralanma

Bu yaralanma da aksonotmezis kategorisinde değerlendirilmesine rağmen 2. derece yaralanmayla kıyaslandığında daha ciddi bir yaralanma olduğu gözlenir. Schwann hücre kılıfı, endonörium ve akson devamlılığı bozulmuştur. Akson distalinde WD ve endonöral fibrozis oluşmaktadır.

d) Dördüncü derece yaralanma

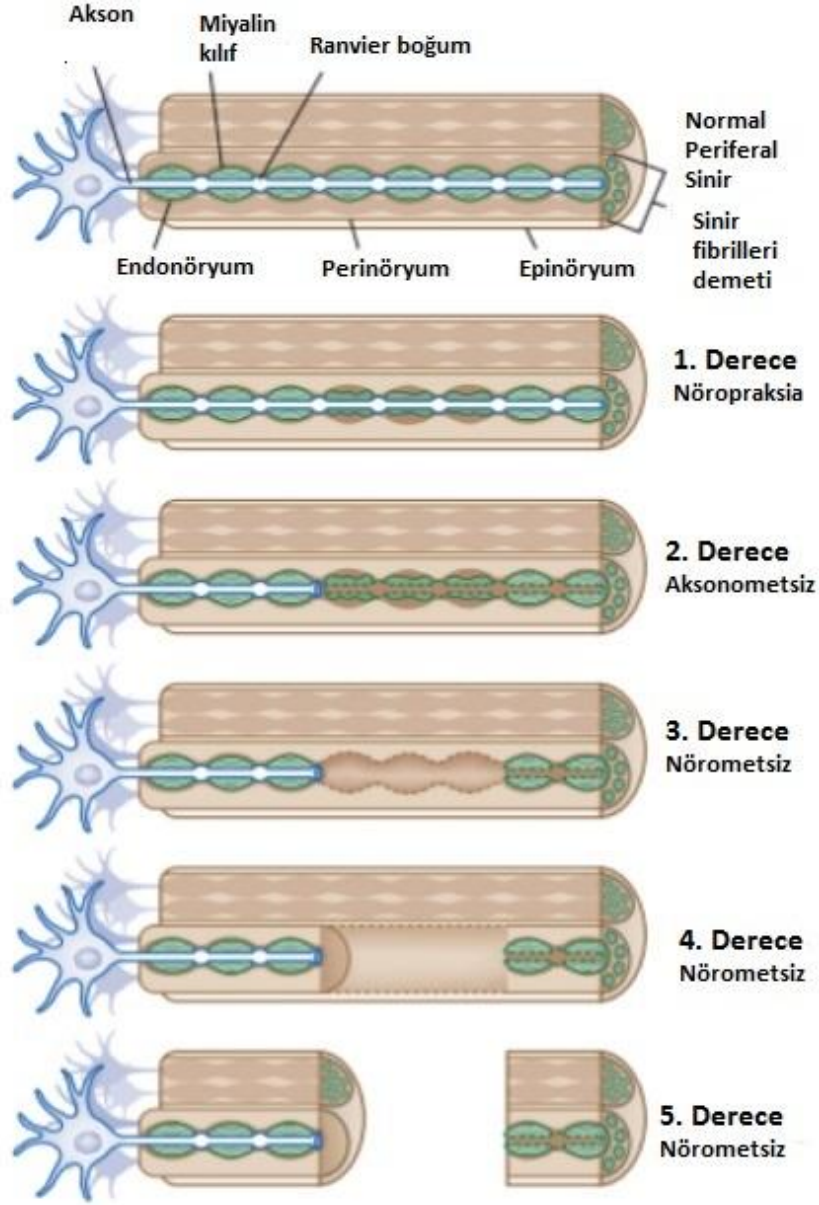
Epinörium dışındaki tüm tabakaların devamlılığı bozulmuştur. Fiziksel olarak sinir bütünlüğü devam etmekle birlikte, oluşacak skar dokusunun yaratacağı blok, sinir rejenerasyonunu engeller ve hasar bölgesinde nöroma oluşumuna neden olur. Aksonotmezis kategorisinde en ağır derece olarak değerlendirilir. Skar dokusu kaldırılmadan iyileşme mümkün değildir.

e) Beşinci derece yaralanma

Seddon'un Nörotmezis kategorisiyle uyum göstermektedir. Epinöral kılıf yaralanmasını da içeren, sinir devamlılığının tamamen ortadan kalktığı, cerrahi onarım yapılmadan iyileşmenin mümkün olmadığı çok ciddi yaralanmalardır.

f) Altıncı derece yaralanma

Yaygın bir şekilde kabul edilmemiş olmasına rağmen 3. ve 5. derece yaralanmaların aynı nöron üzerindeki kombinasyonunu ifade etmek için kullanılmıştır. Bazı liflerdeki ileti blokları ve akson kaybının beraber görülmesi ile oluşur. Periferik sinir içindeki tüm yapılarda çeşitli seviyelerde meydana gelen derecelendirmesi ve tedavisi çok zor olan hasar olarak tanımlanmıştır. Özellikle ezilme tipi yaralanmalarda ortaya çıkmaktadır.



Şekil 6. Sinir travma sınıflandırması (Tsao ve ark., 2006).

2. 3. Hücre Gövdesinin Dejenerasyona Yanıtı

Protein ve mRNA sentezinde belirgin bir artış olması hücre gövdesinin dejenerasyona yanıtını ifade eden en önemli göstergedir. Gen ekspresyonu, hücrenin aksonal rejenerasyonu desteklemeye geçmeye başladığının en tipik işaretidir. Nöronlar poliribozomları endoplazmik retikulumdan ayırarak kromatolize olurlar. Hasar sonrasında aksondan gövdeye hasar sinyalleri gönderilmektedir. Gönderilen sinyaller Ca^{+2} iyonlarının hücreye girişiyle gerçekleşen erken sinyaller ve retrograd taşımayla gerçekleşen geç sinyaller olarak ikiye ayrılabilir (Ambron ve ark.,1996).

Erken sinyalde hasar bölgesinde hızlı bir Ca^{+2} iyonu artışı gözlenir ve bu sinyal gövdeye doğru gidildikçe artar (Ziv ve Spira 1995). Ca^{+2} iyonundaki bu artışın membran kapanması ve büyüme konisinin oluşumunda yararlı etkileri vardır (Mills, L.R., 1991). Ca^{+2} iyon seviyesi rejenerasyonda önemli bir rol oynayan JUN ve FOS genlerinin erken aktivasyonundan sorumlu olabilir (West ve Greenber, 2011). Sinir hasarını takiben retrograt taşınımının arttığı geç sinyallerde adaptör moleküllerinin aktivasyonu veya ekspresyonu artmaktadır. Bu moleküller transkripsiyon faktörlerinin dynein motor proteinlerine eklenmelerini kolaylaştırmaktadır (Byrd ve ark., 2001; Cavalli ve ark., 2005). Hasar sonrası retrograt taşınımının arttığı adaptör moleküllerden biri JIP3'tür (Cavalli ve ark., 2005). Başka bir molekül ise importin ailesi proteinlerinden importin- β 1'dir (Hanz ve ark., 2003) ve bu proteinin taşınımı hasara yanıt veren hücre gövdesinde genlerin yarısından fazlasının değişimine etki eder (Perry ve ark., 2012). JIP3 ve importin- β 1 dışında STAT3 aktivasyonu (Qui va ark., 2005) bir de DLK kısıtlanmasının retrograt hasar sinyali olarak ifade edilebileceği gösterilmiştir (Shin ve ark., 2012). Aksotomi hasarı gerçekleşmiş periferik sinir hücrelerinin protein üretimi, distal bölgede schwann hücreleri ile büyüme konileri arasındaki etkileşimi ve rejenerasyon hedefli bir çevre oluşturma açısından önem taşır (Fenrich ve Gordon, 2004).

2. 4. Periferik Sinir Rejenerasyonu

2. 4. 1. Büyüme konisinin yapısı ve rejenerasyona etkisi

Büyüme konisi ilk olarak 1909 yılında Santiago Ramón Cajal tarafından ele alınmıştır. Büyüme konisi aksonal ve dentritik kısımların uzayan bölümleridir. Işık mikroskopunda büyüme konisinin temel iki kompartmandan oluştuğu gözlenmiştir. Bunlardan P Bölgesi lamellipod ve filopodların bulunduğu geniş bir düz alandır. İki tip membran çıkıntısı dallanmış aktin filamentleri ve uzun paralel aktin filament demetlerinden bir ağ içermektedir. C Bölgesi P Bölgesinin ardında kalan ve akson uzantısına bağlanan kısımdır. Bu bölge mitokondri ve ekzositotik veziküller gibi hücresel organeller tarafından zenginleşmiştir. Ayrıca sık bir mikrotübül ağı bulundurmakta böylece en önemli görevi olan büyüme konisinin hareketini desteklemekte ve membran organellerinin taşınımını sağlamaktadır. Bu mikrotübüllerin büyük bir bölümü C Bölgesinde sonlanır küçük bir bölümü aktin ve hücre sinyal

molekülleriyle etkileşime girdikleri P Bölgesine geçiş yaparlar. Yüksek çözünürlüklü görüntü çalışmalarıyla beraber büyüme konisinin üçüncü bir bölgesi olduğu gösterilmiş ve bu bölgeye Geçiş Zonu (T Zonu) denilmiştir (Lowery ve Van Vactor, 2009). T zonunun P ve C bölgeleri arasında kaldığı ve Aktin ile miyozin yapılarının her ikisinde düzenlenmesinde rol oynayan aktomyozin kontraktıl yapılarını içerdiği düşünülmektedir. Bu içeriğiyle birlikte T zonu, P bölgesinde aktin geri akımını sağlarken C bölgesinde ise mikrotübül kafes lokasyonunu sabitlemektedir (Burnette ve ark., 2008).

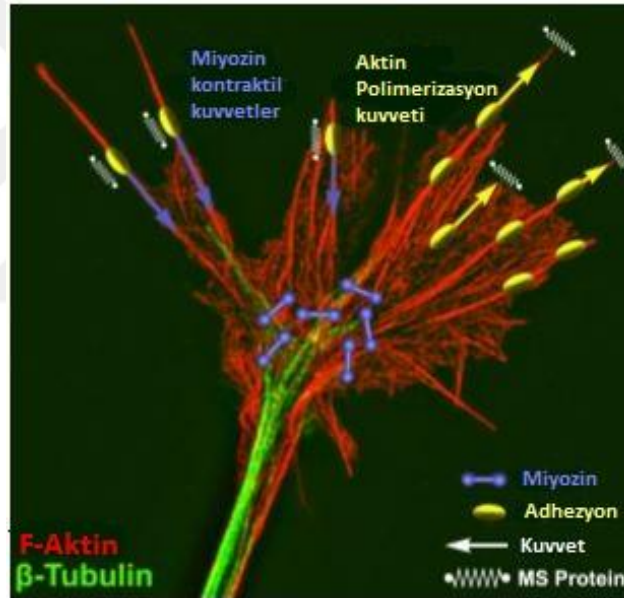
a) Büyüme konisinde aktin fibrillerinin rolü

Aktin, aksonal ve dentritik uzamaya öncülük eder; belirli adezyon molekülleriyle birleşerek ekstraselüler komponentlerin ileriye yönelik hareket gücünü oluşturmalarını sağlar (Şekil 2. 7). Plazma membranı yakınındaki aktin polimerizasyonu, miyozin temelli aktin retrograt akımı ve adhezyon substratıyla aktin grubunun seçici etkileşimi kombinasyonunun büyüme konisini ileri yürüttüğü düşünülmektedir (Lowery ve Van Vactor, 2009). Aktin iskeleti birçok sinyal molekülü tarafından hedeflenmektedir. Rho-ailesi GTPaz' ları aktin dinamiklerinin oluşması amacıyla ekstraselüler sinyallerin bağlanması için bir anahtar deliğini temsil eder (Burridge ve Wennerberg, 2004). Aktin filamentlerinin sivri uçlarda veya belirli bölgelerde hangi oranlarda bulduklarını geniş bir yelpazedeki düzenleyici proteinler ve çok sayıdaki aksesuar proteinler organize ederler (Pollard ve Borrisy, 2003). Öncü sınır çıkıntıları olan lamellipod ve filopodlar önemli ölçüde F-aktin polimerizasyonu etkinliğinde gerçekleşmektedir (Symons ve Mitchison, 1991). F-aktin fibrilleri büyüme konisinde merkeze doğru mekanik bir güç oluşturması açısından önemlidir. F-aktin gibi mekanik güç oluşturan ikinci bir madde ise Miyozin-II motor dimerleridir ve merkeze yönelik F-aktin ağının tersi yönünde etki ederler (Yang ve ark., 2013). Bunlar büyüme konisi hareketi ve morfoloji ile vezikül trafiğine katkıda bulunurlar.

b) Büyüme konisinde mikrotübüllerin fonksiyonu

Mikrotübüller 13 protofilamentten meydana gelirler ve silindir şeklindedirler. Mikrotübüllerin baş ve kuyruk kısmı α ve β -tübülünlerin polimeridir, her iki kısım da polarizedir. α -tübülün bölgeleri negatif kısımdır, kapatılarak hücre içinde stabilize edilir

(Dammerman ve ark., 2003). Mikrotübüllerin çoğu sentrozomlarda polimerize olur fakat akson veya dendritik uzantılar üzerinde bölünür, salınır ve taşınır. En önemli özellikleri sinir hücresinin hayati fonksiyonları için önemli olan organel veya paketlerin uzak bölgelere taşınmasında aracılık yapmalarıdır. Çok yüksek oranda bulunan Mikrotübül-bağlı proteinler (MAPs) mikrotübüllerin polarizasyonu, depolarizasyonu, stabilizasyonu, etkileşimi, parçalanması ve taşınımını düzenlerler (Hirokawa ve ark., 2010). Özellikle pozitif-uç taşıyıcı proteinlerin (+TIPs) etkin oldukları gösterilmiştir. Bu proteinler dışında depolarizasyonu sağlayarak mikrotübüllerin negatif etkisi ortaya konmuş olan KIF2 ve son zamanlarda çalışılmış olan daha kısa fragmantları oluşturmak için mikrotübülleri bölen katanin ve spastin gibi proteinler ortaya konulmuştur (Roll-Mecak ve McNally, 2010).



Şekil 7. Büyüme konisine etkiyen kuvvetler (Santiago-Medina ve ark., 2015)

c) Adezyon molekülleri

Adezyon molekülleri kaba tabiriyle sabit sıvılar içindeki protein yapılarıdır, bunlar tutucu güç oluşturmaktadır. Adezyon molekülleri integrinler, kadherin ve imminoglobulin süper ailesi (Ig SF) üyelerini de içeren birçok farklı reseptörden gelebilir. Küçük noktalar halinde görünürler ve temas geçilen yerler olarak gözlenirler. Kadherin ve Ig SF molekülleri komşu hücrelerin yüzeylerinde salgılanan moleküllere homofilik olarak bağlanırlarken integrin ligandları ekstraselüler matrikste yer alır

(Kolodkin ve Tessier-Lavigne, 2011). Bir de ekstraselüler matriks içeriğindeki laminin, tenascin, fibronectin gibi ligandlar her biri ayrı integrin proteinini aktive ederek etki ederler (Myers ve ark., 2011). Yeni oluşan çıkıntılarda aktin primerlerini polimerize eder ve aktivasyon için integrinleri belirli pozisyonlara getirirler (Chan ve Odde 2008). Her bir adhezyon molekülü yüzey reseptörleri içerir ve temas noktasında dönüşüm geçirirler. Adhezyon moleküllerinin fonksiyonları tutma modeliyle açıklanmaktadır. Bu modele göre moleküller aktin ile birleşerek retrograd akıma girmektedirler, böylece mekanik direnç sağlanır ve plazma membranının ileri yönlü hareketi gerçekleşir. Oluşan güce veya itime yanıt olarak hücreler mekanosensitif proteinler eksprese ederler. Bu proteinler konformasyonel değişikliklere uğrayarak enzim aktivasyonu, iyon kapıları ve protein-protein interaksyonuna etki ederler. Bu proteinlerden en çok üzerinde çalışılmış olanı Fokal adhezyon kinaz (FAK)'dır. FAK hücreler arası sinyal yolları ile adhezyonlar arasında direkt bağlantı sağlayan protein-tirozin kinazdır (Parsons, 2003) ve sitoskeleti düzenlemek açısından önemli olan serin ile tirozin fosforilasyon bölgelerini bulundurur (Ma ve ark., 2001). Bu mekanosensitif protein dışında bir de adhezyon molekülleri içindeki P130 Cas, talin, flamin gibi yapısal proteinler de mekanosensör gibi hareket edebilirler. Talin fonksiyonunun durdurulması filopodial dinamiklerin değişimi ve büyüme konisinin oluşumuna etki eder (Sydor ve ark., 1996).

d) Ca^{+2} davranışıyla büyüme konisinin düzenlenmesi

İlk olarak Schubert ve arkadaşları (1978) nörit uzatma mekanizmasında Ca^{+2} iyonlarının etkisini çalışmışlardır, intraselüler Ca^{+2} seviyesinin büyüme konisi ve nörit büyümesinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüş, daha sonraki çalışmalarda medyuma Ca^{+2} kanal blokörü eklenmiş ve bu durumda nörit büyümesinin inhibe olduğu gözlemlenmiştir (Nishi ve Berg 1981; Suarez-Isla ve ark., 1984). Kanal blokörleri ya da ekstraselüler ortamdan Ca^{+2} iyonlarının uzaklaştırılmasıyla iyon seviyesi azaltıldığında bir saate kadar geçen sürede hücrelerin intraselüler stoklarını kullandığı ve Ca^{+2} bağımlı mekanizmalarla nörit uzatımının düzenlendiği gözlenmiştir (Kater ve ark., 1988). 1991 yılında yapılan bir çalışma ile büyüme konisinin 200 nM altı ve 300 nM üstü Ca^{+2} konsantrasyon seviyelerine karşı hassasiyet gösterdiği bulunmuştur (Lamkford ve Letouneau, 1991). Yapılan çalışmalarla birlikte Ca^{+2} iyon kanallarının büyüme konisinde yoğunluk göstermesi ve Ca^{+2} iyon bağlı mekanizmalarla iyon

seviyesini kontrol altında tuttuğu ortaya çıkmaktadır. Mekanosensitif kanallar Ca^{+2} iyon seviyesine direkt etki ederek hücre göçü ve büyüme konisinin varlığına etki eder (Franze ve ark., 2009). Bu çalışmalardan farklı olarak hücrenin elektriksel aktivasyonunun nörit büyümesini inhibe ederken stümulasyonun düzenli devamlılığıyla beraber nörit büyüme seviyesinin normal haline geri döndüğü gösterilmiştir (Fields ve ark., 1990).

e) Büyüme konisinde membran hareketleri

Büyüyen aksonda membran trafiği, uzama, dönme, durma hareketleri ekzositoz ve endositoz aracılığıyla gerçekleşir. Endositoz, membran integrin itici büyüme gücü için (Tojima ve ark., 2010), ekzositoz ise akson dönüşü ve dallanmasının artışı için önemlidir (Tojima ve ark., 2011). Meydana gelen membran hareketliliği ile birlikte adhezyon molekülleri, sinyal proteinleri, lipid düzenleyiciler ve reseptörlerin taşınımı ile özümsemesi de meydana gelir (Bloom ve Morgan, 2011). Membran hareketleri nörit büyümesini sınırlandırıp yönlendiren bir fiziksel güç gibi çalışır (Meldolesi, 2011). Membran genişlemesinin büyük bir bölümü ekzositoz ile sağlanır. Plazmalemma preküsör vezikülleri (PPVs) ve enlargosomlar gibi büyük ekzositik veziküller hücre gövdesinde salındıktan sonra aktifleşecekleri C bölgesine mikrotübüller aracılığıyla taşınırlar (Pfenninger ve ark., 2003). Büyüme konisinin belirli bir bölgesine eklenti olmasıyla beraber başka bir kısımda da endositoz başlayabilir veya aktifleştirilebilir. Endositozun bu iki farklı görülme şekli farklı türde veziküller tarafından ortaya çıkarılır (Diefenbach ve ark., 1999). Büyüyen aksonlarda bütün endositoz meydana gelmektedir ve meydana gelen bütün sıvı faz endositoz nörit uzama hızı ile iş birliği içinde olup büyümenin erken döneminde daha açık bir şekilde gözlenmiştir (Bonanomi ve ark., 2008). Büyüme konisinde itici sinyal olduğu süre içerisinde ise asimetric sıvı faz endositozun meydana geldiği ortaya konulmuştur (Kolpak ve ark., 2009). Aktifleştirilmiş endositoz ise akson uzamasının pozitif ve negatif sinyallerinin her ikisiyle de ilişkilidir, membran özümsemesi ve geri dönüşümüyle gerçekleştirilir (Tojima ve ark., 2011). Aktifleştirilmiş endositozun bilinen bir markörü membran depolimerizasyonunu takiben aktifleştirilmiş olan endozomların büyüme konisinden serbest bırakılmasıdır (Diefenbach ve ark., 1999).

2. 4. 2. Sinir rejenerasyonunda immün hücrelerin rolü

Mast hücreleri, nötrofiller, makrofajlar ve T hücreleri periferik sinir hasarı sonrasında rejenerasyonda etkili olan inflamatuvar hücrelerdir.

a) Mast hücreleri

Sinir dokuda hâlihazırda bir mast hücreleri topluluğu bulunmaktadır. Bu hücreler hasar bölgesinde degranülize olurlar ve bu granüller aracılığıyla da nöronları aktive eder ya da duyarlı hale getirirler. Yine hasar bölgesinde aktive olarak salgıladıkları aracı proteinlerle nötrofil ve makrofajların hasar bölgesine taşınmalarına katkıda bulunurlar (Moalem ve Tracy, 2005).

b) Nötrofiller

Nötrofiller dolaşımdan hasarlı bölgeye gelen ilk inflamatuvar hücrelerdir. Periferik sinir hasarı sonrası ilk 8 saat içinde sayıları artmaya başlar ve 24 saat içinde nötrofil sayısı pik noktaya ulaşır. Stoplazmalarında granüller ve salgı vezikülleri bulundurulur. Nötrofiller barındırdıkları veziküllerin, bakteriyosidal protein ve sitokinleri, proteinaz ve reaktif oksijen moleküllerini salgılamasıyla hasar bölgesine etki ederler (Moalem ve Tracy, 2005). Bölgedeki kalıntıları fagosite eder, buradaki sirkülasyonu düzenler ve özellikle monositleri Wallerian dejenerasyonu sırasında aktive ederler (Gaudet ve ark., 2011).

c) Makrofajlar

Makrofajların sayısal artışı, aktifleşmeleri ve fagositik etkileri hasardan 2 gün sonra başlar. Hasar bölgesinde yabancı partikülleri fagosite eder ve hasarlı ya da ölmüş olan dokuyu uzaklaştırırlar. Yüzey proteinleri aracılığıyla, antijenleri kontrol altında tutar ve schwann hücreleriyle iş birliği yaparak monositlerin hasarlı bölgeye taşınmasını sağlar (Gaudet ve ark., 2011).

d) Lenfositler

Periferik sinir hasarında bölgeye en son gelen hücreler T lenfositlerdir. Hasar sonrası 14-28 gün arasında bölgedeki en yüksek sayısal değere ulaşırlar ve immün

yanıtın bir sonraki adımını şekillendirerek rejenerasyona katkıda bulunurlar. T lenfositler, ürettiği birtakım sitokinler yardımıyla makrofaj fonksiyonlarını durdurabilir veya bu fonksiyonların devam etmelerini sağlayabilirler (Moalem ve ark., 2004).

2. 4. 3. Sinir rejenerasyonunda sitokinlerin rolü

Sitokinler ve sitokinlerin bir alt grubu olan kemokinler nöral homeostazisi düzenlemek için stres sonrası salınımları hızlı bir şekilde artırılarak etki ederler. Nöronlar ve glial hücreler tarafından üretilirler. İmmün hücrelerde de belirli bir ölçüde bulunur ve bu hücreler aracılığıyla taşınırlar. Sitokinler ve kemokinler karşıt etkili özelliklere sahip olabilirler. Bu özellikleri inflamatuvar yanıtın derecesi ve zamanıyla bağlantılı olarak ortaya çıkar. Bu bağlamda miktarlarındaki artış zamansal olarak ikiye ayrılabilir. İlk olarak Waller dejenerasyonunun başlangıcında schwann hücreleri tarafından üretilen sitokinler büyük ölçüde demiyelinizasyon ve makrofaj dolaşımı ile ilişkilidirler. Schwann hücrelerinin farklılaşarak olgunlaşmamış forma dönüşmeleri ile birlikte yapılarında bulunan Büngner bantları bu hücrelerin ürettiği sitokinler, adhezyon molekülleri ve nörotrofik faktörlerin kaynağıdır. Sitokin miktarının en yüksek dereceye ulaştığı ikinci zamansal ayırım ise inflamatuvar yanıtın sonlandırılmasıyla ilişkilidir (Dubovy ve ark., 2013).

a) IL-1 Ailesi Üyesi Sitokinler

IL-1 ailesi sitokinlerinin rolü, enfeksiyon ve hasar sonrası inflamatuvar yanıtın düzenlenmesini başlatmaktır. Bu grupta 11 sitokin bulunmaktadır. İlk tanımlanan sitokinler %30 civarında homoloji gösteren IL-1 α ve IL-1 β ' dir (Bastien ve Lacroix, 2014).

IL-1 α , hasar sonrası 5-6 saat içerisinde schwann hücreleri tarafından sentezlenir. Proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu düzenler, lökosit dağılımı, apoptozis ve nekrozis üzerinde etkinliği vardır. IL-1 β ise proinflamatuvar sitokindir. Olgunlaşmamış schwann hücreleri tarafından üretilir. Hasar sonrası ilk 5-10 saat içerisinde salgılanmaya başlar ve schwann hücrelerinin remiyelinasyona başlamasıyla kaybolurlar. TNF- α ile birlikte aktive ettikleri yolak aracılığıyla kan sinir bariyerini zayıflatarak monositlerin damar dışına çıkışı ve göçüne katkıda bulunurlar. Schwann hücrelerinin başlangıçtaki

miyelin yıkımını tetikler, NGF sentezini düzenler ve NT-3 ile sinerjik olarak nörit büyümesini desteklerler (Dubovy ve ark., 2013; Defrancesco-Lisowitz ve ark., 2015).

IL-6 proinflamatuvar sitokindir. Nötrofil ve makrofajların dağılımını kemokin salınımıyla düzenler (Bastien ve Lacroix, 2014). Sinir hasarına karşı ortaya çıkan nöral ve immün yanıtlar için anahtar niteliğinde olduğu düşünülmektedir. IL-6, nöronlardan az seviyede schwann hücrelerinde ise yüksek seviyede salınır. Önce kendi reseptörü olan IL-6R ile birleşir daha sonra nörotrofik sitokinlerin reseptörü olan gp-130 ile bir kompleks molekül oluşturur. Bu kompleks moleküller sinyal dönüştürücü etkiye sahiptir ve hücrenin rejenerasyon için gerekli genlerini ifade etmesini sağlar. IL-6'nın sitokin sinyal baskılayıcı protein 3 (SOCS3) proteini aracılığıyla salınımı inhibe edilir böylece zarar verici inflamatuvar etkisi engellenmiş olur (Dubovy ve ark., 2013).

IL-18, bazı sitokinlerin üretimini düzenleyerek rejenerasyona katkıda bulunur. Örneğin anti inflamatuvar etki gösteren IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin üretimini tetikler ve bu iki sitokinin üretimi alternatif olarak aktive olan makrofajların varlığıyla sonuçlanır (Dubovy ve ark., 2013; Bastien ve Lacroix, 2014).

b) Tümör nekroz faktör α (TNF- α) ailesi

Waller dejenerasyonunun erken safhalarında schwann hücrelerinin aktivasyonu, miyelin degradasyonu, fagositozu ve makrofaj dolaşımı üzerinde etkindir. TNF- α , fibroblast artışını destekleyip nörom oluşumuna sebebiyet verme ya da kompleks yapı oluşturup apoptoz veya programlı nekrozisi tetikleme gibi fonksiyonlarıyla dejeneratif bir etki gösterebilirken, doku hasarını ve demiyelinasyonu azaltarak ya da oluşturduğu başka bir kompleks yapının anti-apoptotik proteinlerin salınımını arttırmasıyla nöroprotektif etki gösterebilir (Dubovy ve ark., 2013; Bastien ve Lacroix, 2014).

c) Nörotrofik sitokin ailesi

Bu grup CNTF ve LIF gibi çok önemli sitokinleri içermektedir. Sinyal dönüştürücü etkilere sahiptirler. Hasar sonrası hücrenin hem distal hem de proksimal

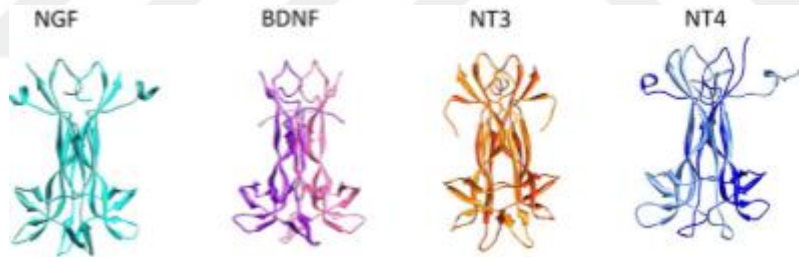
bölgesinde LIF ekspresyonu ve retrograd taşınımı artar. LIF aksondaki uzamaya destek olurken aksonda dallanmayı engeller (Dubovy ve ark., 2013).

d) IL-10 sitokin ailesi

En önemli özellikleri proinflamatuvar sitokinlerin negatif düzenlenmelerine katkıda bulunmalarıdır. Hasar sonrası altı hafta içinde IL-10' un sayısal artışı gözlenir. Bu artışla beraber makrofaj dağılımı ve TNF salgılanmasını baskılar (Moalem ve Tracey, 2005).

2. 4. 4. Sinir rejenerasyonunda nörotrofik faktörlerin etkinliği

Sinir rejenerasyonuna etki eden faktörlerden en önemlisi Nörotrofin ailesi olarak adlandırılan NGF, BDNF, NT-3 ve NT-4'tür. Bu faktörler sinir hücresi döngüsünde belirli zamanlarda aktivasyonlarını arttırmalarının yanı sıra hasar gören hücrelerde de belirli oranda aktivasyon ve seviyelerinde artış meydana gelir.

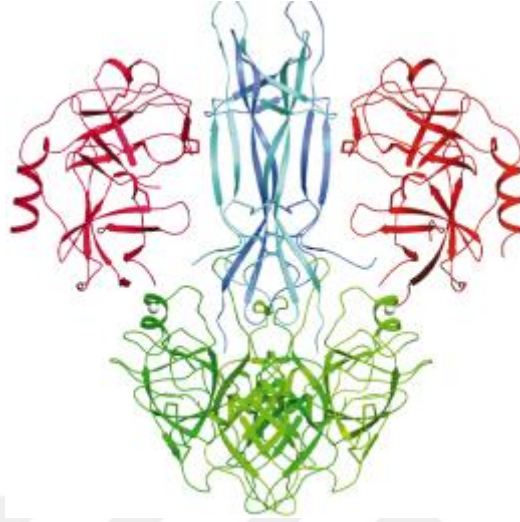


Şekil 8. Nörotrofinlerin x-ray kristalize yapısı (Allen ve ark., 2013).

a) Sinir büyüme faktörü (NGF)

İlk olarak erkek fare tükürük bezinden elde edilmiş olan NGF, sempatik nöronlar ve primer duyu nöronları için spesifiktir. Daha sonraki çalışmalarda merkezi sinir sistemi, endokrin sistem ve bağışıklık sisteminde karakterize edilmiştir. Olgun aktif formu prekürsör NGF (Pro NGF) formunun ayrışmasıyla türeyen (Fahnestock ve ark., 2004) 26 kDa ağırlığında, homodimerik bir polipeptittir. NGF' in aktif formu β -NGF olarak bilinmektedir. β -NGF' in iki α -NGF alt ünitesi ve iki γ -NGF alt ünitesi ile bileşimi ise yüksek moleküler ağırlıklı 7S NGF olarak tanımlanmıştır (Şekil 2. 9). Bu iki

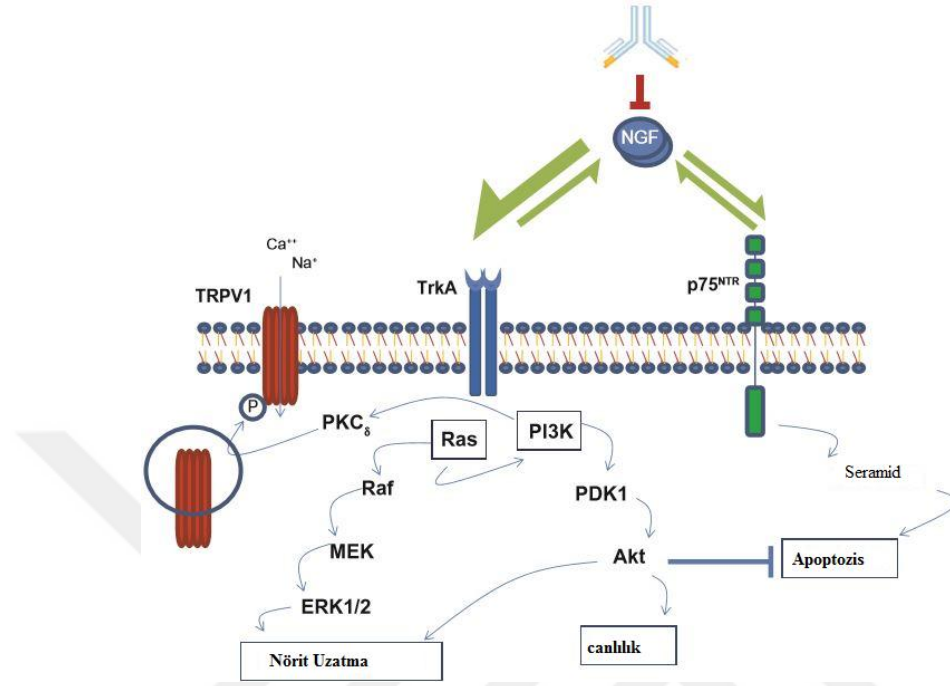
alt ünitelerden γ -NGF alt ünitesi aktif bölge iken α -NGF alt ünitesi pasiftir (Minnone ve ark., 2017).



Şekil 9. NGF alt ünitelerinin etkileşimi. Merkezdeki açık mavi ve koyu mavi ile görünen bölgeler β -NGF dimerlerini ifade ederken, kırmızı olanlar α -NGF ve yeşil olanlar ise γ -NGF alt ünitelerini göstermektedir (Evans, 1993).

NGF farklı nöron popülasyonlarını hem gelişim döneminde hem de erişkin dönemde fenotipik ve fonksiyonel karakterlerini devam ettirmeleri için destekler. NGF geriye kalan nörotrofinler için bir prototip olarak kabul edilir. Farklı tür ve dokulardan birçok NGF varyasyonu elde edilmiştir. Periferik sinir sisteminde genel olarak schwann hücreleri tarafından salgılanan NGF endotel hücreleri gibi farklı hücrelerde de salgılanarak otokrin etkiyle kardiyovasküler sisteme de etki etmektedir (Lazarovici ve ark., 2006). Nöron gövdesine retrograd olarak taşınan NGF, biyolojik aktivitesini kendisine spesifik olan tropomiyozin kinaz reseptör A (TrkA)' ya bağlanarak ortaya çıkarır (Huang ve Reichardt, 2003). TrkA ile aktifleşen sitozolik ve endozomal temel yollar mevcuttur (Klesse ve Parada, 1999; Reichardt, 2006). Biyolojik aktivitesini göstermek için kullandığı başka bir yol ise pan-nörotrofin reseptör ($P75^{NTR}$)' ye düşük afinite ile bağlanmasıdır. $P75^{NTR}$ TrkA yokluğunda hücreyi apoptozis yoluyla ölüme götüren ek sinyal yollarını aktive eder (Friedman ve Green, 1999). NGF üretiminin artmasının bir diğer etkisi de inflamatuvar ağrı ile ilişkilidir (Şekil 2.10). NGF *transient*

receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) kanalları ve sodyum kanallarının genetik ifadesini başlatarak ağrı ile ilişkilendir (Minnone ve ark., 2017).



Şekil 10. NGF sinyal yolları (Kumar ve Mahal, 2012).

NGF dinamik olarak nörotransmitter ve nöropeptid sentezini kontrol eder. Sempatik nöronlarda epinefrin üretimi, DKG P Maddesi (SP) gibi nöropeptidlerin ekspresyonu ve primer duysal nöronların aracılığıyla kalsitonin gen-ilişkili peptidin (CGRP) ekspresyonu NGF tarafından düzenlenir (Mearow ve Kril, 1995). Nöronlar haricinde immün -hematopoetik sistem hücreleri de NGF üretir ve bundan faydalanır (Bonini ve ark., 1999). NGF hematopoetik kök hücreler (Auffray ve ark., 1996), granüositler (Bischoff ve Dahinden, 1992), lenfositler ve monositlerin (Bracci-Laudiero ve ark., 2005; Noga ve ark., 2007) fenotipik, farklılaşma ve/veya yaşamsal özelliklerini etkilemektedir.

Periferik nöropatide bağlı olan dokular tarafından üretilip salınır, sinir terminalinde ekspresye edilen spesifik reseptörlerle tutulur ve nöron gövdesine retrograd olarak taşınır (Mendell LM, 1999). NGF uygulanması sonucunda aksotomiden sonra görülen santral kromatoliz ve hasarlı nöron ölümünde azalma, protein sentezi, fosforilasyonu ve kollateral lif tomurcuklanmasında artış saptanmıştır (Zhuk ve ark.,

1997). Sıçan siyatik sinirinde yapılan çalışmada, kontrollü NGF serbestlenmesinin aksonal rejenerasyonu doz bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür (Lee ve ark., 2003).

NGF'in etkileri diyabet, immün defansif viral hastalıklar, deri ülseri retinal gangliyon hücreleri gibi sinir sisteminin etkilendiği birçok hastalık ve ağrı üzerinde de çalışılmıştır (Aloe ve ark., 2015).

b) Beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF)

İlk kez 1982 yılında bulunmuş olan 120 aminoasitli bir polipeptittir. Hasar sonrası schwann hücreleri ve duysal nöronlar tarafından BDNF sentezinde ve anterograd taşınmasında artış görülür (Moalem ve Tracey, 2005). TrkB' ye bağlanarak aktif etki gösterir. Yalnız NT-4'te bazı durumlarda TrkB' ye bağlanarak BDNF' nin yerine geçebilir (Erickson ve ark., 1996). Duysal reseptörlerin düşük eşik hassasiyetinin düzenlenmesine yardımcı olur, mekanoreseptör tipI' i yavaşça adapte eder (Carrol ve ark., 1998). Periferik hasara yanıtın bir bölümünde NGF' in nosiseptörlerdeki (ağrı reseptörleri) ekspresyonunu düzenlemek, BDNF' nin bir başka özelliğidir (Zhao ve ark., 2006).

c) Nörotrofin-3 (NT-3)

NGF ile yapısal benzerlik gösterir ve 119 aminoasitli dimerik yapılı bir polipeptittir (Lamballe ve ark., 1990). Yüksek afinite ile trkC reseptörüne ve düşük afinite ile P75 reseptörüne bağlanır. TrkC Grup Ia kas içcikleri tarafından ekspresse edilir (Huang ve Reichardt, 2001). Gelişimin geç evrelerinde motor nöron yaşayabilirliği üzerine güçlü etkileri vardır (Chen ve ark., 2003). Ayrıca periferik sinir rejenerasyonunda sınırlı düzeyde etkilidir (Mendell ve ark., 1999).

d) Nörotrofin-4/5 (NT-4/5)

NGF ile yapısal benzerlik gösteren, 130 aminoasitli dimerik bir polipeptittir ve ilk olarak 1991 yılında tanımlanmıştır (Berkemier ve ark., 1991). Yüksek afinite ile trkB reseptörlerine bağlanır (Klein ve ark., 1991). NT-4 D-Hair mekanoreseptörlerinin hassasiyetini düzenler (Hilaire ve ark., 2012). Motor nöron yaşayabilirliği için güçlü

destekleyici etkilerinin olduğu ve motor nöronların iskelet kası innervasyon kapasitelerini arttırdığı saptanmıştır (Yin ve ark., 1998).

2. 5. Aslan Yelesi Mantarı

Doğada, *Hericium erinaceus* (HE), yaşlı eski kütükler, kesilmiş ağaç parçaları ve canlı ağaçların yaraları üzerinde meydana gelir. Şapka, çok sayıda küçük püskül ile örtülü büyük beyaz bir küme şeklinde oluşur. Dokusu seyrek bir sünger şeklinde olup, dalsız ve yoğun veya dilimli kabarcık şeklindedir. Gençken beyaz renkli olan mantar tam olarak büyüdüğünde sarıya döner. Bazı tropikal bölgeler ve soğuk bölgeler dışında, Kore, Japonya, Çin, Güney Doğu Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika' da yetişir (Yew Keong ve ark., 2007).



Şekil 11. Aslan Yelesi Mantarı (Sabaratman ve ark., 2011).

2. 5. 1. Aslan yelesi mantarının özellikleri

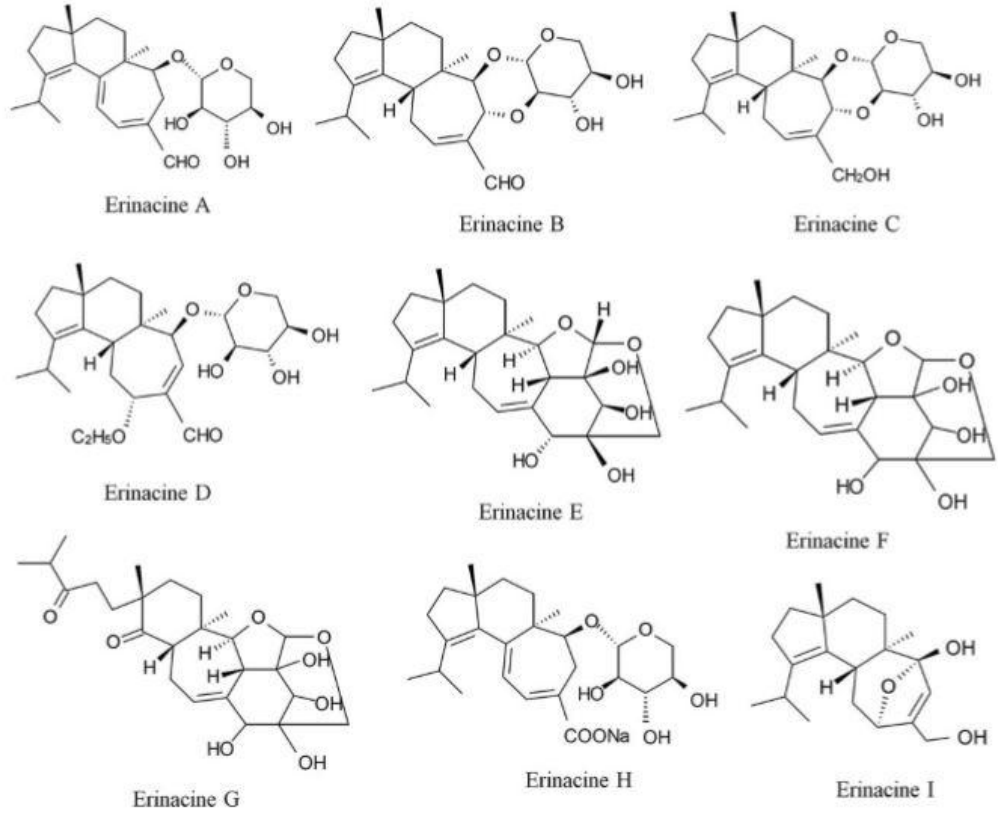
AYM Asya ülkelerinde geniş oranda gıda olarak kullanılmakla beraber gövde ve misellerinden elde edilen biyoaktif bileşenlerle de sağlık destekleyici özellik göstermektedir. Yapısında 5 farklı bileşen bulundurur: erinasin, aromatik bileşenler, steroidler, alkaloidler ve laktonlar.

a) Heriserinler

AYM' nin gövde ve misellerinden elde edilen aromatik bileşenlerdirler. Li ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla kloroform ekstraktından elde edilen 7 bileşik ortaya konmuştur (Li ve ark., 2014). Bunlardan en önemlileri isoserinler ve heriserinlerdir. Bu yedi bileşen dışında Miyazawa ve arkadaşları (2012) ile Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla D-arabiol esteri içeren iki yeni aromatik bileşen ve yeni bir diterpen tanımlanmıştır (Miyazawa ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2015).

b) Erinasinler

Erinasinler diterpenoidlerin keton tip grubunu temsil etmektedirler (Şekil 2.12). Tang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda 24 diterpenoitten 20 tanesinin aslan yelesi mantarında bulunduğunu göstermişler ve potansiyel nöroprotektif özellikleri olduğunu ifade etmişlerdir (Tang ve ark., 2015). Mantarın misellerinin etanol ekstraktı ile erinasin A izole edilmiştir (Lee ve ark., 2014).



Şekil 12. AYM gövde ve misellerinden izole edilen erinasinlerin kimyasal yapıları (Phan ve ark., 2017); İlk tanımlanan erinasinler A–I (Kawagashi ve ark.,1994; 1996; 2006 Lee ve ark., 2000); Erinasin P ve Q karakterizasyon (Kenmoku ve ark., 2000; 2002) ve erinasin R karakterizasyonu (Ma ve ark., 2008).

c) Erinaserinler

Burada ifade edilenler erinaserin- izondolin -1 olanlardır. Yapılan çalışmalarla aslan yelesi mantarından erinaserin C' den, erinaserin L' ye kadar adlandırılan 10 yeni erinaserin-izondolin-1 izole edilmiştir (Wang ve ark., 2015).

d) Erinaselaktonlar

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarla 3 yeni erinaselakton spektroskopik yöntemle izole edilmiştir (Wu ve ark., 2014).

e) Glikoproteinler

AYM' den yeni bir glikoprotein olan HE6-5 izole edilmiştir. Bu glikoproteinin hemaglutine edici aktivitesinin yanı sıra insan gastrik karsinomasını büyümesini inhibe edici özelliğinin olduğu da yapılan çalışmalarla vurgulanmıştır (Cui ve ark., 2014).

f) Polisakkaridler

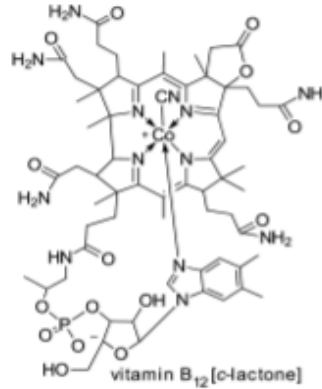
Aslan yelesi mantarı misellerinin etanolde çözünmesiyle çeşitli polisakkaridler izole edilmiştir. Bunlar biyorafineri gibi kullanılabilirler (Balan ve ark., 2008).

g) Steroller

Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarla aslan yelesi mantarının etanol ekstraktından 6 yeni sterol izole edildi. İzole edilen bu steroller Erinerol A ile Erinerol F arasında adlandırıldı (Li ve ark., 2001). Yapılan başka bir çalışma ile mantar misellerinde ergosterol bulundu (Avtonomova ve ark., 2011). Ergosteroller UVB' ye maruz kaldığında vitamin D' ye dönüştükleri için önemlidirler. Yine misellerin metanol ekstraktından daha önce tanımlanmış olan 5 ergostan-tip sterol yağ asidi ile 10 ergostan-tip sterol erinaroller (G-J) izole edildi. Bu izole edilen maddelerden bazılarının antiinflamatuvar ve antiproliferatif özellikleri olduğu ifade edildi (Li ve ark., 2014).

h) Vitamin B12 lakton

Biyolojik olarak inaktif B12 (c-Lakton) içermektedir. Lakton zincirinin kimyasal olarak açılması sağlanarak aktif B12 elde edilebilir (Teng ve ark., 2014).



Şekil 13. *Hericium erinaceus* gövde ve misellerinden elde edilen lakton (Wu ve ark., 2014 ve Teng ve ark., 2014).

i) Uçucu bileşenler

Bilinen yağların %87,6'sına tekabül eden 77 uçucu yağ izole edilmiştir (Miyazawa ve ark., 2008). Bu yağların birçoğu patojenik bakterileri inaktive etmektedir (Friedmen ve ark., 2003; 2002).

2. 5. 2. Aslan yelesi mantarının mineral organizasyonu ve gıda olarak kullanımı

Aslan yelesi mantarının gövdesinin kuru ağırlığı %28 protein, %61,1 karbonhidrat, %6,2 su ve 100 gramında 374 kcal enerji içermektedir (Cohen ve ark.,2014). Ayrıca mantar gövdesi ve misel biomasında farklı oranlarda makro ve mikro elementler (Kalsiyum, krom, kobalt, bakır, magnezyum, demir, manganez, fosfor, selenyum, sodyum, sülfür ve çinko) ile çok daha düşük miktarda toksik elementler (Aluminyum, arsenik, baryum, bor, kadmiyum, nikel, gümüş, strontiyum, kalay, titanyum ve vanadyum) bulunmaktadır.

Mantar gövdesinde yaklaşık olarak 42,9 µg, misellerinde ise yaklaşık 56 µg kadar γ-aminobutirik asit (GABA) bulunur. Mantarın ekmeğe içeriğine %5 oranında eklenmesinin beyin fonksiyonlarına etki ettiği ifade edilmiştir (Meyerhoff ve ark., 2014). Yine aslan yelesi mantarından elde edilen sirke gibi mayalanmış ürünlerin antioksidan olarak etki edebileceği (Li ve ark., 2014), bunun yanı sıra alkolsüz fermente içecek olarak veya pişirilerek gıda olarak alınmasının sağlığa faydalı olabileceği savunulmuştur (Woraharn ve ark., 2016; Lam ve Okello, 2015).

2. 5. 3. Aslan yelesi mantarının antibiyotik özelliği

Kawagashi ve arkadaşları metisilin dirençli *Stafilococcus aureus* (MRSA) bakterileri üzerinde yaptıkları çalışmada birkaç erinasinin bileşeninin anti-MRSA aktive edici özellik gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Kawagashi ve ark., 2006). Yine *Salmonella typhimurium* üzerinde yapılan çalışmada mantar ekstraktının in vitro çalışmalarda inaktive edici özelliği gözlenirken in vivo çalışmalarda fare üzerinde yapılan deneylerde aynı ekstraktın makrofajları aktive ederek tüm patojenlere karşı immün sistemi aktive ettiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2013).

2013 yılında *Helicobacter pylori* üzerinde yapılan bir çalışmada ise etanol ekstraktının düşük seviyede aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Shang ve ark., 2013).

Wong ve arkadaşlarının aslan yelesi mantarının özelliklerini tanımlamak için yaptıkları araştırmada ise çeşitli ekstrakt yöntemlerinin gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde inhibe edici özelliği olduğunu bulmuşlardır (Wong ve ark.,2009).

2. 5. 4. Aslan yelesi mantarının antikarsinojenik etkileri

İnsan karaciğer kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada aslan yelesi mantarının sıcak su ekstraktının bu hücreler üzerinde apoptotik sinyalleri arttırdığı ortaya konmuştur (Lee ve Hong, 2010). İzole edilmiş olan heriserin ve heriserin A' nın lösemi hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği yapılan bir çalışmayla ortaya konmuştur (Li ve ark., 2015). Kolon kanseri CT-26 hücreleri üzerinde dondurup kurutma tekniği ile elde edilen β -glukan içeriği yüksek bileşenin intraperitoneal uygulanması sonucunda %41'lik tümör kaybı gerçekleştiği görülmüştür (Kim ve ark., 2012). Aslan yelesi mantarının kurutulmuş gövdesinden elde edilen bir lektin olan aglutinin karaciğer ve meme kanserinde hücrelerin çoğalmasını engelleyici bir etki göstermiştir (Li ve ark., 2010).

2. 5. 5. Aslan yelesi mantarının nöroprotektif etkileri

Dejenere edilmiş fiokromositom (PC12) hücreleri üzerinde aslan yelesi mantarı gövdesinden elde edilen ekstraktın denenmesi sonucunda hücrelerin yaşama oranında artış ve laktat dehidrogenaz salınımında azalma gözlenmiştir (Lui ve ark., 2015). Yapılan başka bir çalışmada ise nörorejeneratif etkinliği olan NGF serbestlenmesinin erinasin A, B ve C uygulanmasıyla tetiklendiği ifade edilmiştir (Kawagashi ve ark., 1994). Basdiokarplardan HPLC uygulamasıyla tanımlanmış olan 6 farklı bileşik PC12 hücreleri üzerinde denenmiş ve erisenon E' nin bu hücrelerdeki NGF serbestlenmesi pozitif kontrolün iki katına kadar arttırdığı gösterilmiştir (Phan ve ark., 2014). Astrosit hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise izole edilen bu bileşiklerin etkili olamamasına rağmen gövde ekstraktının NGF mRNA'sını arttırdığı gösterilmiştir (Mori ve ark., 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Materyaller

3. 1. 1. Deney hayvanı

Deney hayvanı olarak 6-8 haftalık Balb-C ırkı albino fareler kullanıldı. Fareler, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi.

3. 1. 2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Tablo 1. Sarf malzeme listesi

Sıra No	Ürün İsmi	Marka	Katalog Kodu
1	Ketalar (ketamin-hcl) 50mg/ml	Pfizer	
2	RPMI 1640	Sigma	R0883
3	Neuro Basal A (NBA)	İnvitrojen	10888
4	Hanks'in Dengeli Tuz Solüsyonu (HBSS)	Sigma	H9269
5	Kollajenaz (Enzim)	Sigma	C7657
6	Tripsin	Sigma	T4424
7	Fetal dana serumu (FCS)	Sigma	F9665
8	Deoksiribonükleaz (DNAz)	Sigma	D4513
9	Tripsin İnhibitörü	Sigma	T6522
10	Percoll	Sigma	P4937
11	Poly-L-lizin	Sigma	P6282
12	Laminin	Sigma	L2020
13	B27 suplementi	İnvitrojen	17504044
14	Antibiyotik	Sigma	A5955
15	Cam tabanlı petri kabı	wpi-europe	FD35100
16	Flask (hücre kültürü için)	Thermo Scientific	153732
17	Santrifüj tüpü	Thermo Scientific	366060
18	Deney tüpü (10 ml) (vasat hazırlamak için)	Greiner Bio-one	227261

19	Mikropipet ucu şeffaf	Thermo Scientific	005.01.001
20	Mikropipet ucu sarı	Thermo Scientific	005.01.002
21	Mikropipet ucu mavi	Thermo Scientific	005.01.003
22	GlutaMAX	İnvitrojen	35050038
23	NGF	Sigma	N6009
24	Propidyum iyodür	Sigma	P4170
25	Calcein AM	Sigma	206700
26	<i>Hericium erinaceus</i> mantarı	Agora Mantarcılık	

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Aslan yelesi mantar ekstraktının hazırlanması

Hericium erinaceus mantarının aktif bileşenlerini elde etmek amacıyla uygulanan yöntemlerden biri sıcak su ile ekstrakte etmektir. Çalışılan mantar ARGOMA Mantarcılık Gıda Tarım ve Hayvancılık San. Tic Ltd. Şti DENİZLİ' den tedarik edilmiş olan kültür mantarıdır. Tedarik edilen mantarın sıcak su ekstraktı Raman ve arkadaşlarının uyguladıkları protokole göre hazırlanmıştır (Raman ve ark., 2015). Taze mantar basidiokarpları parçalanıp elektrikli değirmen makinesinde öğütülerek toz haline getirildi. Toz formundaki 20 gr mantar üç kez distile edilmiş su ile 1:10 (w/v) oranında ıslatıldı, 50 Hertz frekansta ajitator ile karıştırılarak kaynatıldı. Kaynayan sıvı 30 dakika dinlendirildi. Kalıntıların uzaklaştırılması için steril gazlı bez ile filtre edildi ve 10.000 rpm devirde +4°C' de santrifüj edilerek süpernatant Whatman filtre kâğıdından (Number 1) geçirildi. Örnek bir gece -80°C' de bekledikten sonra liyofilizatörde (Christ Alpha 1-4 LD Freeze dryer) -50°C' de 48 saat kurutuldu. Toz halindeki ekstrakt 50 µg/ml' lik stoklara ayrıştırılarak -20°C'de saklandı (Raman ve ark., 2015).

3. 2. 2. Çalışmada kullanılan vasatların hazırlanması

Çalışmada kullanılan vasatlar Oğuz 'un uyguladığı protokole uygun olarak hazırlandı (Oğuz, 2009).

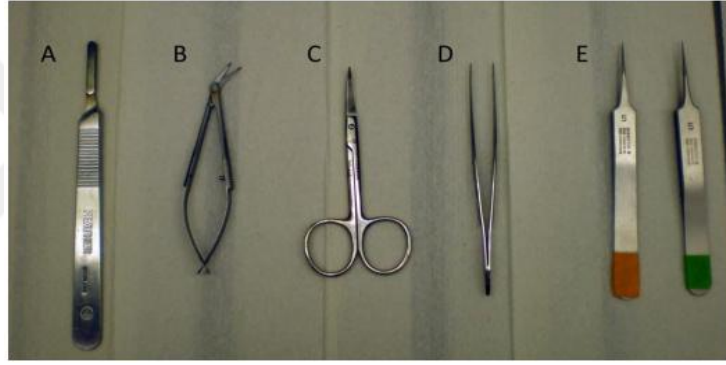
a) Diseksiyon Vasatı

Diseksiyon vasatı, %1 oranında glutamin-antimikotik- antibiyotik karışımının RPMI 1640 solüsyonu içerisinde aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Vasat diseksiyon süresince soğuk olarak kullanıldı.

b) Kültür Vasatı

Neurobasal A (NBA) solüsyonu içerisinde %1 glutamin, %1 antibiyotik-antimikotik ve %2 B27 supplementinin aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Kültür süresince vasat 37 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

3. 2. 3. Farelerden arka kök ganglionların çıkarılması



Şekil 14. Arka kök ganglionların diseksiyonu sırasında kullanılan malzemeler A) Standart bistüri, B) Oluk makası, C) mikro makas, D) Standart forseps, E) İnce uçlu forsepsler

DKG nöron kültürü halen laboratuvarımızda rutin olarak başarıyla uygulanan bir protokolle hazırlandı (Cengiz ve ark., 2012). Bunun için Balb-C ırkı genç yetişkin fareler (6-8 haftalık) ketamin anestezisi (100 mg/kg) ile uyutulduktan sonra servikal transeksiyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Dorsal kök ganglionları aseptik şartlarda stereo mikroskop altında çıkartıldı. Çıkarılan ganglionlar kültür hazırlanıncaya kadar soğuk diseksiyon vasatında bekletildi.

3. 2. 4. Hücre kültürü

a) Enzimatik ayrıştırma

Kollajenaz uygulaması

Gangliyonların enzimatik ayrıştırılmasına kollajenaz ile başlandı. 995µl kültür vasatı içerisine 5µl kollajenaz tip IV eklenip çıkarılan ganglionların uzantıları kesilerek bu karışım içerisine bırakıldı ve bu şekilde 40 dk. boyunca inkübatörde (37 °C sıcaklık, %5 CO₂, nem) bekletildi (Cengiz ve ark., 2012).

Tripsin uygulaması

İnkübasyon sonrası süpernatant kısım atıldı ve HANK'S solüsyonu ile DKG' ye 3 kez yıkama yapıldı ve üzerine 400 µl NBA ile birlikte 200 µl tripsin ilave edildi. Yeniden inkübatöre kaldırıldı ve 15 dakika inkübe edildi (Cengiz ve ark., 2012).

b) Mekanik ayrıştırma

Enzim muamelesi ile yumuşayan doku 20 dk. süren çok sayıda pipetleme ile (tiritürasyon) parçalandı. Bunun için mavi pipet ucu uç kısmından makasla kesilerek genişletildi. Bu uçla sıvı içindeki ganlionlar çekilip geri boşaltıldı. Sonra kalın pipet ucuyla, daha sonra ince pipet ucuyla tiritüre edildi. Son olarak insülin enjektörüyle bir defa sıvı alınıp boşaltıldı. Üzerine 6 µl DNAz enzimi eklendi. Etüve kaldırıldı 30 dk. boyunca 50 Hertz frekansta ajite ederek inkübe edildi (Cengiz ve ark., 2012).

c) Saflaştırma

Etüvden çıkarılan kültür 120 g' de +4 °C' de 3 dakika santrifüje edildi. Çıkarılan ependorftaki süpernatant pipetle çekilerek atıldı. Ependorfa 360µl kültür vasatı, 40µl FBS, 30µl Tripsin inhibitörü eklendi. Ayrı bir boş 15 ml' lik santrifüj tüpünde %60, %35, %10' luk percoll gradiyenti oluşturuldu. Hücre süspansiyonu gradiyent üzerine eklenerek 4000 rpm' de +4°C' de 20 dakika santrifüje edildi. Nöronların yoğunlukta olduğu tabaka bir başka santrifüj tüpüne aktarıldı ve 120 g' de 3 dakika santrifüje edilerek nöron hücreleri kalıntılardan arındırıldı (Cengiz ve ark., 2012).

d) Ekim

Elde edilen nöronlar, bir gün öncesinde oda sıcaklığında 2 saat %10 poly-I lizin ve ardından 37 °C'de 1 gece süresince %0,001'lik laminin ile kaplanan ve ekim

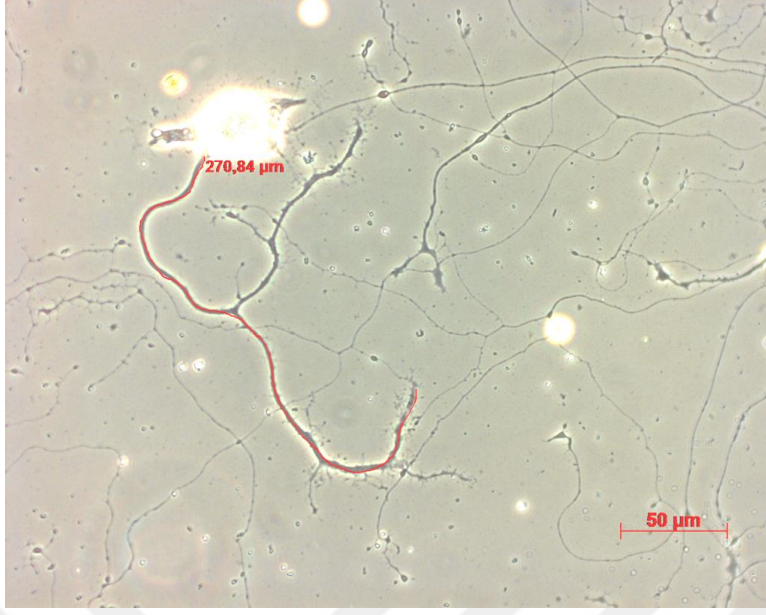
öncesinde steril distile su ile yıkayıp kurutulan 35 mm' lik cam tabanlı petri kaplarına ekildi. Hücreler öncelikle kültür vasatı içinde 600 µl süspansiyon olarak ekildi. Hücrelerin tabana yapışması için, iki saat etüvde inkübe edildi sonra 900µl kültür vasatı eklendi, petrideki kültür vasatı 1,5ml'ye tamamlandı. Kültürler %5 CO2 ayarlı 37°C' lik etüvde 48 saat inkübasyona alındı (Cengiz ve ark., 2012).

3. 2. 5. Mikroskopik görüntüleme ve aksotomi

a) Zaman aralıklı mikroskopi ile pozisyon bulma

İn vitro ortama aktarılmış olan nöronların aksotomi için uygun uzunluğa erişecek seviyede akson uzatmış olmaları için 48 saat beklendi. Aktarılmış olan nöronlardan hangileri üzerinde çalışma yapılabileceğini saptamak için bilgisayar kontrollü invert mikroskop (Cell Observer-Zeiss) kullanıldı.

Sistem motorize bir invert mikroskop (Axiovert 200M) ile tüm fonksiyonların kontrol edilip programlanabildiği bilgisayar ve yazılımından oluşmaktadır. Mikroskop üzerinde bulunan dijital kamerayla alınan görüntüler bilgisayar ortamına aktarılabilir. Tabla üzerinde bulunan ve preparatın içine yerleştirildiği inkübatör kutusu sayesinde, hücreler için fizyolojik şartlar sağlanabilmektedir (37°C sıcaklık, %5 CO₂, nem). Sistemde kurulu bilgisayar programı (Axiovision 3. 1) mikroskopun tüm fonksiyonlarının bilgisayar ortamında düzenlenebilmesine imkân sağlamaktadır. Ayrıca bu program hücreleri canlı olarak bilgisayar ortamında izleme olanağı vermektedir. Bu program sayesinde preparatların X, Y, Z koordinatlarıyla çeşitli pozisyonlar kaydedildi. Görüntü özellikleri (renk ayarı, parlaklık, çözünürlük gibi) ayarlandı. Görüntü alırken objektifler, filtreler ve ışık ayarları otomatik olarak ayarlandı. Aksotomi yapılacak nöronların pozisyonları 40X büyütme bir objektifle belirlendi (Şekil 3. 3). Propidium iyodürün (7,5 µM) medyuma eklenmesiyle ölü hücreler tespit edildi. Membran deformasyonu, vakuollerin artışı ve akson fragmentasyonu gibi stres belirtileri gösteren hücreler elimine edildi. Mikroskop üzerinde bulunan dijital kamera yardımıyla görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı. Önceden belirlenen ve görüntülenen pozisyonlar fotoğraflandı ve zvi formatında depolandı. Fotoğraflar TIFF formatına dönüştürüldü.



Şekil 15. Zaman aralıklı mikroskopla akson uzunluğunun ölçümü.

b) **İn vitro aksotomi yöntemi**

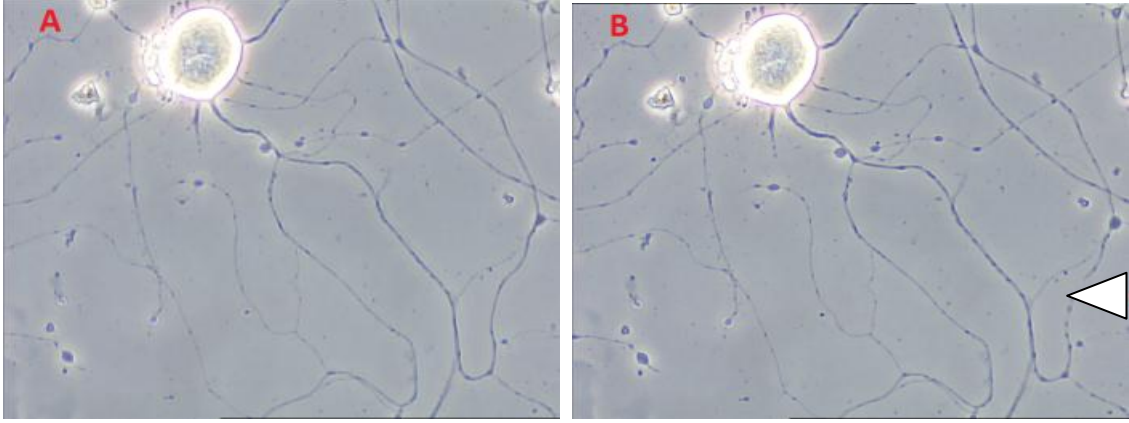
Deneysel çalışmalarda birçok hastalığın tanı ve tedavisine yönelik hasar modelleri geliştirilmiştir. Periferik sinir hasarı için en çok kullanılan yöntemler transeksiyon ve ezme hasarıdır. Kullanılan birçok yöntem dokusal kesi hasarı oluşturmakta ve dokusal sorunlara yol açmaktadır. Bu çalışmada uygulanan mikrolazer transeksiyon modeli, tamamen hücresel hasara odaklanarak hücresel yanıtları başlatması açısından uygulanan diğer kesi hasarı yöntemlerinden ayrılmaktadır. Çünkü in vitro ortamdaki nöronlara uyguladığımız mikrolazer transeksiyon modeli, lazer gücünün, hasar yerinin, hasar süresinin ve diğer çevre koşullarının kontrol edilebilir olması nedeniyle aksotomi sonrasında nöronlarda benzer hücresel yanıtlar başlatmaktadır. Bu nedenle diğer transeksiyon modellerinden üstün olduğu söylenebilir.

Nöronlarda transeksiyon hasarı (aksotomi) mikrolazer sistemi (PALM Microbeam) ile gerçekleştirildi. Bu sistemde bulunan lazer ünitesi 337 nm dalga boyunda, her biri 3 ns süren ve yaklaşık olarak 300 µJ enerji salan pulse darbeler üretmektedir. Lazer aksotomileri sırasında 63X kuru faz kontrast objektif (Achromplan N.A. 0.75, Zeiss Almanya) ve lazer ışınlarını, mikroskobu ve mikroskoba bağlı olan CCD kamerayı kontrol eden bilgisayar sistemi kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 16. PALM Mikrolazer sistemi

Aksotomi işlemi sırasında nöronlar fizyolojik şartlarda tutuldu (37°C sıcaklık, %5 CO₂ ve nem). Görüntüleme ve aksotomi, PALM mikrolazer mikrodiseksiyon mikroskobu (Zeiss Axiovert 200) kullanılarak 63x kuru faz kontrast objektifle yapıldı. Aksotomisi yapılacak olan nöronlar belirlenerek pozisyonlar kaydedildi. Aksotomi için seçilen nöronların ve nöritlerinin sağlıklı olmasına, nöron büyüklüğü ve nörit çapı bakımından aralarında fark olmamasına dikkat edildi. Aksotomiler yaklaşık olarak %90 enerji düzeyinde ve perikaryondan 150 µm uzaklıkta yapıldı (Şekil 3.5). Aksonlar aksotomi işlemi sonrasında aksotomi noktasından proksimal ve distal segmentlere ayrıldı. İki segment arasında geniş bir açıklık oluştu. Aksotomi işlemi, pH dengesinin korunması amacıyla 30 dakikalık aralıklarla gerçekleştirildi. Her petride ortalama 30 nöronda aksotomi hasarı oluşturuldu. Canlı hücre tespiti amacıyla aksotomiden 48 saat sonrasında propidium iyodür (7,5 µM) ve Calcein AM (1 µM) floresan boyaları kullanılarak görüntü alındı.



Şekil 17. PALM mikrolazer sisteminde transeksiyon yapılacak nöronun aksotomi öncesi (A) ve aksotomi sonrası (B) görüntüleri. B' de ok akson tepesinden 150 µm mesafede gerçekleştirilen aksotomi noktasını gösteriyor.

3. 2. 6. Gruplar

Kontrol grubu: Nöron kültürüne 10 µl/ml serum fizyolojik (SF) eklendi. Bir saat sonra seçilen canlı nöronlara PALM mikrolazer mikrodiseksiyon sistemiyle aksotomi hasarı gerçekleştirildi.

NGF grubu: Nöron kültürüne 50 ng/ml NGF eklendi. Bir saat sonra seçilen canlı nöronlara PALM mikrolazer mikrodiseksiyon sistemiyle aksotomi hasarı gerçekleştirildi.

AYM grubu: Nöron kültürüne 50 µg/ml aslan yelesi mantarının sıcak su ekstraktı (AYM) eklendi. Bir saat sonra seçilen canlı nöronlara PALM mikrolazer mikrodiseksiyon sistemiyle aksotomi hasarı gerçekleştirildi.

NGF+AYM grubu: Nöron kültürüne 50 ng/ml NGF ve 50 µg/ml AYM' nın su ekstraktı eklendi. Bir saat sonra seçilen canlı nöronlara PALM mikrolazer mikrodiseksiyon sistemiyle aksotomi hasarı gerçekleştirildi.

48 saat sonra aksotomi uygulanan nöronların hayatta kalma oranları ve aksotomi hasarı gerçekleşen nöritlerin ortalama akson uzunlukları saptandı, gruplar arası karşılaştırma yapıldı.

İstatistik Analiz

Üzerinde durulan özelliklerden sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; Ortalama ve Standart Hata olarak ifade edilirken, Kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Sürekli değişkenler bakımından grup ortalamalarını karşılaştırmada Tek Yönlü Varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemede Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler bakımından grupları karşılaştırmada z testi ile oran karşılaştırması yapılmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.



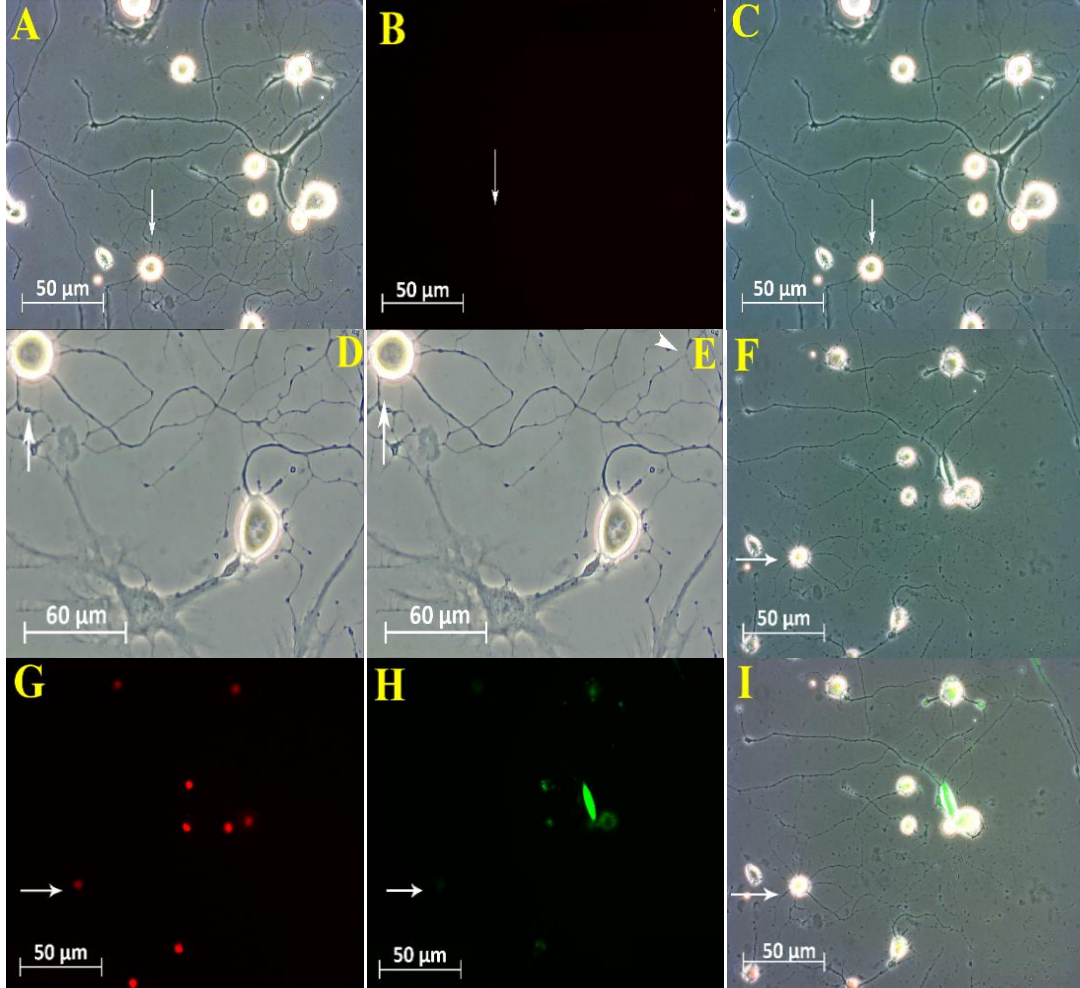
4. BULGULAR

Dört farklı çalışma grubundaki hücreler, zaman aralıklı mikroskopik görüntüleme sisteminde aksotomi öncesi, aksotomi sonrası ve 48. saatlerde görüntülendi. İlk önce propiyum iyodürle boyanan ölü hücreler saptandı, canlı hücreler belirlendi, aksotomi işlemi bu canlı hücrelere yapıldı. Aksotomi hasarı gerçekleştirilen nöronların 48 saat sonra ölmüş olanları ve canlı kalanları saptandı. Nöronların akson uzunlukları Axiovision 3.1 programı aracılığıyla ölçüldü. İstatistik değerlendirme için her grupta en az 100 hücreye ait veri toplandı.



4. 1. Kontrol Grubu

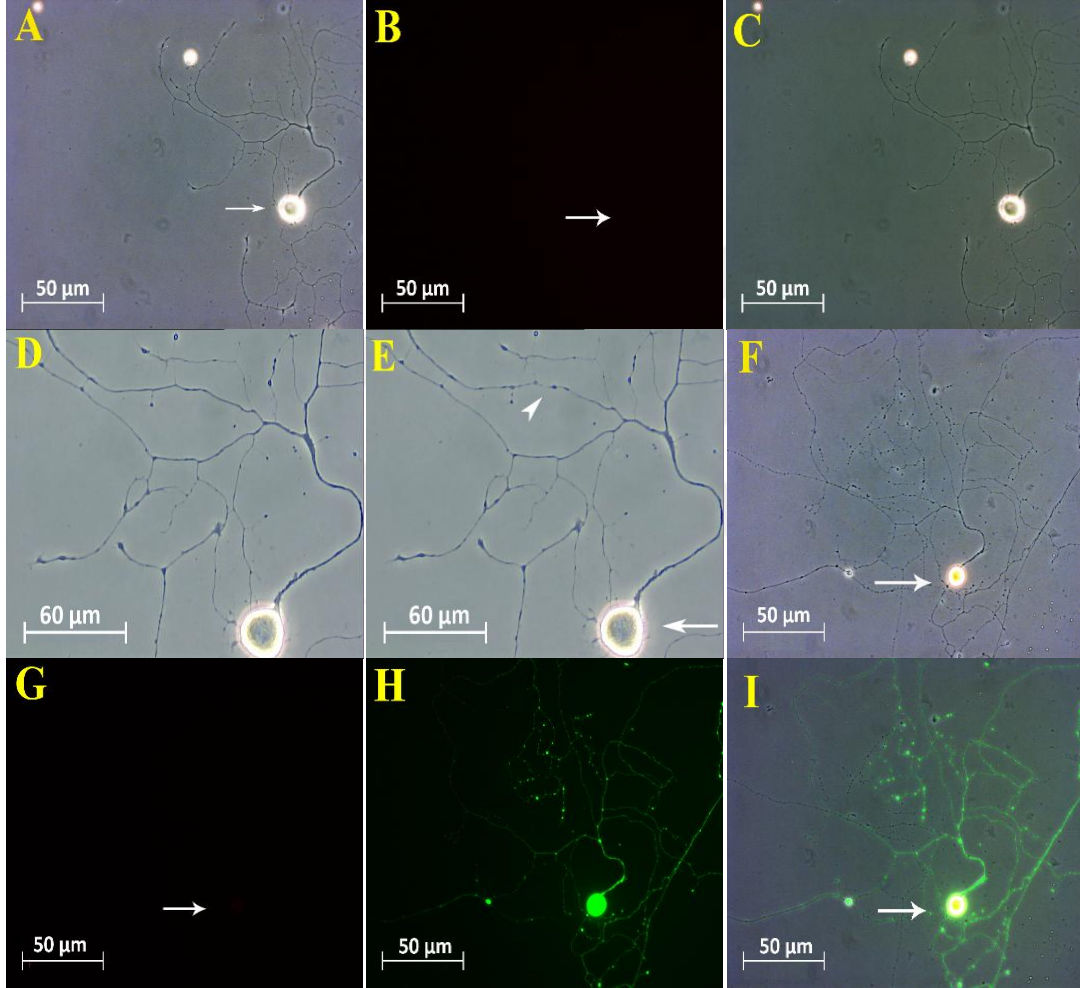
Serum fizyolojik uygulanan, aksotomiden önce canlı oldukları doğrulanan nöronlar, aksotomiden 48. saat sonra zaman aralıklı mikroskop sisteminde görüntülendi. Bu nöronların %31'inin canlı kaldıkları görüldü ve bu nöronlara ait aksonların ortalama uzunluğu $6,90 \pm 2,2 \mu\text{m}$ hesaplandı (Şekil 4. 1).



Şekil 18. Kontrol grubu hücrelerinin mikroskopik görüntüleri. Seçilen canlı hücrenin (uzun ok) aksotomi öncesi time lapse mikroskopunda faz (A), Pİ (B), faz ve Pİ'nin birlikte buldukları görüntüler (C). PALM lazer mikroskopunda aksotomiden hemen önce (D) ve aksotomiden hemen sonra (E) faz görüntüleri. E'de ok başı aksotomi hasar noktasını gösteriyor. Aksotomiden 48 saat sonra time lapse mikroskopunda faz (F), Pİ (G), Calcein (H), faz, Pİ, Calcein'in birlikte buldukları görüntüler (I).

4. 2. NGF Grubu

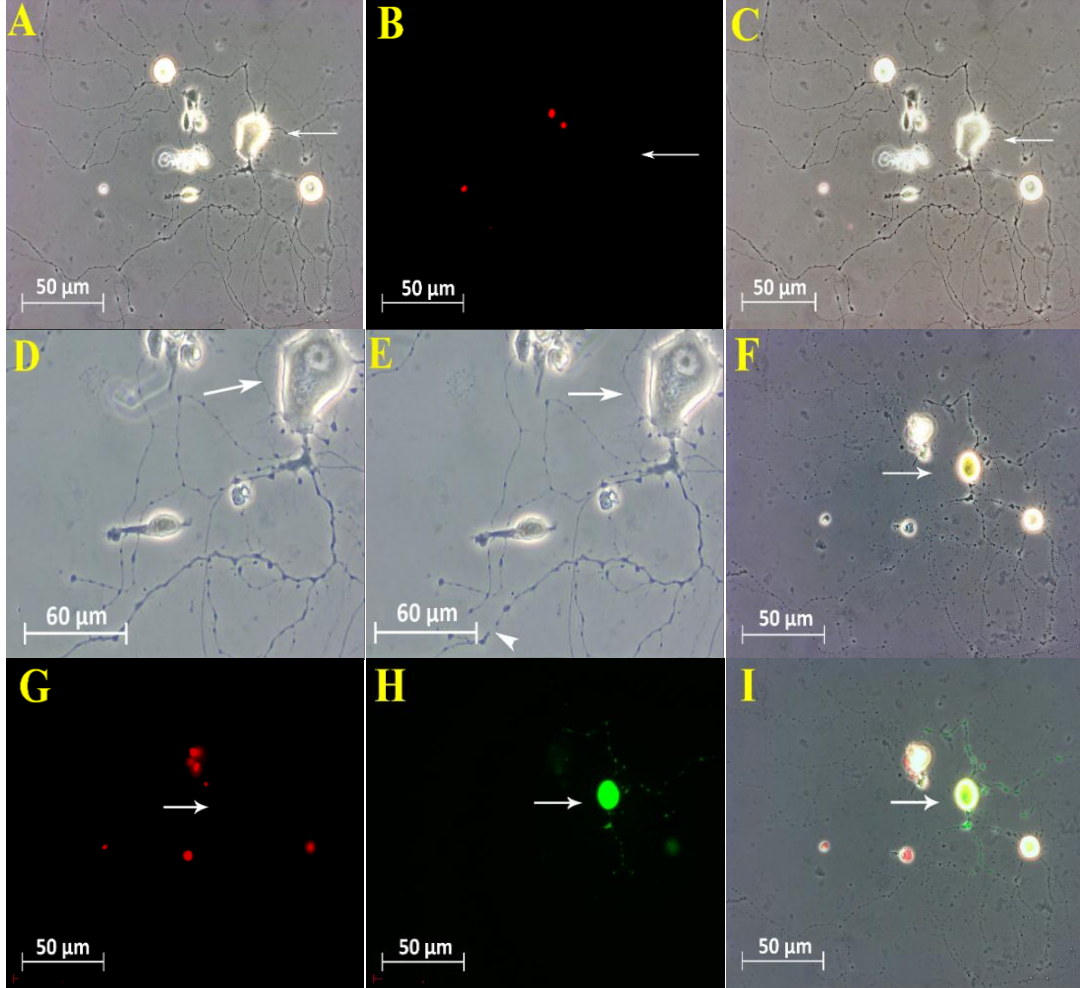
NGF (50 ng/ml) uygulanan grupta, aksotomi öncesi canlı oldukları doğrulanmış nöronların, 48 saat sonra yapılan mikroskobik görüntülemesinde %60'ının canlı kaldığı görüldü. Bu nöronlara ait aksonların ortalama uzunluğu $32,35 \pm 4,5 \mu\text{m}$ olarak hesaplandı (Şekil 4.2).



Şekil 19. NGF grubu hücrelerinin mikroskobik görüntüleri. Seçilen canlı hücrenin (uzun ok) aksotomi öncesi time lapse mikroskobunda faz (A), Pİ (B), faz ve Pİ' nin birlikte buldukları görüntüler (C). PALM lazer mikroskobunda aksotomiden hemen önce (D) ve aksotomiden hemen sonra (E) faz görüntüleri. E'de ok başı aksotomi hasar noktasını gösteriyor. Aksotomiden 48 saat sonra time lapse mikroskobunda faz (F), Pİ (G), Calcein (H), faz, Pİ, Calcein' in birlikte buldukları görüntüler.

4. 3. AYM Grubu

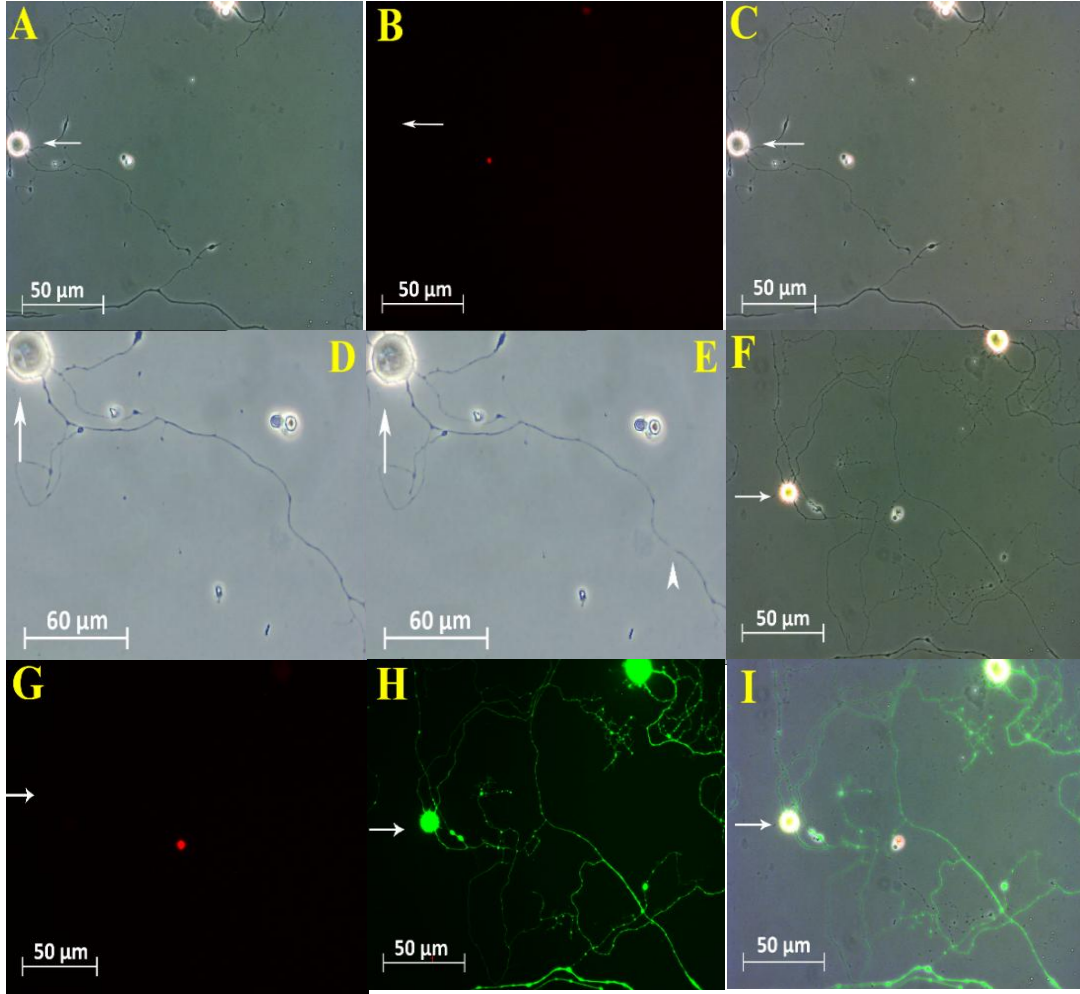
AYM ekstraktı (50 µg/ml) uygulanan grupta, aksotomi öncesi canlı oldukları doğrulanan nöronlar, 48 saat sonra zaman aralıklı floresan mikroskopla görüntülendi, %91'inin hayatta kaldığı görüldü. Bu nöronlara ait aksonların ortalama uzunluğu ise $32,22 \pm 4,2$ µm olarak hesaplandı (Şekil 4.3).



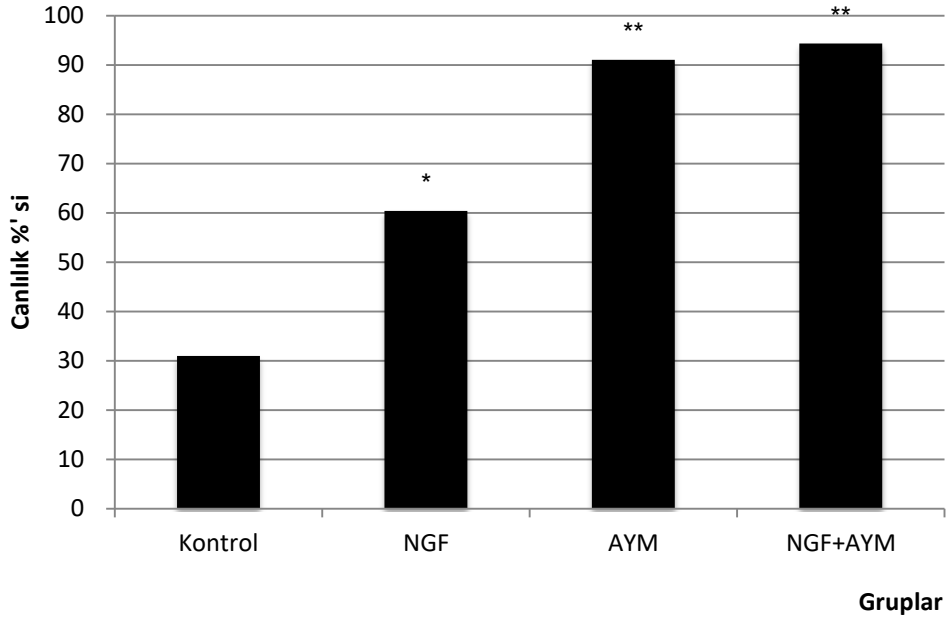
Şekil 20. AYM grubu hücrelerinin mikroskopik görüntüleri. Seçilen canlı hücrenin (uzun ok) aksotomi öncesi time lapse mikroskopunda faz (A), Pİ (B), faz ve Pİ' nin birlikte buldukları görüntüler (C). PALM lazer mikroskopunda aksotomiden hemen önce (D) ve aksotomiden hemen sonra (E) faz görüntüleri. E'de ok başı aksotomi hasar noktasını gösteriyor. Aksotomiden 48 saat sonra time lapse mikroskopunda faz (F), Pİ (G), Calcein (H), faz, Pİ, Calcein' in birlikte buldukları görüntüler (I).

4. 4. AYM ve NGF Grubu

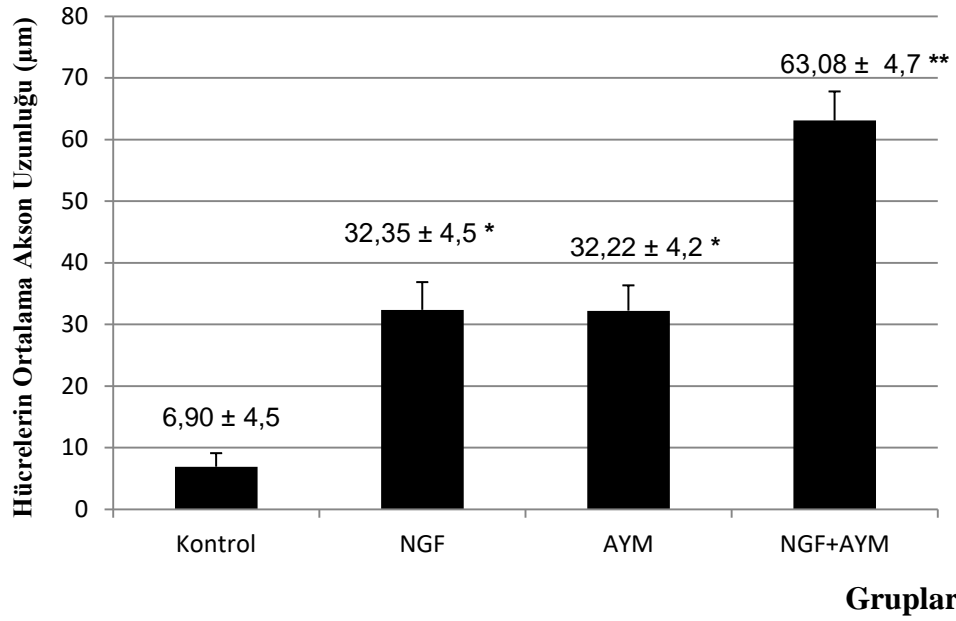
AYM ekstraktı (50 µg/ml) ile NGF'in (50 ng/ml) birlikte uygulandığı grupta, aksotomi öncesi canlı oldukları doğrulanan nöronlar, 48 saat sonra zaman aralıklı floresan mikroskop sisteminde görüntülendi. Bu nöronların %94'ünün hayatta kaldığı görüldü. Bu nöronlara ait aksonların ortalama uzunluğu $63,08 \pm 4,7$ µm olarak hesaplandı (Şekil 4.4).



Şekil 21. NGF + AYM grubu hücrelerinin mikroskopik görüntüleri. Seçilen canlı hücrenin (uzun ok) aksotomi öncesi time lapse mikroskopunda faz (A), Pİ (B), faz ve Pİ' nin birlikte buldukları görüntüleri (C). PALM lazer mikroskopunda aksotomiden hemen önce (D) ve aksotomiden hemen sonra (E) faz görüntüleri. E'de ok başı aksotomi hasar noktasını gösteriyor. Aksotomiden 48 saat sonra time lapse mikroskopunda faz (F), Pİ (G), Calcein (H), faz, Pİ, Calcein' in birlikte buldukları görüntüleri (I).



Şekil 22. Deney grupları canlılık karşılaştırması. Deney gruplarının kontrol grubuna oranla canlılık oranı anlamlıdır *($p < 0,01$). AYM ve AYM+NGF grupları canlılık oranları NGF grubu canlılık oranları ile karşılaştırıldığında anlamlıdır **($p < 0,01$).



Şekil 23. Aksotomi sonrası 48. saatte yapılan akson uzunluğu ölçümlerinin gruplara göre dağılımı. NGF, AYM ve NGF+AYM grupları kontrol grubu ile akson uzunluğu açısından karşılaştırıldığında fark anlamlıdır * ($P < 0,01$). Ayrıca NGF+AYM grubunun NGF, AYM ve kontrol grubundan olan farkı da anlamlıdır ** ($P < 0,01$).

5. TARTIŞMA

5. 1. Yöntem Tartışması

Yapılan çalışmada materyal olarak fare dorsal kök gangliyonundan çıkarmış olduğumuz duysal nöronlar kullanıldı. DKG' den elde edilen primer kültürlerde farklı hücre tiplerinin gözlenmesi daha önceki çalışmalarla uyum göstermektedir (Cengiz ve ark., 2012). Dorsal kök gangliyonlarda *Hericium erinaceus*' un etkinliğini ölçmek için uygulanan birçok çalışma PC-12 hücreleri üzerinde yapılmıştır. 1976 yılında ilk kez ratlardaki adrenal medulla tümöründen elde edilen bu hücreler hücre büyüklüğü ve küçük vezikül yapılarıyla nöronlara oldukça benzemektedirler (Greene ve Tischler, 1976). Sempatik ganglion nöronlar ile fenotipik benzerlikleri, etik problemini ortadan kaldırması, bulgulardaki varyasyonu azaltması ve kolay kültüre edilmesi sebebiyle yapılan birçok deneysel çalışmada tercih edilmektedir (Westerink ve Ewing, 2008). Fakat sinir hücrelerin canlılığı, büyüme, sinyal değişimi ve nörit uzama gibi faktörlerin değerlendirilmesinde duysal nöronlarının primer kültürü daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Yu ve ark., 2015). Bu çalışmada AYM' nin nöroprotektif ve nörorejeneratif etkinliğinin görüntüleme sistemi kullanılarak ortaya konulması amaçlandığından primer kültür uygulaması daha uygun görülmüştür.

Deneysel olarak oluşturulan birçok aksotomi modeli in vivo dejenerasyon modelleridir. Periferik sinir transeksiyon modeli sıklıkla kullanılmaktadır. İn vitro transeksiyon modeliyle yapılan çalışmalar daha nadir uygulanmaktadır. Bu modelin diğer modellere göre üstünlüğü istenen özelliklere sahip hücre seçiminin net yapılabilmesi, aksotomi yapılacak noktanın hesaplama programıyla belirlenebilmesi, lazer gücünün ve uygulama sınırlarının kontrol edilebilmesidir (Al-Ali ve ark., 2017). Bu çalışmada uyguladığımız aksotomi hasarının PALM mikrolazer sistemi ile yapılmış olması da her bir nöron için tam bir akson kesimi oluşturması ve *H. erinaceus* sıvı ekstraktının etkinliğini ölçmek için oluşturulabilecek en iyi ve özgün sistem olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca daha önce aksotomi deneyleri ile yapılan çalışmalarda kesim bölgesinin hücre gövdesine uzaklığının 100 µm' den fazla olmasının rejenerasyon sürecinin gerçekleşmesi için gerekli olduğu belirtilmiştir (Cengiz ve ark., 2012).

Sinir hücrelerinin rejenerasyon sürecinde herhangi bir maddenin etkinliğini ya da rejenerasyon modelinin avantajını ortaya koymak için belirli ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Retrograd etiketleme, histomorfometri ve imminohistokimya, yeniden sinir kas kavşağı kurulmuş olan ilgili kasların elektrofizyolojik ölçümleri ve davranışsal geri kazanım gibi geçerli ölçüm kategorileri bunlardan bazılarıdır (Kemp ve ark., 2017). Yaptığımız bu çalışmada ölçüm yöntemi olarak histomorfometri yöntemini floresan boyalar aracılığıyla kullanarak hem aksotomi öncesi ve sonrası canlı hücre sayılarını hem de akson uzunluğunu net olarak ölçebildik. Bu yöntem aracılığıyla farklı floresan boyalar bir arada kullanabilme avantajını kullanırken toksik etkisi olmayan boyar maddelerden faydalanarak time-lapse görüntüleme yöntemi ile aksotomi sonrası hücrelerin davranışlarını adım adım gözlemlendi.

Mantarların etkinliği birçok izolasyon yöntemiyle araştırılmıştır. 1990'lardan günümüze kadar sıvı ekstraktı, etil alkol ekstraktı, metanol ekstraktı ve bu ekstraktlardan izole edilen birçok bileşenin yapısı HPLC, spektroskopik yöntemi, X-ray kristalografi yöntemleriyle ortaya konularak nörotogenik etkinlikleri çalışılmıştır ve çalışılmaya devam edilmektedir (Kawagashi ve ark., 1996, 1997; Lee ve ark., 2002; Tsukumoto ve ark., 2003; Qu ve ark., 2012). Bu çalışmada primer kültür, mikrolazer aksotomi gibi daha önce AYM etkinliğini değerlendirmek için kullanılmamış yöntemler uygulandı. Aslan Yelesi Mantarı ekstrakt yöntemi olarak, Raman ve ark. (2015) tarafından metode edilmiş sıcak su ekstraktı tercih edildi.

5. 2. Etkinlik Değerlendirmesi

Deneysel çalışmada negatif kontrol, SF uygulamasının ardından aksotomi uygulanan hücreleri kapsamaktadır. Çalışma sonunda kontrol grubundaki hücrelerin yalnızca %31' inin canlı kalmış olması, bu tekniği uygulayan önceki çalışmalarla uyumludur. Dejeneratif yöntem olarak kullanmış olduğumuz mikro lazer yönteminin başarısını da ortaya koymuştur (Şekil 4.5). Ayrıca kontrol grubu dâhilinde bulunan nöronların 48 saat sonunda ortalama akson uzunlukları 6,90 µm olarak hesaplandı (Şekil 4.7). Herhangi bir etkene maruz bırakmaksızın aksotomi sonrası 48 saate kadar akson uzunluğunda meydana gelen bu değişim waller dejenerasyonunun, schwann hücreleriyle birlikte dejeneratif süreci devam ettirdiği ve hücrenin gen ifadesi açısından rejenerasyon sürecine geçemediğini düşündürmekle beraber çalışmadaki diğer grupların

rejenerasyon etkinliğini ortaya koyması açısından temel bir basamak oluşturdu (Şekil 4.1).

Pozitif kontrol olarak çalışılan hücreler ise 50 ng/ml NGF eklenerek desteklenmiştir. NGF'in nöronlar üzerindeki etkinliği yaklaşık 40 yıldır araştırmalara konu olmuştur. NGF'in akson uzatma ve rejenerasyonda aktif rol oynadığı kesindir ve doz bağımlı etkisi vardır. Phan ve ark. (2014) nın in vitro ortamda yaptığı çalışmada NGF'in en etkin dozu 50 ng/ml belirlenmiştir. Uygulama sonucunda elde edilen veriler yapılan çalışmalarla uyumludur (Raman ve ark., 2015). NGF uygulaması yapılmış olan pozitif kontrol grubunda transeksiyon hasarı meydana gelmiş olan nöritlerde geri çekilme gözlenirken canlılıklarını büyük oranda korudukları görüldü. Transeksiyon işlemi uygulanan nöritlerin uç kısımlarının aksoplazma akışını engelleyecek şekilde kapanmalarına rağmen büyüme konisi oluşturmadıkları bunun yerine aynı akson üzerinde veya NGF uygulaması yapıldıktan sonra gelişen başka bir nörit üzerinde dallanma yaparak farklı yönlere doğru rejenere oldukları görüldü (Şekil 4.2).

Basidiomycetes ailesine mensup birçok mantarın rejeneratif etkinliği araştırılmıştır; 2012 yılında yapılan bir çalışmada PC-12 hücrelerinde *Plouretus giganteus* mantarının sıvı ekstraktı kullanılmış ve 25 µg/ml' nin en etkin doz olduğu ortaya konarak akson uzatımında %31,7 artış gözlenmiştir (Phan ve ark., 2012); yine aynı yıl içerisinde *Lignousus rhincorus* mantarının sıvı ekstraktının PC-12 hücrelerindeki etkin dozunun 20 µg/ml olduğu, akson uzamasında %15 artış sağladığı kaydedilmiştir (Eik ve ark., 2012); Kim ve ark. (2007) *Tremella fuciformis* mantarının sıvı ekstraktını PC-12 hücrelerinde çalışmaları sonucunda 0,1 µg/ml ile 1,7 birimlik nörit artışı kaydedilmiştir. *Ganoderma neo-japonicum* sıvı ekstraktının 50 µg/ml etkin dozda %14,22'lik nörit artışı sağladığı; *Ganoderma lucidium* mantarının sıvı ekstraktının 75 µg/ml etkin dozda nörit uzamasında %12,61 katkısı olduğu; *Grifola frondosa* mantarının nörit uzamasındaki etkin dozunun yine 75 µg/ml olduğu ve %12,07 oranında nörit uzatma artışı sağladığı ve son olarak *Hericium erinaceus* mantarının sıvı ekstraktının PC-12 hücreleri üzerindeki en etkin dozunun 50 µg/ml olduğu ve %14,66 oranında nörit uzatma artışı sağladığı ortaya konulmuştur (Seow ve ark., 2013). Primer hücre kültürü üzerinde yapılan denemelerde de *H. erinaceus* sıcak su ekstraktı etkinliğinin 50 µg/ml yoğunlukla %32,22 µm nörit uzunluğu (Şekil 4. 6) ve %91

canlılık oranı bulundu (Şekil 4. 5). Seow ve ark., (2013) AYM'nin rejeneratif süreçte işlevsel olarak NGF' i taklit ettiğini, trkA reseptörlerine bağlanarak nöritogenezisi başlattığını bildirdiler. Primer nöron kültüründe yapılan çalışmada hücrelerin 48 saat sonundaki AYM grubunun canlılık oranı, NGF grubundaki hücrelerin canlılık oranıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark ortaya çıkmış olması ($p<0.01$) AYM' nin hücrelerin hayatta kalma başarısını NGF' ten çok daha kuvvetli bir şekilde desteklediğini göstermektedir. AYM'nin bu başarısı, glial hücrelerdeki nörotrofin, sitokin, kemokinlerin salınımını ve/veya duysal hücrelerindeki rejeneratif gen ekspresyonunu tetiklediğini düşündürmektedir. Daha önce üzerinde yapılmış olan bir çalışmayla AYM' nin endoplazmik retikulum stresinin tetiklediği hücre ölümünü azalttığı ifade edilmiştir (Nagai ve ark., 2006). Bu çalışma neticesinde de elde edilen bulgular AYM' nin sinir hücrelerini çeşitli fizyolojik stres faktörlerinin yıkıcı etkilerinden koruyabildiğini akla getirmektedir. Yine 48 saat sonundaki hücrelerin ortalama akson uzunluklarının AYM grubunda 32,22 μm , NGF grubunda 32,67 μm olması AYM ile NGF' in hücrelerin rejenerasyon yeteneğini benzer şekilde etkilediklerini göstermekle birlikte Seow ve ark. (2013)'nın görüşlerini de desteklemektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmaların birçoğunda AYM' nin NGF'in gen ekspresyonunu arttırarak rejenerasyona katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (Mori ve ark., 2008, 2011; Sabaratnam ve ark., 2013). Lai ve arkadaşlarının neuroblastoma – glioma cell NG108-15 hücreleri üzerinde 10 ng/ml NGF ile 10 $\mu\text{g/ml}$ AYM ekstraktı kullanarak yaptıkları çalışmada nörit uzatmada kontrol grubuna oranla %59' luk bir fark ortaya koymuşlardır (Lai ve ark., 2012). Bu çalışmada 50 ng/ml NGF ve 50 $\mu\text{g/ml}$ AYM ekstraktı ile primer dorsal kök gangliyon nöronları üzerinde araştırma yapıldı. Elde edilen veriler Lai ve ark. (2012)'nin sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.7).

5. 3. Sonuç

Son yıllarda travma sonucu gelişen sinir hasarını tedavi etmek, çeşitli hastalıklar neticesinde gelişen sinir hasarları için koruyucu ve tedavi edici yöntemler geliştirmek, periferik sinir hasarından kaynaklanan hasta mağduriyetini gidermek, yapılan sağlık harcamalarını azaltmak ve periferik sinir hasarı tedavisinden yola çıkarak merkezi sinir sistemi hastalıklarını tedavi edici yollar geliştirmek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda öne çıkan en önemli teröpatik ajan adaylarından biri NGF olmuştur.

Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda NGF'in stabil olmaması, yüksek polipeptit yapıda olması, kan-beyin bariyerini geçememesi, hayvanlardan elde edildiği için bağışıklık sistemini hasarlı dokuya karşı aktive etme riski nedeniyle nörorejeneratif kullanım alanı kısıtlıdır. Bu nedenle rejeneratif etkisi en az NGF düzeyinde olabilecek, hasarlı bölgeye hızlı yüksek konsantrasyonda yoğunlaşabilecek ya da endojen NGF miktarını arttırabilecek, yeni biyoaktif maddeler aranmaktadır.

Yapılan uygulamalar sonucunda, *Hericium erinaceus* mantarının in vitro ortamda fare DKG' den primer kültürle elde edilen duysal nöronlar üzerinde mikrolazer hasarına karşı rejeneratif etkili olduğu belirlendi. Ayrıca AYM grubunda elde edilen veriler, bu mantarın sıcak su ekstraktının rejeneratif etkisinin NGF' inkinden çok daha yüksek olduğunu gösterdi.

Gelecekte, *Hericium erinaceus* mantarının sıcak su ekstraktının doku mühendisliği tarafından hazırlanan, biyolojik olarak vücutta metabolize olabilen sentetik polimer graflar aracılığıyla NGF yerine eksojen olarak pratikteki kullanımının rejenerasyonda alternatif bir tedavi oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu uygulamanın yanısıra, biyoaktif maddesinden faydalanarak hazırlanacak kapsül formunun hem periferik hem de merkezi sinir sistemi hastalarında tedavi desteği sağlama potansiyeli taşıdığı söylenebilir.

AYM'nin in vitro ortamdaki rejeneratif etkisi, tedavi amaçlı kullanılabilmesine yönelik umut verici bir fikir oluşturmaktadır. Ancak ekstraktın hayvan deneylerindeki terapötik etkinliğinin test edilmesine ve klinik faz çalışmaları ile desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

ÖZET

Ayhan P, İn vitro sinir hasarında sinir büyüme faktörü (NGF) ile aslan yelesi mantarının (*Hericium erinaceus*) rejeneratif etkilerinin karşılaştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2017. Periferik sinir hasarı çoğunlukla travmatik yaralanmalardan ileri gelir. Çoğu hasarın iyileşmesi için cerrahi girişim gerekir, yine de beklenen fonksiyonel iyileşme tam sağlanamaz. Yapısal ve fonksiyonel tam iyileşme sağlamak, hastaların yaşam kalitesini yükseltmek ve tedavi masraflarını azaltmak için yeni yöntem ve ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Aslan yelesi (*Hericium erinaceus*) mantarı (AYM) geleneksel Çin tıbbında gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde güçlendirici ilaç olarak ve Doğu Asya'da hafıza geliştirmek için kullanılır. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) periferik sinirlerde Schwann hücreleri, endotel hücreler ve immuno hemotopoetik sistem hücreleri tarafından salgılanır, hasarlı nöron ölümlerini azaltır ve akson rejenerasyonunu artırır. Bu çalışmanın amacı, in vitro ortamda fare dorsal kök gangliyon (DKG) nöronlarında mikrolazerle aksotomi hasar modeli oluşturmak, bu model üzerinde NGF ile AYM'nin rejeneratif etkilerini floresan boyama ve mikroskopik görüntüleme yöntemiyle karşılaştırmaktır. Çalışmada, AYM'nin sıcak su ekstraktı hazırlandı. Balb-C ırkı farelerden DKG nöronları elde edildi, petrilere ekildi, akson uzatmaları için 48 saat inkübatöre bırakıldı. Dört çalışma grubu oluşturuldu. Kontrol grubuna SF, NGF grubuna NGF, AYM grubuna AYM ekstraktı, AYM+NGF grubuna hem AYM ekstraktı hem de NGF uygulandı. Bir saat sonra canlı nöronlara PALM mikrolazer mikrodiseksiyon sisteminde aksotomi hasarı gerçekleştirildi. Petrilere 48 saat inkübatöre bırakıldı, petrilere floresan boya eklendi. Hasarlı nöronlar, floresan mikroskop sisteminde görüntülendi, bu nöronların hayatta kalma oranları hesaplandı, hasar verilen aksonların uzunlukları ölçüldü, gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Sonuç olarak hem AYM'nin hem NGF'nin hasarlı periferik duysal nöronlar üzerinde rejeneratif etkili oldukları, bununla birlikte AYM'nin rejeneratif kapasitesinin NGF'den daha güçlü olduğu saptandı. Buna göre AYM'nin periferik sinir yaralanmalarında terapötik etkisini belirlemek amacıyla prelinik ve klinik çalışmalar yapılabileceği önerilebilir.

Anahtar Sözcükler: Dorsal kök gangliyonu, *Hericium erinaceus*, sinir büyüme faktörü, aksotomi

SUMMARY

Ayhan P, Comparison of regenerative effects of lion's mane (*Hericium erinaceus*) mushroom and nerve growth factor (NGF) in vitro nerve injury, Van Yuzuncu Yil University, Institute of Health Sciences, Department of Biophysics, Thesis for Master of Science, Van, 2017. Periferic nerve damage mostly arises from traumatic injuries. Surgical intervention is required for most of the damage to heal, however, expected functional healing cannot be fully achieved. For structural and functional complete recovery, improving life quality of patients, reducing treatment costs, new methods and drugs are required. Lion's mane (*Hericium erinaceus*) mushroom (LMM) is used for the treatment of gastrointestinal disorders in traditional Chinese medicine and memory enhancement in Eastern Asia. Nerve Growth Factor (NGF) is secreted from Schwann cells in peripheral nerves, endothelial cells, and immune hematopoietic cells. It reduces damaged nerve deaths and increases axon regeneration. The aim of this study is to establish axotomy damage model with a laser microdissection system in mice dorsal root ganglion (DRG) neurons and to compare the regenerative effects of NGF and LMM on this model with fluorescent staining and microscopic imaging methods. LMM hot water extract was prepared in the study. DRG neurons were obtained from Balb-C mice and cultured to petri dishes and incubated to growth of axon for 48 hours. This study was consisted of four groups: Saline to control group, NGF to NGF group, LMM to LMM group, both LMM and NGF to LMM+NGF group. After one hour from treatment, axotomy damage was performed to live neurons with PALM micro-laser system. Petri dishes were incubated for 48 hours, and then fluorescent dyes were added. Damaged neurons were imaged with fluorescent microscope system. Survival rates of those neurons were calculated, the length of damaged axons was measured, and Groups were compared for these parameters. As a result, both LMM and NGF had regenerative effect on damaged peripheral sensory neurons, in addition regenerative capacity of LMM was found higher than that of NGF. According to these results, it should be suggested that preclinic and clinic studies can be conducted to the determine therapatic effect of LMM.

Key words: Dorsal root ganglion, Nerve growth factor, aksotomy

6. KAYNAKLAR

- Al-Ali H, Beckerman SR, Bixby JL, Lemmon VP (2017). In vitro models of axon regeneration. *J Expneurol.*, 287, 423-434.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *J.Pharmthera.*, 138,2, 155-175.
- Aloe L, Luisa Rocco M, Omar Balzamino B, Micera A (2015). Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. *Curr Neuropharmacol.*, 13,3, 294-303.
- Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, Manni L, (2012). Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J transl med.*, 10,1, 239.
- Aloe L (2004). Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends Cell Biol.*, 14,7, 395-399.
- Ambron RT, Zhang XP, Gunstream JD, Povelones M, Walters ET (1996). Intrinsic Injury Signals Enhance Growth, Survival and Excitability of Aplysia Neurons. *J neurosci.*, 16,23, 7469-7477.
- Auffray I, Chevalier S, Froger J, Izac B, Vainchenker W, Gascan H, Coulombel L (1996). Nerve Growth Factor is Involved in the Supportive Effect by Bone Marrow-Derived Stromal Cells of the Factor-Dependent Human Cell Line UT-7. *Blood*, 88,5, 1608-1618.
- Avtonomova A, Bakanov A, Shuktueva M, Vinokurov V, Popova O, Usov A, Krasnopol'skaia L (2012). Submerged Cultivation and Chemical Composition of Hericium Erinaceus Mycelium. *Antibiot Khimioter.*, 57,7-8, 7-11.
- Balan V, da Costa Sousa L, Chundawat SP, Vismeh R, Jones AD, Dale BE (2008). Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based biorefinery. *J Int Microbiol.*, 35,5, 293-301.
- Bandtlow CE, Heumann R, Schwab ME, Thoenen H (1987). Cellular Localization of Nerve Growth Factor Synthesis by in Situ Hybridization. *EMBO j.*, 6,4, 891-899.
- Barton MJ, John JS, Clarke M, Wright A, Ekberg J (2017). The glia response after peripheral nerve injury: A comparison between schwann cells and olfactory ensheathing cells and their uses for neural regenerative therapies. *Int j mol sci.*, 18,2, 287.
- Bastien D, Lacroix S (2014). Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. *JExpneurol.*, 258, 62-77.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A (1991). Neurotrophin-5: A Novel Neurotrophic Factor That Activates Trk and TrkB. *Neuron*, 7,5, 857-866.
- Bloom OE, Morgan JR (2011). Membrane Trafficking Events Underlying Axon Repair, Growth, and Regeneration. *Mol Cell Neurosci.*, 48,4, 339-348.
- Bonanomi D, Fornasiero EF, Valdez G, Halegoua S, Benfenati F, Menegon A, Valtorta F (2008). Identification of a Developmentally Regulated Pathway of Membrane Retrieval in Neuronal Growth Cones. *J cell sci.*, 121,22, 3757-3769.

- Bonini S, Lambiase A, Levi-Schaffer F, Aloe L (1999). Nerve Growth factor: an Important Molecule in Allergic Inflammation and Tissue Remodelling. *Int Arch Allergy Immunol.*, 118,2-4, 159-162.
- Bracci-Laudiero L, Aloe L, Caroleo MC, Buanne P, Costa N, Starace G, Lundeberg T (2005). Endogenous NGF Regulates CGRP expression in Human Monocytes, and Affects HLA-DR and CD86 Expression and IL-10 Production. *Blood*, 106,10, 3507-3514.
- Burnette DT, Ji L, Schaefer AW, Medeiros NA, Danuser G, Forscher P (2008). Myosin II Activity Facilitates Microtubule Bundling in the Neuronal Growth Cone Neck. *Dev cell.*, 15,1, 163-169.
- Burrige, K., ve Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac Take Center Stage. *Cell*, 116, 2, 167-179.
- Byrd, D. T., Kawasaki, M., Walcoff, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., ve Jin, Y. (2001). UNC-16, a JNK-Signaling Scaffold Protein, Regulates Vesicle Transport in *C. elegans*. *Neuron*, 32,5, 787-800.
- Campbell Neil A, Jane B. Reece.(2010) Biyoloji. Çev., Ertunç Gündüz, Ali Demirsoy ve İsmail Türkan, Palme Yayıncılık, Ankara
- Carroll P, Lewin GR, Koltzenburg M, Toyka KV, Thoenen H (1998). A Role for BDNF in Mechanosensation. *Nature neurosci.*, 1,1, 42-46.
- Cavalli V, Kujala P, Klumperman J, Goldstein LS (2005). Sunday Driver Links Axonal Transport to Damage Signaling. *J cell biol.*, 168,5, 775-787.
- Cengiz N, Öztürk G, Erdoğan E, Him A, Oğuz EK (2012). Consequences of neurite transection in vitro. *J neurotrauma.*, 29,15, 2465-2474.
- Chan CE, Odde DJ (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*, 322,5908, 1687-1691.
- Chang CH, Chen Y, Yew XX, Chen HX, Kim JX, Chang CC, Peng RY (2016). Improvement of erinacine A productivity in *Herichium erinaceus* mycelia and its neuroprotective bioactivity against the glutamate-insulted apoptosis. *J LWT.*, 65, 1100-1108.
- Chen ZY, Chai YF, Cao L, Lu CL, He C (2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rats. *Bres.*, 902,2, 272-276-2.
- Cohen N, Cohen J, Asatiani MD, Varshney VK, Yu HT, Yang YC, Wasser SP (2014). Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher Basidiomycetes mushrooms. *Intjmedmushr.*, 16,3.
- Cui FJ, Li YH, Zan XY, Yang Y, Sun WJ, Qian JY, Yu SL (2014). Purification and partial characterization of a novel hemagglutinating glycoprotein from the cultured mycelia of *Herichium erinaceus*. *Pro Biochem.*, 49,8, 1362-1369.
- Dammermann A, Desai A, Oegema K (2003). The minus end in sight. *Curr Biol.*, 13,15, 614-624.

- DeFrancesco-Lisowitz A, Lindborg J, Niemi J, Zigmond R (2015). The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. *JNeurosci.*, 302, 174-203.
- Dellon AL, Mackinnon SE (1988). An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast reconstr surg.*, 82,5, 849-856.
- Dubový P, Jančálek R, Kubek T (2013). Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. *Int. Rev. Neurobio.l*, 108, 173-206.
- Eik LF, Naidu M, David P, Wong KH, Tan YS, Sabaratnam V (2011). Lignosus rhinocerus (Cooke) Ryvarden: A medicinal mushroom that stimulates neurite outgrowth in PC-12 cells. *Evid Based Complement Alternat Med.*
- Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G, Katz DM (1996). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J neurosci.*, 16,17, 5361-5371.
- Evans SV (1993). SETOR: Hardware-lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules. *JMol Graph.*, 11,2, 134-138.
- Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM, Coughlin MD (2004). The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J neurochem.*, 89,3, 581-592.
- Fenrich K, Gordon T (2004). Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems—current issues and advances. *Can j Neurol sci.*, 31,2, 142-156.
- Fields R, Neale E, Nelson P (1990). Effects of patterned electrical activity on neurite outgrowth from mouse sensory neurons. *J Neurosci.*, 10, 9, 2950-2964.
- Franze K, Gerdelmann J, Weick M, Betz T, Pawlizak S, Lakadamyali M, . . . Käs J (2009). Neurite Branch Retraction Is Caused by a Threshold-Dependent Mechanical Impact. *Biophys J.*, 97,7, 1883-1890.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot.*, 65, 1, 1545-1560.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE (2003). Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food prot.*, 66, 10, 1811-1821.
- Friedman WJ, Greene LA (1999). Neurotrophin Signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res.*, 253,1, 131-142.
- Gartner LP, Hiatt JL (2006). *Color Textbook of Histology E-Book*: Elsevier Health Sciences Guyton, Arthur C., John E. Hall. *Tıbbi Fizyoloji. Çev.*, Hayrunnisa Çavuşoğlu, Berrak Çağlayan Yeğen. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2007.
- Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.*, 8,1, 110.

- Grinsell D, Keating C (2014). Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed res int*.
- Guyton AC, Hall JE (2007) *Tıbbi Fizyoloji*. 11. Baskı Çev., Hayrunnisa Çavuşoğlu, Berrak Çağlayan Yeğen Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Hanz S, Perlson E, Willis D, Zheng JQ, Massarwa R, Huerta JJ, Fainzilber M (2003). Axoplasmic Importins Enable Retrograde Injury Signaling in Lesioned Nerve. *Neuron*, 40, 6, 1095-1104.
- Hilaire C, Lucas O, Valmier J, Scamps F (2012). Neurotrophin-4 modulates the mechanotransducer Cav3. 2 T-type calcium current in mice down-hair neurons. *J Biochem.*, 441, 1, 463-471.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y (2010). Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. *Neuron*, 68, 4, 610-638.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu rev biochem.*, 72, 1, 609-642.
- Junqueira LC, Cosé C *Temel Histoloji*. Çev, Yener Aytekin ve Seyhun Solakoğlu. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006.
- Kater SB, Mattson MP, Cohan C, Connor J (1988). Calcium regulation of the neuronal growth cone. *Trends Neurosci.*, 11, 7, 315-321.
- Kawagishi H, Masui A, Tokuyama S, Nakamura T (2006). Erinacines J and K from the mycelia of *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 62, 36, 8463-8466.
- Kawagishi H, Ishiyama D, Mori H, Sakamoto H, Ishiguro Y, Furukawa S, Li J (1997). Dictyophorines A and B, two stimulators of NGF-synthesis from the mushroom *Dictyophora indusiata*. *Phytochemistry*, 45,6, 1203-1205.
- Kawagishi H, Shimada A, Hosokawa S, Mori H, Sakamoto H, Ishiguro Y, . . . Furukawa S (1996). Erinacines E, F, and G, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 37, 41, 7399-7402.
- Kawagishi H, Shimada A, Shirai R, Okamoto K, Ojima F, Sakamoto H, Furukawa S (1994). Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 35, 10, 1569-1572.
- Kawagishi H, Ando M, Sakamoto H, Yoshida S, Ojima F, Ishiguro Y, Furukawa S (1991). Hericenones C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 32, 35, 4561-4564.
- Kemp SW, Cederna PS, Midha R (2017). Comparative outcome measures in peripheral regeneration studies. *Expneurol.*, 287, 348-357.
- Kenmoku H, Shimai T, Toyomasu T, Kato N, Sassa T (2002). Erinacine Q, a New Erinacine from *Herichium erinaceum*, and its Biosynthetic Route to Erinacine C in the Basidiomycete. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 66, 3, 571-575.

- Kenmoku H, Sassa T, Kato N (2000). Isolation of erinacine P, a new parental metabolite of cyathane-xylosides, from *Hericium erinaceum* and its biomimetic conversion into erinacines A and B. *Tetrahedron Lett.*, 41, 22, 4389-4393.
- Kim JH, Ha HC, Lee MS, Kang JI, Kim HS, Lee SY, . . . Shim I (2007). Effect of *Tremella fuciformis* on the neurite outgrowth of PC12h cells and the improvement of memory in rats. *Biol Pharm Bull.*, 30, 4, 708-714.
- Kim SP, Nam SH, Friedman M (2013). *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom extracts inhibit metastasis of cancer cells to the lung in CT-26 colon cancer-transplanted mice. *J Agric Food Chem.*, 61, 20, 4898-4904.
- Kim SP, Moon E, Nam SH, Friedman M (2012). *Hericium erinaceus* mushroom extracts protect infected mice against *Salmonella Typhimurium*-induced liver damage and mortality by stimulation of innate immune cells. *J Agric Food Chem.*, 60, 22, 5590-5596.
- Kim SP, Kang MY, Kim JH, Nam SH, Friedman M (2011). Composition and mechanism of antitumor effects of *Hericium erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice. *J Agric Food Chem.*, 59, 18, 9861-9869.
- Kimura Y, Nishibe M, Nakajima H, Hamasaki T, Shimada A, Tsuneda A, Shigematsu N (1991). Hericerin, a new pollen growth inhibitor from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Agric Biol Chem.*, 55, 10, 2673-2674.
- Klesse LJ, Parada LF (1999). Trks: signal transduction and intracellular pathways. *Micro Res tech.*, 45, 4-5, 210-216.
- Kolodkin AL, Tessier-Lavigne M (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3, 6, a001727.
- Kolpak AL, Jiang J, Guo D, Standley C, Bellve K, Fogarty K, Bao ZZ (2009). Negative guidance factor-induced macropinocytosis in the growth cone plays a critical role in repulsive axon turning. *J Neurosci.*, 29, 34, 10488-10498.
- Kumar V, Mahal BA (2012). NGF—the TrkA to successful pain treatment. *J Pain Res.*, 5, 279.
- Lai PL, Naidu M, Sabaratnam V, Wong KH, David RP, Kuppusamy UR, Malek SNA (2013). Neurotrophic properties of the Lion's mane medicinal mushroom, *Hericium erinaceus* (Higher Basidiomycetes) from Malaysia. *Int j Medmushr.*, 15, 6.
- Lam YS, Okello EJ (2015). Determination of Lovastatin, 946; glucan, Total Polyphenols, and Antioxidant Activity in Raw and Processed Oyster Culinary-Medicinal Mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Agric. Biol. Chem.*, 5. 17, 2, 117-128.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, 66, 5, 967-979.
- Lankford KL, Letourneau PC (1991). Roles of actin filaments and three second-messenger systems in short-term regulation of chick dorsal root ganglion neurite outgrowth. *Cell Motil Cytoskeleton.*, 20, 1, 7-29.
- Lazarovici P, Marcinkiewicz C, Lelkes PI (2006). Cross Talk between the Cardiovascular and Nervous Systems: Neurotrophic Effects of Vascular Endothelial

Growth Factor (VEGF) and Angiogenic Effects of Nerve Growth Factor (NGF)-Implications in Drug Development. *Curr Pharm Des.*, 12, 21, 2609-2622.

Lee AC, Yu VM, Lowe JI, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE (2003). Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol.*, 184, 1, 295-303.

Lee EW, Shizuki K, Hosokawa S, Suzuki M, Sukanuma H, Inakuma T, Kawagishi H (2000). Two Novel Diterpenoids, Erinacines H and I from the Mycelia of *Herichium erinaceum*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 64, 11, 2402-2405.

Lee IK, Yun BS, Han G, Cho DH, Kim YH, Yoo ID. (2002). Dictyoquinazols A, B, and C, new neuroprotective compounds from the mushroom *Dictyophora indusiata*. *J Nat Prod.*, 65,12, 1769-1772.

Lee JS, Hong EK (2010). *Herichium erinaceus* enhances doxorubicin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.*, 297, 2, 144-154.

Lee KF, Chen JH, Teng CC, Shen CH, Hsieh MC, Lu CC, Chen CC (2014). Protective effects of *Herichium erinaceus* mycelium and its isolated erinacine A against ischemia-injury-induced neuronal cell death via the inhibition of iNOS/p38 MAPK and nitrotyrosine. *Int J Mol Sci.*, 15, 9, 15073-15089.

Li J, Lu L, Dai C, Chen K, Qiu J (2001). A comparative study on sterols of ethanol extract and water extract from *Herichium erinaceus*. *Chi J Chinese matmed.*, 26, 12, 831-834.

Li T, Lo YM, Moon B (2014). Feasibility of using *Herichium erinaceus* as the substrate for vinegar fermentation. *J LWT.*, 55, 1, 323-328.

Li W, Zhou W, Kim EJ, Shim SH, Kang HK, Kim YH (2015). Isolation and identification of aromatic compounds in Lion's Mane Mushroom and their anticancer activities. *Food Chem.*, 170, 336-342.

Li W, Zhou W, Lee DS, Shim SH, Kim YC, Kim YH (2014). Hericirine, a novel anti-inflammatory alkaloid from *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 55,30, 4086-4090.

Li W, Zhou W, Song SB, Shim SH, Kim YH (2014). Sterol fatty acid esters from the mushroom *Herichium erinaceum* and their PPAR transactivational effects. *J Nat Prod.*, 77, 12, 2611-2618.

Li Y, Zhang G, Ng TB, Wang H (2010). A novel lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom *Herichium erinaceum*. *BioMed Res Int.*

Liu Z, Wang Q, Cui J, Wang L, Xiong L, Wang W, Mao C (2015). Systemic Screening of Strains of the Lion's Mane Medicinal Mushroom *Herichium erinaceus* (Higher Basidiomycetes) and Its Protective Effects on A β -Triggered Neurotoxicity in PC12 Cells. *Intl J medmushr.*, 17,3.

Lowery LA, Van Vactor D (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 10,5, 332-343.

Ma A, Richardson A, Schaefer EM, Parsons JT (2001). Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130Cas. *Mol Biol Cell.*, 12,1, 1-12.

- Ma BJ, Zhou Y, Li LZ, Li HM, Gao ZM, Ruan Y (2008). A new cyathane-xyloside from the mycelia of *Herichium erinaceum*. *Z Naturforsch C.*, 63,10, 1241-1242.
- Mackinnon SE, Dellon AL (1988). *Surgery of The Peripheral Nerve*. Thieme Medical Publishers G.Thieme Verlag, New York
- Mearow KM (1998). The Effects of NGF and Sensory Nerve Stimulation on Collateral Sprouting and Gene Expression in Adult Sensory Neurons. *Exp Neurol.*, 151, 1, 14-25.
- Meldolesi J (2011). Neurite outgrowth: This process, first discovered by Santiago Ramon y Cajal, is sustained by the exocytosis of two distinct types of vesicles. *Brain Resrev.*, 66,1–2, 246-255.
- Mendell LM, Johnson RD, Munson JB (1999). Neurotrophin modulation of the monosynaptic reflex after peripheral nerve transection. *J Neurosci.*, 19,8, 3162-3170.
- Meyerhoff DJ, Mon A, Metzler T, Neylan TC (2014). Cortical gamma-aminobutyric acid and glutamate in posttraumatic stress disorder and their relationships to self-reported sleep quality. *Sleep*, 37,5.
- Mills LR (1991). Neuron-Specific and State-Specific Differences in Calcium Regulation. *Ann N Y Acad Sci.*, 639,1, 312-324.
- Minnone G, De Benedetti F, Bracci-Laudiero L (2017). NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response. *Int J Mol Sci.*, 18, 5, 1028
- Miyazawa M, Matsuda N, Tamura N, Ishikawa R (2008). Characteristic Flavor of Volatile Oil from Dried Fruiting Bodies of *Herichium erinaceus*. *J Essential Oilres.*, 20, 5, 420-423.
- Mizuno T (1999). Bioactive substances in *Herichium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers.(Yamabushitake), and its medicinal utilization. *Int J Med Mushr.*, 1, 2.
- Moalem G, Tracey DJ (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Resrev.*, 51, 2, 240-264.
- Moalem G, Xu K, Yu L (2004). T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neurosci.*, 129, 3, 767-777.
- Molinari WJ, Elfar JC (2013). The double crush syndrome. *J Hand Surg.*, 38, 4, 799-801.
- Mori K, Obara Y, Hirota M, Azumi Y, Kinugasa S, Inatomi S, Nakahata N (2008). Nerve growth factor-inducing activity of *Herichium erinaceus* in 1321N1 human astrocytoma cells. *Biol Pharm Bull.*, 31,9, 1727-1732.
- Myers JP, Santiago-Medina M, Gomez TM (2011). Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin–ECM interactions. *Dev Neurobiol.*, 71, 11, 901-923.
- Nagai K, Chiba A, Nishino T, Kubota T, Kawagishi H (2006). Dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine from *Herichium erinaceum* protects against ER stress-dependent Neuro2a cell death via protein kinase C pathway. *J Nutr Biochem.*, 17, 8, 525-530.
- Nave KA, Werner HB (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 503-533.

- Netscher D, Murphy K, Fiore NA (2012). Hand Surgery: Bölüm 70 Nerve compression syndrome. In: Townsend Sabiston Textbook of Surgery 19. Baskı; Beauchamp RD Evers BM, Mattox KL, editors. *Elsevier*. p. 1982-1984
- Nishi R, Berg DK (1981). Two components from eye tissue that differentially stimulate the growth and development of ciliary ganglion neurons in cell culture. *Journal Neurosci.*, 1, 5, 505-513.
- Oberlin C, Béal D, Leechavengvongs S, Salon A, Dauge MC, Sarcy JJ (1994). Nerve transfer to biceps muscle using a part of ulnar nerve for C5–C6 avulsion of the brachial plexus: Anatomical study and report of four cases. *J Hand surg.*, 19, 2, 232-237.
- Oğuz Kaval E (2009). "Sinir Rejenerasyonunda Şartlandırma Hasarı Etkisi ve Mekanizmasının Araştırılması." Doktora tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi
- Öge AE, Baykan B (2009). Nöroloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Parsons JT (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.*, 116, 8, 1409-1416.
- Perry Rotem BT, Doron-Mandel E, Iavnilovitch E, Rishal I, Dagan Shachar Y, Tsoory M, Fainzilber M (2012). Subcellular Knockout of Importin β 1 Perturbs Axonal Retrograde Signaling. *Neuron*, 75, 2, 294-305.
- Pfenninger KH, Laurino L, Peretti D, Wang X, Rosso S, Morfini G, Quiroga S (2003). Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci.*, 116, 7, 1209-1217.
- Phan CW, David P, Sabaratnam V (2017). Edible and medicinal mushrooms: emerging brain food for the mitigation of neurodegenerative diseases. *J Med Food.*, 20, 1, 1-10
- Phan CW, Lee GS, Hong SL, Wong YT, Brkljača R, Urban S, Sabaratnam V (2014). *Herichium erinaceus* cultivated under tropical conditions: isolation of hericenones and demonstration of NGF-mediated neurite outgrowth in PC12 cells via MEK/ERK and PI3K-Akt signaling pathways. *Food Funct.*, 5, 12, 3160-3169.
- Phan CW, Wong WL, David P, Naidu M, Sabaratnam V (2012). *Pleurotus giganteus* Nutritional value and in vitro neurite outgrowth activity in rat pheochromocytoma cells. *BMC Complement Altern Med.*, 12, 1, 1.
- Pollard TD, Borisy GG (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell*, 112, 4, 453-465.
- Qiu J, Cafferty WB, McMahon SB, Thompson SW (2005). Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. *J Neurosci.*, 25, 7, 1645-1653.
- Qu Y, Sun K, Gao L, Sakagami Y, Kawagishi H, Ojika M, Qi J (2012). Termitomycesphins G and H, additional cerebrosides from the edible Chinese mushroom *Termitomyces albuminosus*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 76, 4, 791-793.
- Raff MC, Whitmore AV, Finn JT (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science*, 296, 5569, 868-871.
- Raman J, Hariprasath Lakshmanan PAJ, Zhijian C, Vengadesh Periasamy PD, Naidu M, Sabaratnam V (2015). Neurite outgrowth stimulatory effects of myco synthesized

- auNPs from *Herichium erinaceus* on pheochromocytoma (Pc-12) cells. *Int J Nanomedicine.*, 10, 5853.
- Reichardt LF (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 361,1473, 1545-1564.
- Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X (2004). Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discov Today.*, 1, 2, 177-185.
- Roll-Mecak A, McNally FJ (2010). Microtubule-severing enzymes. *Curr Opin Cell Biol.*, 22, 1, 96-103.
- Sabaratnam V, Kah-Hui W, Naidu M, David PR (2013). Neuronal health–Can culinary and medicinal mushrooms help? *J Tradit Complement Med.*, 3, 1, 62-68.
- Santiago-Medina M, Gregus KA, Nichol RH, O’Toole SM, Gomez TM (2015). Regulation of ECM degradation and axon guidance by growth cone invadosomes. *Development*, 142, 486–496.
- Schubert D, LaCorbiere M, Whitlock C, Stallcup W (1978). Alterations in the surface properties of cells responsive to nerve growth factor. *Nature*, 273,5665, 718.
- Seddon H (1943). Three types of nerve injury. *Brain*, 66, 4, 237-288.
- Seow SLS, Naidu M, David P, Wong KH, Sabaratnam V (2013). Potentiation of neurotogenic activity of medicinal mushrooms in rat pheochromocytoma cells. *BMC Complement Altern Med.*, 13, 1, 157.
- Shang X, Tan Q, Liu R, Yu K, Li P, Zhao GP (2013). In Vitro Anti-Helicobacter pylori Effects of Medicinal Mushroom Extracts, with Special Emphasis on the Lion's Mane Mushroom, *Herichium erinaceus*. *Int J Med Mushr.*, 15, 2, 165-174.
- Shin JE, Cho Y, Beirowski B, Milbrandt J, Cavalli V, DiAntonio A (2012). Dual Leucine Zipper Kinase Is Required for Retrograde Injury Signaling and Axonal Regeneration. *Neuron*, 74, 6, 1015-1022.
- Suarez-Isla BA, Pelto DJ, Thompson JM, Rapoport SI (1984). Blockers of calcium permeability inhibit neurite extension and formation of neuromuscular synapses in cell culture. *Dev Brain Res.*, 14, 2, 263-270.
- Sunderland S (1951). A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*, 74, 4, 491-516.
- Sydor AM, Su AL, Wang FS, Xu A, Jay DG (1996). Talin and vinculin play distinct roles in filopodial motility in the neuronal growth cone. *J Cell Biol.*, 134, 5, 1197-1207.
- Symons MH, Mitchison TJ (1991). Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J Cell Biol.*, 114, 3, 503-513.
- Teng F, Bito T, Takenaka S, Yabuta Y, Watanabe F (2014). Vitamin B12 [c-lactone], a biologically inactive corrinoid compound, occurs in cultured and dried lion’s mane mushroom (*Herichium erinaceus*) fruiting bodies. *J Agric Food Chem.*, 62, 7, 1726-1732.
- Tojima T, Hines JH, Henley JR, Kamiguchi H (2011). Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nat Rev Neurosci.*, 12, 4, 191-203.

- Tojima T, Itofusa R, Kamiguchi H (2010). Asymmetric Clathrin-Mediated Endocytosis Drives Repulsive Growth Cone Guidance. *Neuron*, 66, 3, 370-377.
- Tsao B, Boulis N, Bethoux F, Murray B (2012) Trauma of the Nervous System, Peripheral Nerve Trauma. In: Daroff: Bradley's Neurology in Clinical Practice, 6. Baskı, 984-1001.
- Tsukamoto S, Macabalang AD, Nakatani K, Obara Y, Nakahata N, Ohta T (2003). Tricholomalides AC, new neurotrophic diterpenes from the mushroom *Tricholoma* sp. *J Nat Prod.*, 66, 12, 1578-1581.
- Wang K, Bao L, Qi Q, Zhao F, Ma K, Pei Y, Liu H (2015). Erinacerins C–L, isoindolin-1-ones with α -glucosidase inhibitory activity from cultures of the medicinal mushroom *Herichium erinaceus*. *J Nat Prod.*, 78, 1, 146-154.
- West A E, Greenberg ME (2011). Neuronal activity–regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3, 6, a005744.
- Westerink RHS, Ewing AG (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol.*, 192, 2, 273-285.
- Wong KH, Naidu M, David RP, Bakar R, Sabaratnam V (2012). Neuroregenerative potential of lion's mane mushroom, *Herichium erinaceus* higher Basidiomycetes, in the treatment of peripheral nerve injury (review). *Int J Med Mushr.*, 14, 5.
- Wong KH, Sabaratnam V, Abdullah N, Kuppusamy UR, Naidu M (2009). Effects of cultivation techniques and processing on antimicrobial and antioxidant activities of *Herichium erinaceus* extracts. *Food Technol Biotechnol.*, 47, 1, 47
- Worahar S, Lailerd N, Sivamaruthi BS, Wangcharoen W, Sirisattha S, Peerajan S, Chaiyasut C (2016). Evaluation of factors that influence the L-glutamic and γ -aminobutyric acid production during *Herichium erinaceus* fermentation by lactic acid bacteria. *J Food.*, 14, 1, 47-54.
- Wu J, Tokunaga T, Kondo M, Ishigami K, Tokuyama S, Suzuki T, Kawagishi H (2014). Erinaceolactones A to C, from the culture broth of *Herichium erinaceus*. *J Nat Prod.*, 78, 1, 155-158.
- Yamaguchi K, Uemura D, Tsuji T, Kondo K (1994). Stimulation of Nerve Growth Factor Production by Diterpenoids Isolated from Plants of *Euphorbia* Species. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 58, 9, 1749-1751
- Yamaguchi K, Sasano A, Urakami T, Tsuji T, Kondo K (1993). Stimulation of Nerve Growth Factor Production by Pyrroloquinoline Quinone and Its Derivatives in Vitro and in Vivo. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 57, 7, 1231-1233.
- Yang Q, Zhang XF, Van Goor D, Dunn AP, Hyland C, Medeiros N, Forscher P (2013). Protein kinase C activation decreases peripheral actin network density and increases central nonmuscle myosin II contractility in neuronal growth cones. *Mol Biol Cell.*, 24, 19, 3097-3114.
- Yew Keong C, Amini Abdul Rashid B, Swee Ing Y, Ismail Z (2007). Quantification and identification of polysaccharide contents in *Herichium erinaceus*. *Nutr Food Sci.*, 37, 4, 260-271.

Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP (1998). Neurotrophins, Neurones and Peripheral Nerve Regeneration. *J Hand Surg.*, 23, 4, 433-437.

Yu L, Reynaud F, Falk J, Spencer A, Ding YD, Baumlé V, Rudkin BB (2015). Highly efficient method for gene delivery into mouse dorsal root ganglia neurons. *Front Mol Neurosci.*, 8.

Zhang Z, Liu RN, Tang QJ, Zhang JS, Yang Y, Shang XD (2015). A new diterpene from the fungal mycelia of *Hericium erinaceus*. *Phytochemistry Lett.*, 11, 151-156.

Zhao J, Seereeram A, Nassar MA, Levato A, Pezet S, Hathaway G, Wood JN (2006). Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci.*, 31, 3, 539-548.

Ziv NE, Spira ME (1995). Axotomy induces a transient and localized elevation of the free intracellular calcium concentration to the millimolar range. *J Neurophysiol.*, 74, 6, 2625-2637.

Zochodne DW, Levy D (2005). Nitric Oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell Mol Biol.*, 51, 255-67

ÖZGEÇMİŞ

Peray AYHAN 1985 yılında Van' da doğdu. İlköğrenimini Hüsrev Paşa İlk Öğretim Okulunda 1999 yılında bitirdi. Lise öğrenimini 2003 yılında Milli Piyango Anadolu Lisesinde tamamladı. 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümününden mezun oldu.



EKLER

Ek 1. Etik Kurulu Kararı



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ
YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı <i>Title of the Research</i>	<i>In Vitro Sınav Hasarında Sınav Büyüme Faktörü ile Aslan Yeleli Mantarın (Herichromyces) Rejeneratif Etkilerinin Karşılaştırılması</i>	
Araştırmacı(lar) <i>Investigator(s)</i>	Yürütücü / <i>Chief investigator</i> : Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÜSTÜN Yardımcı Araştırmacı(lar) / <i>Co-investigator(s)</i> : Biyolog Peray AYILAN	
Araştırmanın Başlama Tarihi / <i>Research Starting Date</i>	01/06/2014	
Araştırmanın Bitiş Tarihi / <i>Research Completion Date</i>	01/06/2017	
Proje Süresi / <i>Total Time of Project</i>	36 ay	
Proje No / <i>Project Number</i>	2014-SBE-YL148	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / <i>Funding institution(s) (if available)</i>	YYÜ BAP	
Destek Şekli ve Miktarı / <i>Type and amount of funding</i>	Y. Lisans Tez Projesi / 11.000 TL	
Karar:	Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 03/08/2017 tarih ve 2017/07 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 03/08/2017 (decision number 2017/07).	
	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE ÜYE	ÜYE
Prof. Dr. Fazıl ŞEN ÜYE	Prof. Dr. Süddik KESKİN ÜYE	Prof. Dr. Şimşek DENİZ ÜYE
 Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL ÜYE	 Doç. Dr. A. İzzet DÜRSÜZ ÜYE	Doç. Dr. Nalan ÖZDAL ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Yücel BAŞBUĞAN ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Özer ALKAN ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Caner Yılmaz DEMİR ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Özgür ALLALİVERDİYEV ÜYE	Zir. Mah. Kanan YILDIRIMOĞLU ÜYE
 Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET ÜYE		

Ek 2. Denev Hayvanları Kullanım Sertifikası

