

TC.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL PERİFERİK NÖROPATİDE ASLAN YELESİ
MANTARININ (*HERICIUMERINACEUS*) REJENERATİF
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Mustafa ADEN
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ramazan ÜSTÜN

VAN-2018

TC.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL PERİFERİK NÖROPATİDE ASLAN YELESİ
MANTARININ (*HERICIUMERİNACEUS*) REJENERATİF
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Mustafa ADEN
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ramazan ÜSTÜN

VAN-2018

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2014-SBE-YL149 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
İçindekiler.....	III
Simgeler ve Kısaltmalar.....	V
Teşekkür.....	VI
Şekiller Listesi.....	VII
Tablolar Listesi.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sinir Sisteminin Organizasyonu	3
2.2. Periferik Sinir Sistemi ve İşlevi	4
2.3. Periferik Sinir Sisteminde Hücreler	6
2.3.1. Sinir hücreleri (Nöronlar).....	6
2.3.2. Schwann hücreleri.....	9
2.3.3. Fibroblastlar.....	11
2.4. Periferik Nöropati.....	11
2.4.1. Waller dejenerasyonu.....	14
2.4.2 Aksonal dejenerasyon.....	14
2.4.3. Segmental demiyelinizasyon.....	15
2.5. Periferik Sinirlerde Aksonal Rejenerasyon.....	15
2.5.1. Sinir rejenerasyonunda nörotrofinler.....	16
2.5.2. Sinir büyüme faktörü (NGF).....	17
2.6. Tıbbi Mantarlar.....	19
2.6.1. Aslan yelesi mantarı (AYM).....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereç.....	23
3.1.1. Hayvan materyali.....	23
3.1.2. Kimyasal ve sarf malzemeler.....	23

3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Aslan yelesi mantar ekstraktının hazırlanması.....	24
3.2.2. Çalışma grupları.....	24
3.2.3. Periferik nöropati ve terapötik etkinin değerlendirilmesi.....	25
4. BULGULAR.....	28
4.1. Canlı Ağırlık Bulguları.....	28
4.1.1. Sisplatin + AYM grubu.....	28
4.1.2. Sisplatin grubu.....	28
4.1.3. Sham-Kontrol grubu.....	28
4.1.4. Canlı ağırlık ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması.....	29
4.2. Elektromiyografik Bulgular.....	30
4.2.1. Başlangıç latansı.....	30
4.2.2. Bileşik kas aksiyon potansiyeli.....	31
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	32
4.3.1. P III tubulin bulguları.....	32
4.3.2. Nörofilamentbulguları.....	32
4.3.3. Miyelin bulguları.....	33
4.3.4. S100 bulguları.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
ÖZET.....	42
SUMMARY.....	43
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	54
EKLER.....	55
EK 1. İntihal Raporu.....	55
EK 2. Etik Kurul Raporu.....	56

ŞİMGELER VE KISALTMALAR

DRG	: Dorsal kök gangliyonu
AYM	: Aslan yelesi mantarı
BDNF	: Beyin kökenli nörotrofik faktör
BKAP	: Bileşik kas aksiyon potansiyeli
CIPN	: Cisplatin kaynaklı periferik nöropati
CNTF	: Sillier nörotrofik faktör
ECM	: Ekstra selüler moleküller
EMG	: Elektromiyografi
ERK	: Hücre dışı düzenlenmiş kinaz
g	: Gram
GDNF	: Glial hücre kökenli faktör
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
(İlil	: Mikrometre
mDNA	: Mitokondriyal deoksiribo nükleik asit
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MSS	: Merkezi sinir sistemi
EMG	: Elektromiyografi
NF-B	: Nükleer faktör kappa B
NT-3	: Nörotrofin3
P75NTR	: Pan-neurotrophin reseptörü
PBS	: Fosfat tuz tamponu
PI3K-Akt	: Fosfatidil inositol 3-kinaz
PSS	: Periferik sinir sistemi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
S100	: Schwann hücre belirteci
TNC	: Tenascin-C
TrkA	: Tirozin kinazA

TEŐEKKÖR

Bu araŐtırmanın planlanması, yÖrÖtÖlmesi ve kaleme alınması sÖreçlerinde bana rehberlik yapan saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ramazan ÜSTÖN'e, laboratuvar çalıŐmalarında yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlileri AyŐe ŐEKER ve Filiz TAŐPINAR'a, immunohistokimya uygulamalarında yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Elif KAVAL OđUZ'a, istatistik analize katkılarından dolayı Prof. Dr. Sıddık KESKİN'e, projemize mali destek sağlayan Van YÖzÖncÖ Yıl Öniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme ve dostlarıma teŐekkÖr ederim.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Periferik sinirin kesitsel görünümü.....	4
Şekil 2.	Motor nöronun yapısı.....	7
Şekil 3.	Sisplatinin periferik nöropati oluşturma mekanizması	13
Şekil 4.	Mantarların nörorejeneratif etkilerine ilişkin hipotetik mekanizması.....	22
Şekil 5.	Farklı gruplara ait haftalık ortalama canlı ağırlık değişim grafiği.....	30
Şekil 6.	Sisplatin uygulaması ve AYM tedavisinin siyatik sinir latans değerine etkisi.....	31
Şekil 7.	Sisplatin ile AYM'nin Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli (BKAP) üzerine etkisi.....	32
Şekil 8.	Siyatik sinir kesitlerde akson iskelet yapısını oluşturan P III Tubulin ve Nörofilament yapılarının konfokal mikroskopik görüntüsü.....	34
Şekil 9.	Siyatik sinir kesitlerden miyelin belirteci MBP ve Schwann hücre belirteci S100 proteininin konfokal mikroskopik görüntüsü.....	35

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Sarf malzeme listesi.....	23
Tablo 2.	Canlı ağırlık için tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları....	29
Tablo 3.	Elektromiyografik ölçümlerin tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.....	31

1. GİRİŞ

Yeni iç ve dış olayları tespit etme ve bunlara cevap verme yeteneği, hızla değişen bir çevrede yaşamı sürdürmek için önemlidir (Ranganath ve Rainer, 2003). Diğer taraftan zararlı uyaranları tespit etme yeteneği, bir organizmanın hayatta kalması ve esenliği için zorunlu bir gereksinimdir (Basbaum ve ark., 2009). Bu bağlamda sinir sistemi, duyu organlarından milyonlarca bilgi alır, vücudu etkileyen iç ve dış çevresel değişiklikleri tespit eder, edindiği bilgileri işler, uygun cevabı verebilmek için gereken yanıtları oluşturur, endokrin sistemle birlikte çalışarak uyaranlara en doğru tepkiyi gösterir, böylece organizma on yıllarca fizyolojik yaşamını sürdürür (Ullsperger ve ark., 2014).

Kanser, dünya genelinde hızla artan en tehlikeli hastalıklardan biridir. Kalp hastalığından sonra ölümlerin en önemli ikinci nedenidir (Babaei ve ark., 2018). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporuna göre erkeklerde en sık görülen kanser türleri akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri iken, kadınlarda en sık meme, kolorektal, akciğer, serviks ve mide kanser türleri görülmektedir. 2015 yılında ölümlerle sonuçlanan kanser vakası 8,8 milyon olmuştur (<http://www.who.int/cancer/en/>).

Kemoterapi, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ilaçların kullanılmasıdır. Platin bazlı kemoterapi ilaçları (örn., sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin), çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için kullanılmaktadır (Podratz ve ark., 2011). Bu ilaçların kanser tedavisinde yüksek başarı göstermesi, hastaların hayatta kalma oranlarında önemli artış sağlamıştır (Seretny ve ark., 2014). Platin bazlı ajanlar DNA iplikçik kırılmasına ve hücrel apoptoza yol açan sitotoksik bileşiklerdir (Poggio ve ark., 2018). Bununla birlikte, bu ilaçların doz sınırlayıcı yan etkilerinden biri de, kemoterapiyle kanserden kurtulan pek çok kişinin, kemoterapinin neden olduğu periferik nöropati nedeniyle yaşam kalitesinin düşmesidir (Podratz ve ark., 2011; Podratz ve ark., 2016). Klinik olarak periferik nöropati, duysal, motor ve otonomik fonksiyonları olumsuz etkilemektedir (Park ve ark., 2000), ve tüm uzmanlık alanlarındaki hekimlerin karşılaştığı en yaygın nörolojik rahatsızlıklardan biridir (Watson ve Dyck, 2015). Kemoterapiye bağlı periferik nöropati (CIPN), tedavi sürecindeki kanser hastalarının % 70'ini etkileyen, el ve ayaklarda ağrı, uyuşukluk, karıncalanma ve duysal kayıplar oluşturan, zayıflatan, güçten düşüren, kanser tedavisinin majör yan etkisidir (Maj ve ark., 2017).

Platin bazlı kemoterapötik ajanlardan sisplatin, Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaçlar listesinde yer alır. Baş, boyun, küçük hücreli akciğer kanseri, testis, yumurtalık, beyin ve mesane dahil olmak üzere çeşitli katı tümörlü hastaların tedavisinde kullanılmaktadır (Dasari ve Tchoumvou, 2014; Starobova ve Vetter, 2017). Sisplatin, hastaların % 30'unda ciddi akut ve kronik periferik nöropatlere neden olur (Podratz ve ark., 2011). Günümüzde, ne yazık ki sisplatin'in yol açtığı nörotoksisiteyi önleyen veya tedavi eden farmakolojik ajan bulunmamaktadır (Maj ve ark., 2017). Bu yüzden kanser hastalarında kemoterapi dozunun ve/veya uygulama sıklığının azaltılması nedeniyle hastaların tedavi etkinliği azalmakta ya da periferik nöropati patolojisi ilerleyerek geri dönüşümsüz sinir fonksiyon kayıpları baş göstermektedir. Günümüzde bir yandan yan etkisi az, terapötik etkisi güçlü molekül arayışları devam ederken, diğer yandan bitkilerden ekstrakte edilen biyoaktif maddeler üzerindeki araştırmalar sürdürülmektedir (Babaei ve ark., 2018). Aslan Yelesi Mantarının (AYM) (*Hericium erinaceus*) antikarsinojenik etkisinin olduğu (Lee ve ark., 2017), sinir ve beyin sağlığı ile ilgili terapötik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2018).

Bu çalışmada önemli bir klinik sorunun tedavisine katkı sunmak amacıyla hayvan türü olarak kemoterapiye duyarlı BALB/c ırkı fareler seçildi, deneysel periferik nöropati modeli oluşturuldu. AYM'nin sıcak su ekstraktı hazırlandı, deneysel periferik nöropati modeli üzerinde, AYM'nin rejenerasyon ve restorasyon yeteneği, morfolojik (immunhistokimya) ve elektrofizyolojik (elektromyografi) (EMG) testlerle araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Sinir Sisteminin Organizasyonu

Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi (MSS), periferik sinir sistemi (PSS) ve otonom sinir sistemi (OSS) olmak üzere üç bölüme ayrılır. Sinir sisteminin alt bölümlere ayrılması biraz sunidir. Çünkü sinir sisteminin tüm unsurları, net sınırlara sahip olmayan bir şekilde birlikte çalışırlar. Yine de, alt bölümlerin geleneksel tanımları, beyin ve bağlantıları hakkında konuşmak için yararlı bir çerçeve sağlar ve sadece bu nedenle önemlidir (Boron ve Boulpaep, 2016).

MSS, beyin ve omurilikten oluşur, meninks tabakaları olarak adlandırılan üç “zar” ile kaplıdır. Dış zar dura mater, orta zar araknoid, ve hassas iç zar pia mater olarak isimlendirilir. MSS içinde, benzer işlevleri paylaşan bazı nöronlar nükleus (çekirdek) adı verilen kümeler halinde gruplandırılır (Boron ve Boulpaep, 2016). MSS'nin son organlar ile iletişimi ise PSS ile sağlanır. PSS'de aferent lifler gelişmiş reseptör sistemleri ile çevreden alınan uyarıları MSS iletirlerken, eferent lifler ise MSS'nin çeşitli kademelerinde oluşan uyarıları son organlara iletmektedir (Taner, 2017).

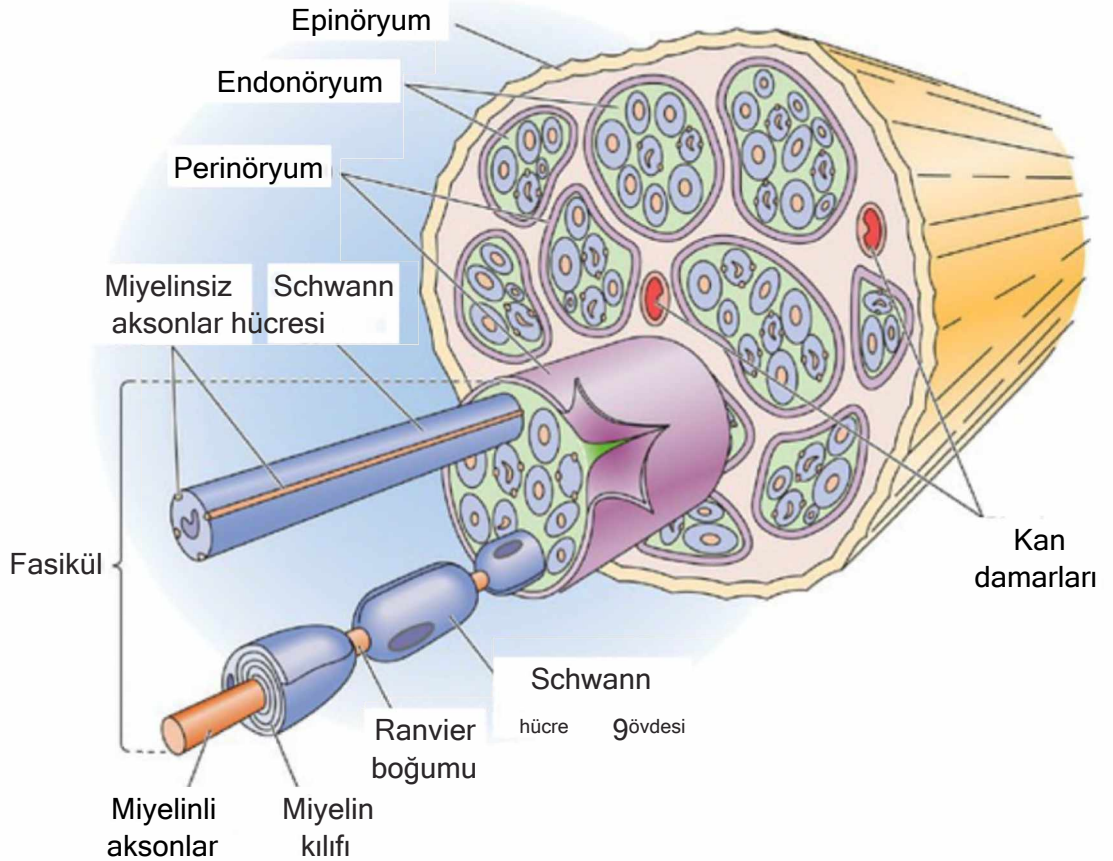
PSS, dura mater dışında kalan sinir sisteminin parçalarından oluşur. Bu bölüm çeşitli uyarılar için duysal reseptörler, spinal ve kranial sinirlerin periferik kısımları ve otonom sinir sisteminin tüm periferik kısımlarını içerir. Periferden MSS'ne mesajlar taşıyan duysal sinirlere aferent sinirler denir. Tersine, MSS'den periferik dokulara mesajları taşıyan periferik motor sinirlere eferent sinirler denir. Periferik gangliyonlar, MSS'nin dışında bulunan küçük düğümler veya kümeler içerisine yoğunlaşmış sinir hücreleri topluluğudur (Boron veBoulpaep, 2016).

OSS kalp hızı, kan basıncı, sindirim, sıcaklık ayarı ve üreme fonksiyonu dahil olmak üzere iç organlara ait (viseral) fonksiyonları düzenleyen ve kontrol eden sinir sistemi bölümüdür. OSS işlevsel olarak ayrı bir sistem olmasına rağmen, anatomik olarak MSS ve PSS kısımlarından oluşur. Viseral kontrol, periferden MSS'ne mesajlar gönderen viseral aferent (duysal) nöronlardan, bu girişi alan MSS'deki kontrol merkezleri ve viseral

eferent (motor) çıktısından oluşan refleks yaylar ile sağlanır. Ayrıca, viseral aferent lifler genel olarak visseral eferent liflerle birlikte seyahat eder (Boron ve Boulpaep, 2016).

2.2. Periferik Sinir Sistemi ve İşlevi

PSS, MSS dışında uzanan ve Schwann hücreleri ve/veya satellit hücreleri ile bağlantılı motor, duysal ve otonom nöron kümeleri (gangliyon) ve periferik sinirlerden teşekkül etmiş bölümdür. Bu sistem dorsal ve ventral spinal kökleri, omurilik sinirlerini ve kranial sinirleri, duysal gangliyonları (dorsal kök gangliyon, nodoz gangliyon v.b), duysal (reseptör sonlanmaları) ve motor (akson) terminalleri ve otonom sinir sistemi kısımlarını içerir (Jortner, 2011). Periferik sinir sistemi, periferdeki bilgiyi merkezi sinir sistemine aktarır, beyin ve omurilikte üretilen motor komutları periferde yerine getirir (Kandel ve ark., 2013).



Şekil 1. Periferik sinirin kesitsel görünümü (Boron ve Boulpaep, 2016'dan uyarlanmıştır)

Periferik sinirler, dıştan “epinöryum” olarak bilinen kalın fibröz bir bağ doku ile sarılmıştır. Onun altında sinir fasiküllerini çevreleyen “perinöryum” yer alır. Her bir sinir lifi (akson) ise “endonöryum” olarak adlandırılan fibroblast ve kollajen lifleri ile daha ince bir bağ dokusu tarafından örtülmüştür. Endonöryumun altında periferik sinir liflerini saran Schwann hücreleriyle birlikte nörelemma kılıfı bulunur (Menorca ve ark., 2013) (Şekil 1).

Periferik sinirler duyuşal, motor ve otonom sinir liflerini içerir. Bu lifler; miyelinli lifler ve miyelinsiz liflerden olmak üzere iki gruba ayrılır (Sullivan ve ark., 2016). Miyelinli sinir liflerinde, merkezi sinir sistemindeki oligodendrositlere eşdeğer olan schwann hücreleri aksonu sararak miyelin kılıfı oluştururlar. Miyelinli sinir liflerinde miyelin segmentleri ranvier boğumları ile birbirinden ayrılır (Jortner, 2011). Miyelin, sinir impulslarının etkin ve hızlı iletimi için gereklidir. Miyelin kılıfının kalınlığı, miyelinasyon ve olgunlaşmanın bir simgesidir (Song ve ark., 2017). Miyelin, aynı çaptaki miyelinsiz aksonlara kıyasla sinir iletimini 20 ila 100 kat hızlandırır. Miyelinli periferik sinir lifleri Schwann hücreleri tarafından sarılmıştır (Nave ve Werner, 2014).

Tipik bir iskelet kası, hücre gövdeleri beyin sapı ve omurilikte motor çekirdek olarak adlandırılan ayrı bir kümede bulunan yaklaşık yüz büyük miyelinli motor nöron tarafından kontrol edilir. Her motor nörona ait akson, omuriliği ventral kök alanından spinal sinir (beyin sapı ventral kök alanından kraniyal sinir) aracılığıyla terk eder, kontrol ettiği kasın içine girene kadar periferik sinirlerin gittikçe daha küçük dalları olarak hedef kasların içine girer. Motor nöron ile hedef kas lifi arasındaki fonksiyonel bağlantı, son plak olarak adlandırılan kimyasal bir sinaptır. Aynı motor nöron tarafından innerve edilen tüm kas lifleri, motor nöronun her bir aksiyon potansiyeline sadık bir şekilde ve eşzamanlı olarak cevap verir (Kandel ve ark., 2013).

Deriden, kaslardan, ekstremitelerden, eklemlerinden ve gövdeden gelen bilgileri omuriliğe ileten duyuşal nöronlar, omuriliğe hemen komşu olan vertebral kolon içindeki dorsal kök gangliyonlarında kümelenmişlerdir. Dorsal kök ganglion nöronları ekstremitelerden ve gövdeden gelen tüm somatoduysal bilgiyi merkezi sinir sistemine taşımaktadır. Kranial yapılardan (yüz, dudak, ağız boşluğu, konjonktiva ve dura mater) gelen somatoduysal bilgi, fonksiyonel ve morfolojik olarak dorsal kök ganglion

nöronların yerini tutan trigeminal duyu nöronları tarafından iletilir. Bu nöronlar psödo-unipolar nöronlardır; merkezi ve periferik dallar olmak üzere iki kola ayrılmış aksonları vardır. Periferik dal deride, kasta veya diğer dokularda serbest sinir sonlanması veya özelleşmiş reseptörler olarak (kas iğciği, golgi tendon organı, ayırt edici dokunma, basınç, ağrı, kaşıntı, sıcak, soğuk, ışık, ses, tat, koku gibi) sonlanır. Bu reseptörler doğal uyarılara duyarlıdır. Aksonun merkeze (omurilik veya beyin sapma) uzanan dalı periferden gelen somatoduysal bilgiyi merkezi sinir sistemine iletir (Kandel ve ark., 2013).

Dorsal kök gangliyonların bireysel nöronları, periferik terminallerinin morfolojik ve molekül er uzmanlaşmasından dolayı belirli uyaran tiplerine seçici olarak yanıt verirler. Kapsüllü reseptörlere (terminallere) sahip dorsal kök gangliyon nöronları dokunma ve derin duyu (propriyosepsiyon) modalitelerine yanıt verirler. Mekanoreseptörler ve proprioseptörler, aksiyon potansiyellerini hızla gerçekleştiren geniş çaplı, miyelinli aksonlara sahip dorsal kök ganglion nöronları tarafından innerve edilir. Termal reseptörler ve nosiseptörler ise, miyelinsiz veya zayıf miyelinli küçük çaplı aksonlara sahiptir, bu sinirler mesajları daha yavaş iletir (Kandel ve ark., 2013).

Periferik sinir sistemi merkezi sinir sistemi ile karşılaştırıldığında otonom olarak daha sağlam kendini rej enere etme yeteneğine sahiptir. Rejenerasyon gücü hasar tipi ve kapsamı, hasar onarımının zamanı ve şekli, hastanın geniş kapsamlı durumu durumu gibi pek çok faktöre bağlıdır (Wang ve ark., 2017a). Periferik sinir sisteminin Schwann hücreleri, hasar sonrası sinir rejenerasyonunu destekler (Gordon ve English, 2016).

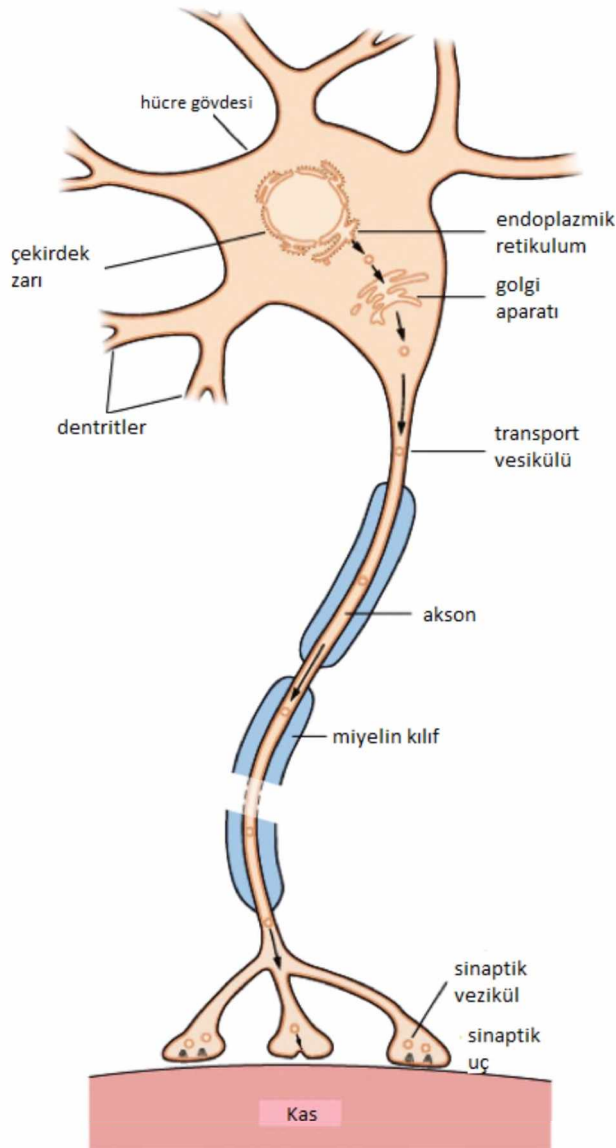
2.3. Periferik Sinir Sisteminde Hücreler

2.3.1. Sinir hücreleri (Nöronlar)

Tipik bir nöronun morfolojik olarak tanımlanmış dört bölgesi vardır: (1) Hücre gövdesi (soma), (2) dendritler, (3) akson ve (4) presinaptik terminaller. Hücre gövdesi veya soma, hücrenin metabolik merkezidir. Nükleus hücrenin genlerini içerir. Dendritler, ağaç benzeri bir tarzda dışarıya yayılır, diğer sinir hücrelerinden gelen sinyalleri almak için özelleşmiş yapılardır. Akson, hücre gövdesinden uzak mesafelere uzanır, hedef nöron, doku ve organlara sinyal iletir (Şekil 2). Bir akson, elektrik sinyallerini 0,1 mm ile 2 m arasında değişen mesafelere 0,5 m/s ile 120 m/sn hız aralığında iletir. Aksiyon

potansiyelleri olarak adlandırılan bu elektriksel sinyaller, aksonun başlangıç segmenti denilen, özel bir tetikleme bölgesi olan akson hilux'undan başlatılır (Kandel ve ark., 2013).

Nöronlar, vücudun uzak bölgelerindeki diğer hücrelerle hassas ve hızlı iletişim kurma yeteneğine sahiptir. Nöronlara bu yeteneği iki özellik verir. İlk olarak, yüksek derecede morfolojik ve fonksiyonel asimetriye sahiptirler: Nöronlar bir uçta alıcı dendritlere, diğer uçta bir verici aksone sahiptirler. Bu düzenleme, tek yönlü nöronal sinyalleme için yapısal temeldir. İkincisi, nöronlar hem elektriksel hem de kimyasal olarak uyarılabilirler (Kandel ve ark., 2013; Pfaff ve Volkow, 2016) (Şekil 1).



Şekil 2. Motor nöronun yapısı (Kandel ve ark., 2013'ten uyarlanmıştır)

Bir nöron, uzun mesafeler boyunca hücre gövdesinden hedef dokuya elektrik sinyalleri ileten tek bir akson geliştirir (Shin ve Cho, 2017). Hücre iskeleti esas olarak mikrofilamentler, mikrotübüller, aktin ve ara filamenderden oluşur (Namgung ve ark., 2004). Nörofondamentler aksonlara mekanik güç kazandırır (Kang ve ark., 2014). Periferik sinir sisteminde büyük çaplı aksonların çaplarını korumak için nörofondamentler gereklidir (Pisciotta ve ark., 2015).

Mikrotübüller (MT), nörofilament proteinlerden daha büyük yapılardır. Çapı yaklaşık 25 nm'dir. Mikrotübüller ayrıca aksonlara mekanik destek sağlar, aksonal transport için motor proteinler tarafından kullanılan temel yapılardır (Kang ve ark., 2014). MT, a- ve P-tubulin polimerleri olup, duvarları baştan kuyruğa kadar a- ve P-tubulin heterodimer dizilerinden oluşan 13 protofilamentten meydana gelmiştir. Büyüme ve büzülme aşamaları arasında geçiş yapma yeteneğine sahiptir (dinamik kararsızlık) (Kandel ve ark., 2013; Murillo ve Sousa, 2018; Sullivan ve ark., 2016). Uçlarındaki dengesizliğe rağmen, mikrotübüller serttir ve önemli uzunluklara kadar büyüyebilir. Özelliklerini ve işlevlerini ayarlayan moleküler motorlar (kinesinler ve dynein) dahil olmak üzere çoklu mikrotübül ile ilişkili proteinlerle (MAP) etkileşirler (Murillo ve Sousa, 2018). Sentrozomun, aksonlardaki yeni mikrotübüllerin tek oluşumu olduğu düşünülmektedir, bu da tüm aksonal mikrotübüllerin hücre gövdesinden kaynaklandığı ve aksonlara aksonal transport mekanizmalarıyla taşındığı anlamına gelir. Nöronal mikrotübüller, nöronal polarizasyon, aksonal transport, akson büyümesi ve rejenerasyonda anahtar rol oynar (Murillo ve Sousa, 2018). MTTer içi boş, küçük tüpçüklüdür. Akson ve dendritlerin, büyüme ve yapısal devamlılıkları için MTTerin düzenlenmesine ihtiyaç vardır. MTTer aksonlar içerisinde tek yönlü olarak uzunlamasına yerleşirler. Bir ucu hücrenin gövdesinde, diğeri ucu ise akson sonuna kadar uzanır. Dendritlerdeki MTTer düzensiz veya daha dağınık yapıdadırlar (Baas ve Yu, 1996).

MTTerin genel işlevleri

1. Dinamik bir hücre yapısı oluşturur.
2. Hücre bölünmesi (mitoz) sırasında kromozomların kutuplara çekilmesini sağlarlar.

3. Sinir hücrelerinde sinir ileticilerinin ve organellerin hücre içinde taşınmasını - yer değiştirmesini sağlarlar. Sinir ileticisi taşınmasıyla sinapsların gücünü belirlerler.

4. Dendritlerin sap kısımlarının şeklini değiştirirler. Genişler, büzülürler ve yapıyı değiştirirler.

5. Sinir hücrelerinin gelişimi ve bozulmasında etkilidirler (Jibu ve ark., 1994).

MTTerin iki ucunun kutuplanması farklıdır. Polimer uçlarının biri “pozitif” uç, diğer bölge ise “negatif” uç olarak tanımlanır. MT’lerin polarizasyonu uçlarla sınırlı değildir. Aksonun uzunluğu boyunca, alfa ve beta alt birimlerin örüntü farklılığından dolayı, kutuplanma aslında MT’ün boylu boyunca uzanır. Kutuplu durum “moleküler motor” denilen taşıyıcı proteinler tarafından tanınır ve MTTerin yüzeyi ile reaksiyona girerler. Bu motor proteinler, MT’nin negatif ve pozitif uçlarının her ikisine doğru hareket eder (Baas, 1999; Baas ve ark., 1988).

MAP’ler, tübülünlerle bağlantılı hücresel proteinlerdir. MAPTerin, komşu MT’ler arası uzaklığı ayarladıkları ve diğer hücresel iskelet birimleri arasında etkileşimleri sağladıkları düşünülmektedir (Mohan ve John, 2015).

Nörofilamentler, mikrotübüller ve mikrofilamanlar arasında bir boyuttadırlar, çok yüksek gerilme mukavemetine sahip esnek halat benzeri polimerlerdir. Bu polimerler, yaklaşık 10 nm iç çap genişliğine sahiptir ve bir araya gelen çoklu nöronal ara filament proteinlerinden oluşur. Memelilerde bu proteinler, periferik nöronlarda farklı gen ürünleri olan nörofilament triplet protein (L, M ve H, sırasıyla düşük, orta ve yüksek moleküler ağırlık) tiplerini içerir. Bu proteinlerin filament içinde nasıl organize edildiği iyi anlaşılmamıştır. Nörofilamentlerin kesin bileşimi hem gelişim sırasında hem de farklı nöronal hücre tipleri arasında mekansal olarak değişir (Kang ve ark., 2014; Pisciotta ve ark., 2015; Shin ve Cho, 2017).

2.3.2. Schwann hücreleri

Schwann hücreleri, periferik sinir liflerini saran, periferik sinir sisteminin gelişimi, bakımı ve rejenerasyonu için çok önemli hücrelerdir (Şekil 1), bu hücreler periferik sinirlerin etrafında miyelin üretirler, sinir liflerinin etrafını kuvvetle kat kat sararak miyelin kılıfı oluştururlar, miyelin kılıf segmentleri Ranvier boğumları ile

birbirinden ayrılmıştır, mesaj sinyalleri bu boğumlardan sıçrayarak ilerler, dolayısıyla “miyelin” aksiyon potansiyellerinin hızla yayılmasını sağlar (Jortner, 2011; Rosso ve ark., 2017) (Şekil 2). Yaralanan sinirlerin rejenerasyonu, Schwann hücrelerinin hasara verdiği tepkiye, onların uzmanlaşmış hücre tipi, onarıcı Schwann hücrelerine dönüşüm yeteneğine bağlıdır. Yaralanma alanının distalinde yer alan bu hücreler, yaralı nöronların hayatta kalmasını destekler, aksonal rejenerasyonu başlatır, miyelin kalıntılarının temizlenmesini düzenler ve aksonları hedeflerine doğru yönlendiren rejenerasyon rotasını (Bungner bantları) oluşturur (Gomez-Sanchez ve ark., 2017).

Sinir sisteminin motor, duyuşal ve kognitif fonksiyonları, hızlı impuls yayılımı gerektirir. Schwann hücre membranları tarafından akson çok katmanlı bir şekilde kılıflandırılır, oluşturulan miyelin kılıfı ile aksonların izolasyonu sağlanır, enine kapasitans azaltılır ve aksonal plazma membranının enine direnci artırılır. Böylece miyelin, fazla yer işgal etmeden aynı çaptaki miyelinsiz aksonlara kıyasla sinir iletimini 20-100 kat hızlandıran sıçrayıcı potansiyel yayılımı için yapısal bir temel sağlar. Miyelinleşmenin enerji tasarrufu sağladığı sıklıkla belirtilmiştir. Gerçekten de, aksiyon potansiyellerinin Ranvier düğümlerine kısıtlanması, aksonal membranların dinlenme potansiyelini sürdürmede ATP'ye bağımlı Na^+/K^+ değişim ihtiyacını azaltmaktadır (Nave ve Werner, 2014). Diğer plazma membranları ile karşılaştırıldığında, miyelinin kuru ağırlığının % 70'ini ve kolesterol, fosfolipidler, galaktolipidler ve plazmalojenler sırasıyla, 2: 2: 1: 1'lik lipid bileşimi oranında oluşturur (Nave ve Werner, 2014). Periferik miyelin kütesinin geri kalan bölümü, % 21'i miyelin protein zero'dan (P0) ve % 8'i miyelin basic proteinden (MBP) oluşur (Nave ve Werner, 2014).

Schwann hücreleri (SCs) çoğalır ve Bungner bantlarını oluşturmak için göç eder, akson büyümesini desteklemek için nörotrofik faktörler ve hücre dışı matris (ECM) molekülleri açığa çıkarır ve daha da önemlisi, yeni aksonal filizlerin remiyelinasyonunu sağlar (Zhang ve ark., 2016b).

Schwann hücrelerinin sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), glial hücre dizisi kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) ve siliyer nörotrofik faktör (CNTF) gibi çeşitli nörotrofik faktörleri salgıladıkları bilinmektedir. Schwann hücreleri ayrıca aksonal büyüme destekleyen laminin ve hücre adezyon molekülleri gibi ekstraselüler matriks molekülleri de üretirler (Zhang ve ark., 2017c).

Miyelin kaybı demiyelinizasyon olarak adlandırılır. Klinisyenler için demiyelinizasyon miyelini gitmiş sinir anlamına gelir, fakat biyologlar için Schwann hücrelerinin miyelinlerini (demiyelinizan hücreler) kaybettiği süreç anlamına gelir. Aslında periferik demiyelinizasyon Schwann hücrelerinin ölümüyle sonuçlanmaz, miyelin oluşturan Schwann hücrelerinin demiyelinize hücrelere dönüşümünden ileri gelir. Periferik demiyelinizasyon nedenleri çoktur; toksik, metabolik (diabet), infeksiyöz (*Mycobacterium leprae*), herediter (Charcot - Marie - Tooth hastalıkları), immun (Guillain-Barre ´ sendromu, CIDP), termik (sıcak veya soğuk yanık), iskemik veya travmatik (sinir sıkışması, ezilmesi, kesilmesi) (Tricaud ve Park, 2017).

2.3.3. Fibroblastlar

Periferik sinir dokusunda, çevresindeki dokuların yapısal iskeletini sürdürmek için ekstraselüler molekülleri (ECM) üretir. Fibroblastların diğer hücrelerle (nöron, Schwann, satellit gibi) iletişim kurma kapasitesi, onları doku biyolojisinin merkezi bir bileşeni haline getirmiştir. ECM üretmek ve kasılma kuvvetleri oluşturmak suretiyle yara iyileşmesinde kritik rol oynarlar. Periferik sinir sisteminde anahtar gen düzenleyici olarak Tenascin-C (TNC) ve ECM'yi üretirler. TNC, lezyon bölgesinde biriken sinir fibroblastları tarafından bolca üretilir. Üretilen TNC, Schwann hücre proliferasyonuna etki etmeden bu hücrelerin migrasyonunu önemli ölçüde destekler. In vivo çalışmalar eksojen TNC proteininin Schwann hücre migrasyonunu ve aksonal büyümeyi artırdığını göstermiştir (Zhang ve ark., 2016b).

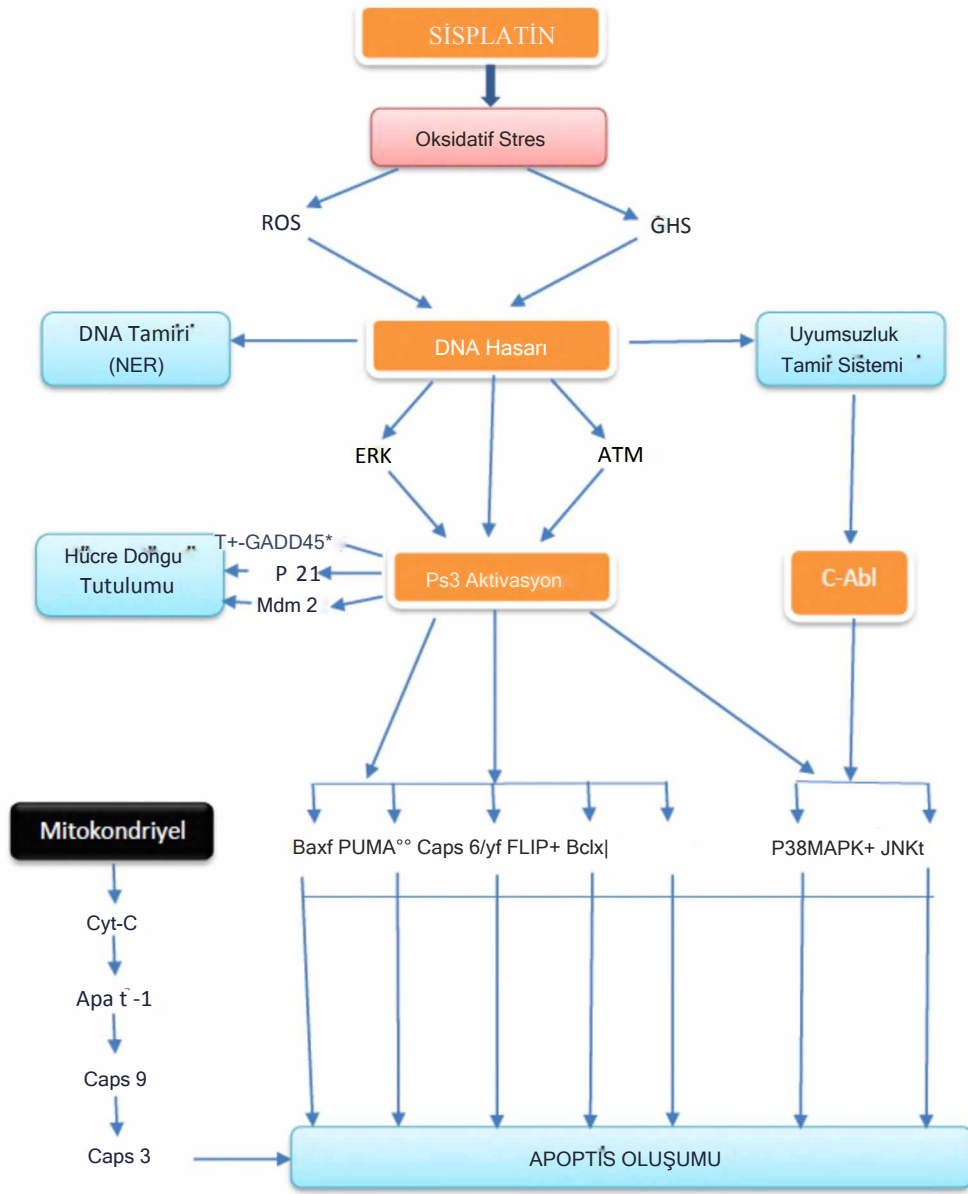
2.4. Periferik Nöropati

CIPN, birçok hastada kanser tedavisinin doz sınırlayıcı ciddi bir yan etkisidir (Podratz ve ark., 2011; Podratz ve ark., 2016). Ekstremitelerde (ellerde- ayaklarda) sızı tarzında ağrıya, uyuşukluğa ve duyu kaybına neden olur. Hastanın uzun süreli yaşam kalitesini ciddi olarak azaltır (Bodurka-Bevers ve ark., 2000; Maj ve ark., 2017). Klinik olarak CIPN, bileşiğe özgü bir şekilde gelişen duyuusal, motor ve otonomik fonksiyonlarda eksiklikler olarak ortaya çıkar (Park ve ark., 2013). Şiddetli olgularda, bu semptomlar, duyuusal algı kaybına dönüşebilir, bu da kalıcı fonksiyon kaybına neden olabilir (Strumberg ve ark., 2002). Kemoterapik ilaçlar kanser hastalarının % 70'ini

periferik nöropati yönünden etkilemektedir (Seretny ve ark., 2014). CIPN, birçok klinisyen tarafından kanser kemoterapisinin kaçınılmaz bir yan etkisi olarak görülmektedir (Cavaletti ve ark., 2011).

Platin bazlı kemoterapötik ajan cisplatin, Dünya Sağlık Örgütü'nün Temel İlaçlar Listesinde listelenmiştir, çeşitli katı tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Starobova ve Vetter, 2017). Küçük hücreli akciğer kanseri, testis, yumurtalık, beyin ve mesane kanseri gibi katı tümörler için en etkili tedavilerden biridir (Starobova ve Vetter, 2017). Cisplatin'in periferik nöropati oluşturma mekanizması; mitokondriyal fonksiyonun bozulması hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptoz yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır. Reaktif oksijen türlerinin üretimi önemli yıkıcı etkilere neden olur (Dasari ve Tchounwou, 2014). Cisplatin nöronal ve nöronal olmayan mitokondrilere zarar verir, bu da reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin artmasına ve dolayısıyla oksidatif stresin artmasına neden olur (Dasari ve Tchounwou, 2014; Starobova ve Vetter, 2017). ROS üretimindeki patolojik artış, enzimler, proteinler ve lipid molekülleri gibi hücre içi biyomoleküllere zarar verebilir. Bu da periferik sinirlerin hücre iskeletinde bozulmaya ve demiyelinizasyona yol açar. Ayrıca, ROS apoptotik yolların aktivasyonuna neden olabilir ve pro-inflamatuar mediatörlerin üretimini artırabilir. Bu süreçler, mitokondriye daha fazla zarar verebilir, ROS üretimini ve oksidatif stresin patolojik süreçlerini güçlendirebilir (Starobova ve Vetter, 2017). Cisplatin mitokondriyal DNA'ya (mDNA) bağlanır, ve mitokondriler DNA onarım sistemlerini eksprese edemez, böylece tamir edilemeyen mDNA ekleri oluşur. Pt-mDNA, mitokondriyal DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu bozular, bu da değişmiş protein sentezine ve solunum zincirinin fonksiyonel hatalarına yol açar (Starobova ve Vetter, 2017) (Şekil 3).

Periferik nöropatilerde meydana gelen akson hasarı ve dejenerasyonu sırasında hücre içinde meydana gelen değişiklikleri ve bunların moleküler mekanizmalarını anlamak, tedavi yöntemleri geliştirmek, insan sağlığı ve bilim adına büyük önem arz etmektedir. PSS, sinir rejenerasyonunu inhibe eden birkaç faktör yüzünden sınırlı rejeneratif potansiyele sahip MS S ile karşılaştırıldığında bağımsız olarak yenilenme kabiliyetine sahiptir (Wang ve ark., 2017a). Periferik sinir rejenerasyonu, hasarın tipi ve kapsamı, hasar onanmasının zamanı ve şekli ve ayrıca hastanın kapsamlı durumu vb. gibi birçok faktöre sahiptir (Wang ve ark., 2017a).



Şekil 3. Sisplatinin periferik nöropati oluşturma mekanizması. (Dasari ve Tchoumvou, 2014'ten uyarlanmıştır)

Periferik sinir sistemi hasarları önemli derecede fonksiyon kaybına ve hayat kalitesinde azalmaya neden olur. Rejenerasyon ve reinnervasyon gerçekleşse de bazen kalıcı olarak hasar görmüş duyu ve motor nöronlar, nöropatik ağrı gibi ikincil problemlerden dolayı önemli fonksiyon kayıplarına yol açarlar (Rosberg ve ark., 2005).

Sinir hasarlarından sonra meydana gelen iyileşme ya da adaptasyon üç yoldan biriyle olur (Fu ve Gordon, 1997; Gordon ve Fu, 1997):

- 1- Hasarlanmış aksonların yenilenmesi ile hedef dokuların tekrar innerve olması.

2- Hasarlanan nöronların yakınlarında bulunan hasarlanmamış aksonların kolleteral dalları ile tekrar innerve olması.

3- Yitirilmiş fonksiyonlarla ilgili sinir sistemi bağının tekrar şekillenmesi.

Periferik sinir hasarı sonrasında kesilmiş aksonların rejenere olma ve işlevsel bağlantıları yeniden kurabilme özelliği: canlının yaşama, etkilenen sinir lifine, hasar yerine, lezyon tipine ve aksonun alması gereken mesafeye bağlıdır (Navarro, 2016). Örneğin kesik uçlar arasında uzun boşlukla sonuçlanan bir sinir keşişi onarılmadan bırakılırsa ilgili kas ve duyu alıcılarının işlevsel olarak tekrar innerve olma ihtimali oldukça düşüktür (Navarro, 2016).

Periferik sinir sisteminde başlıca üç dejenerasyon gerçekleşir. Bunlar; Waller dejenerasyonu, aksonal dejenerasyon ve segmental demiyelinizasyondur.

2.4.1. Waller dejenerasyonu

Periferik sinir liflerinin kopmasına neden olan hasarlardan sonra merkezden uzakta hasarlı bölgedeki akson ve miyelin kılıfları Waller dejenerasyonu adlı bir süreç içerisinde parçalanır (Fu ve Gordon, 1997). Bozulma retrograd olarak aksonun proksimal sinir segmentinin kısa bir kısmında da meydana gelir (Beuche ve Friede, 1986). Bozulma son ürünleri, Schwann hücrelerinin ve makrofajların işbirliği ile ortadan kaldırılır (Perry ve Brown, 1992).

2.4.2. Aksonal dejenerasyon

Aksonal dejenerasyon sinir travması, nörodejeneratif hastalıklar, toksin maruziyeti, genetik mutasyon ve metabolik bozulma gibi çeşitli nedenlerden dolayı ortaya çıkabilir (Hilliard, 2009). Tüm bu nedenler, aksonal bağlantıyı, aksonlar boyunca kargo taşımacılığını engelleyerek veya hücre iskelet yapılarını sökerek, akson kaybına yol açarlar (Shin ve ark., 2017). Bu dejenerasyon periferik sinir hücre gövdesini doğrudan etkileyen bir nedenle ortaya çıkabileceği gibi aksonun bütününe etkileyen bir nedenle de oluşabilir (Coleman, 2005; Conforti ve ark., 2007). Periferik sinir hücresi, hasar nedeniyle canlılığını yitirmişse geri dönüş mümkün değildir. Eğer hasara sebep olan etmenler, aksonun bütünlüğü bozulmadan ortadan kalkarsa akson haftalar ya da aylar sonra

fonksiyonuna yeniden kavuşabilir (Navarro, 2016). Eğer aksonun bütünlüğü bozulmuşsa Waller dejenerasyonu ve ardından rejenerasyon süreçleri yaşanabilir (Lunn ve ark., 1989).

2.4.3. Segmental demiyelinizasyon

Miyelinli sinir liflerinde, periferik sinir aksonunda bir hasar olmaksızın etrafındaki Schwann hücresinde veya miyelin kılıfta meydana gelen hasara segmental demiyelinizasyon adı verilir. Miyelin yenilenebilen bir yapıdır. Bu sebeple miyelin kaybına neden olan etken, ortadan kalktığında tümüyle geri dönüşü olan bir süreçtir; demiyelinizasyondan sonra 15 gün ile 6 ay arasında yeniden miyelinlenme gerçekleşebilir. Bununla birlikte remiyelinize olan kısımlarda miyelin, öncekine göre daha ince ve internodal mesafe daha kısadır (Gomez-Sanchez ve ark., 2017).

2.5. Periferik Sinirlerde Aksonal Rejenerasyon

Memeli nöronları embriyonik gelişim sırasında aksonlarını kolayca uzatabilir. Daha sonraki evrelerde, intrinsik nöronal büyüme aktivitesi, uygun sinaptik gelişime izin vermek için baskılanır. Yetişkin periferik sinir sistemi nöronları da sinaptojenik bir duruma dönüşmesine rağmen, aksonları hemen bir büyüme konisi oluşturur ve yaralanma alanı üzerine doğru rejenerer olur (Murillo ve Sousa, 2018). Yeni bir büyüme konisinin oluşumuna ve başarılı akson büyümesine yol açan çoklu içsel mekanizmalar arasında, hücre iskeleti organizasyonu ve dinamikleri merkezdedir (Murillo ve Sousa, 2018). Periferik sinir sisteminin Schwann hücreleri, yaralanma sonrası sinir rejenerasyonunu destekler. Aksonlar, nöronal hücre gövdelerinden ayrıldığında, aksonlar içindeki aksonal taşıma durur, bu aksonların Wallerian dejenerasyonu başlar, Schwann hücreleri miyelin örtüsünü kaybeder ve çoğalmaya başlar. İlginçtir ki, taşıma ayrılan sinir segmentinde saatler boyunca devam eder, dejenerasyon yaralanma bölgesinden uzunlamasına yayıldığı için izole sinir kas preparatlarında kas kasılmaları birkaç saat sürebilir. Schwann hücreleri başlangıçta miyelin ve akson döküntülerini fagosite eder, ancak döküntüleri yaklaşık 3 hafta içinde uzaklaştıran, hasardan birkaç gün sonra kan-sinir bariyerini geçebilen, hasar bölgesine nüfuz eden primer fagositik hücreler, makrofajlardır (Gordon ve English, 2016). Schwann hücreleri bir yandan çoğalırken diğer yandan miyelinleştirici

formdan pre-miyelinleştirici forma fenotipik değişim geçirirler. Schwann hücrelerinin pre-miyelinleştirici formu aksonal büyümeyi teşvik eder; NGF, BDNF, GDNF ve pleiotrophin gibi nörotrofik faktörleride dahil olmak üzere bir çok rejenerasyonla ilişkili genler eksprese edilir (Gordon ve English, 2016). Yaralanan nöronlarda, akson keşişinin ardından Waller dejenerasyonu adı verilen bir süreç başlar (Tricaud ve Park, 2017). Merkezden uzak sinirdeki, muhtemelen Schwann hücreleri parçalanmış aksonların salgıladığı proteinler aracılığı ile uyarılırlar (Karanth ve ark., 2006). Gerçekleşen diğer hücrel değişiklikler, endonöral kapillerin geçirgenliğinde artış ve buna bağlı endonöral ödem oluşumu, kan-sinir bariyerinin bozulması ve endonöral fibroblastların çoğalmasındır (Stoll ve Muller, 1999). Schwann hücreleri endonöral tüpler içerisinde dizilirler ve yenilenmekte olan aksonlara destek sağlayacak Bünger bantlarını oluştururlar. Schwann hücreleri, yenilenen aksonlar ile temas etmesi için yüzeylerinde NGF reseptörü sentezler. Aynı zamanda L1 ve sinir adhezyon molekülleri de üretilmeye devam edilir. Bu adhezyon molekülleri, akson uzaması için uygun yüzey hazırlar (Martini ve ark., 1994). Schwann hücreler çoğalma hızına, hasarlanmadan en fazla 3 gün sonra ulaşırlar, ve 2-3 hafta daha devam eder. Lezyonun proksimalinde yerel faktör salınımının başlatılması ile kesik aksonlardan büyüme konileri çıkar ve uygun bir çevre bulmak amacıyla uzarlar. Distal sinir parçası gibi rehber bir yapının olmadığı durumlarda yenilenen aksonlar kıvrımlı bir yol izlerler ve olgunlaşmamış akson dalları ve bağ dokusundan oluşan bir yapı oluştururlar (Fried ve ark., 1991). Eğer rejenere olan aksonlar distal sinire ulaşırlarsa endonöral tüpler içerisinde Schwann hücresi ve bazal lamina ile birlikte rejeneratif birimler oluşturarak ilerlerler. Akson uzaması için gerekli materyal esas olarak hücre gövdesi tarafından karşılanır ve anterograd olarak taşınır. Akson rejenerasyon hızı başlangıçta çok yavaştır ve hasardan 3-4 gün sonra günlük 2-3 mm gibi sabit bir değere ulaşır (Fu ve Gordon, 1997).

2.5.1. Sinir rejenerasyonunda nörotrofinler

Nörotrofik faktörler, nöron hayatıyinde belirleyici etkilere sahip büyüme faktörleridir. Farklı nöral popülasyonun hayatıyininin devamı için ihtiyaç duyulan polipeptitler ailesidir. Sinir sisteminin gelişimi, devamı ve rejenerasyonunda önemli rol oynarlar. Bu özelliklerinden dolayı, ayrıca sinaps oluşumunda ve sinaptik plastisitede de görev alırlar. Nörotrofik faktörlerin üstlendiği başlıca görevler nöronun hayatta

kalmasının sağlanması, miyelinleşme, çoğalma, farklılaşma, aksonal büyüme ve sinaptik plastisitedir. Tüm bu özelliklerinin yanı sıra nörotrofik faktörlerin rejenerasyona da katkıda buldukları bilinmektedir. Hasarlanan sinirlerdeki distal parçada nörotrofik faktörlerin artması, aksonal rejenerasyonla birlikte hedef dokuda, tekrar innervasyonunun ardından normal seviyelerine dönmeleri, bu faktörlerin rejenerasyonda doğrudan veya dolaylı olarak etkilerinin olduğunu göstermektedir (Gordon, 2009).

Nörotrofik faktörler üç ana aileye ayrılırlar.

1. Nörotropinler; hem PSS hem de MSS'de hücre canlılığı, hücre farklılaşması ve aksonal büyüme gibi gelişimsel olaylarda kritik öneme sahip, yapısal olarak ilişkili dört proteinden oluşan bir ailedir. Yetişkinlik evresinde önemli ve farklı roller oynamaya devam ederler. Bu nörotrofinler; NGF, nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4/5 ve BDNF'tir (Harvey ve ark., 2015).

2. CNTF ve lösemi inhibitör faktörü içeren nörokinler ile reseptörler olarak fonksiyonel olanlar

3. Transforme edici büyüme faktörü-P ailesi, GDNF ve GDNF reseptör ailesi GDNFR-a

2.5.2. Sinir büyüme faktörü (NGF)

Sinir büyüme faktörü (NGF) nörotrofik faktörler olarak bilinen nörotrofik protein ailesinin bir üyesidir. NGF'nin keşfi, geçen yüzyılın 50'li yıllarına tarih yazdı ve 1986'da Nobel Ödülü'ne layık görüldü. NGF, sempatik, duysal ve ön beyin kolinerjik nöronların gelişiminde ve hayatta kalmasında kritik bir koruyucu rol oynadığı bilinen, ilk keşfedilen ve en iyi karakterize edilen nörotrofik faktördür (Aloe ve ark., 2015; Keefe ve ark., 2017). NGF, iskemik, cerrahi veya kimyasal yaralanmalardan sonra hem in vivo hem de in vitro ve sinir hücresi iyileşmesinin nörit gelişimini artırır. NGF'nin terapötik özelliği insan kutanöz ve korneal ülserler, basınç ülseri, glokom, makülopati ve retinitis pigmentosa üzerinde gösterilmiştir (Aloe ve ark., 2015).

NGF ile indüklenen aksonal filizlenmenin duysal nöronlar üzerindeki mekanizması, yoğun bir çalışma alanıdır. NGF, tipik bir tirozin kinaz reseptörü olan

spesifik reseptör tropomiyozin kinaz reseptörü A'yı (TrkA) aktive ederek biyolojik etkisini gösterir. TrkA tarafından uyarılan başlıca sitozolik/endozomal yolak, sırasıyla Ras-mitojen aktif protein kinaz, hücre dışı düzenlenmiş kinaz (ERK), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)-AKT ve Fosfolipaz C - y aktive edilir. NGF ayrıca düşük afiniteli, seçici olmayan pan-neurotrophin reseptörüne (p75NTR) bağlanır ve aktive eder. Bu reseptör, TrkA aracılığıyla sinyalleşmeyi düzenleyen bir transmembran glikoproteindir. TrkA yokluğunda NGF'nin p75NTR'ye bağlanması, bir hücrenin apoptoz yoluyla ölme sinyalini başlatır. P75NTR ile aktive edilen sinyal yolları Jun kinaz sinyalleşme kaskadı, nükleer faktör kappa BNF-κB ve seramid jenerasyonudur (Aloe ve ark., 2012; Keefe ve ark., 2017).

35 yılı aşkın süredir, NGF, sempatik ve duysal nöronlar ve nöronal krestten elde edilen hücreler için çok güçlü ve seçici bir büyüme faktörü olarak düşünülmüştür. Bu nöronlarda NGF, nörotransmitterleri ve nöropeptid sentezini dinamik olarak kontrol eder. Sempatik nöronlarda norepinefrin üretimi, tirozin hidroksilazın selektif indüksiyonu yoluyla NGF tarafından düzenlenir. Dorsal kök gangliyonunda (DRG) primer duyu nöronları tarafından P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid (CGRP) gibi nöropeptitlerin ekspresyonu, NGF kontrolü altındadır ve sinir transeksiyonu veya anti-NGF tedavisinin bir sonucu olarak NGF'nin in vivo yoksunluğunda, P Maddesi ve CGRP sentezinde belirgin bir azalmaya neden olur. İnnervasyon alanından NGF tedarik edilmesi, uyarılara tepki olarak yetişkin sinir sisteminin yapısını ve fonksiyonlarını değiştirmesine izin veren nöronal plastisiteyi etkiler. Gerçektende yetişkin dokularında NGF'nin yapısal sentezi, innervasyon yoğunluğu, hücre gövdesi hacmi, aksonal terminal filizlenme, dentrit dallanması, nöropeptitlerin ve nörotransmitterlerin veya transmitter üreten enzimleri indüklenmesi veya inhibisyonu gibi PSS nöronlarının fenotipik özellikleri ile bağlantılıdır (Aloe ve ark., 2012). PSS'de gelişen nöronların hayatta kalması ve olgunlaşmasında, periferel sinir hasarından sonra regenerasyonun teşvik edilmesinde, yaralı nosiseptif duysal sinirin filizlenmesinde, NGF önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, etkileri kısa yarı ömrü ile sınırlıdır. Büyük moleküler ağırlığa sahip olduklarından vertebralara eksojen uygulandığında kan beyin-sinir bariyerini geçemezler (Li ve ark., 2015).

2.6. Tıbbi Mantarlar

Mantarlar genellikle iyi bir besin kaynağı ve sağlığı geliştiren bileşiklerdir (Friedman, 2015). Gıda ve tıbbi faydasından dolayı binlerce yıldır tüketilmektedir. Mantarlar hızla ümit vaat eden yeni proteinler olarak kabul edilmektedir (Chen ve ark., 2017). Kuru ağırlıklarının % 40'ına kadar protein içerirler ve kaliteli protein kaynağıdır. Çoğu mantar türünün esansiyel amino asitleri, yumurta ile eşdeğerdedir. Vitamin içeriği tiamin (B1) hariç, mayanunki kadar yüksektir (Kim ve ark., 2011). Beslenme yönünden; düşük kalori içermesinin yanı sıra, esansiyel aminoasitler, karbonhidratlar, önemli vitaminler ve mineraller bakımından zengin bir içeriğe sahiptir (Muszynska ve ark., 2018). 2000'den fazla yenilebilir ve/veya şifalı mantar türü tespit edilmiştir (Friedman, 2015). Doğu Asya ülkelerinde 60'tan fazla mantar türü yetiştirilmektedir. Çin'de ticari ölçekte 30'dan fazla tür yetiştirilmektedir (Li ve ark., 2012). Mantarlar aynı zamanda uzak doğu ülkelerinde yüzyıllardır ilaç olarak da kullanılmıştır. Modern araştırmalar geleneksel olarak kullanılan türlerin terapötik etkisini doğrulamaktadır (Muszynska ve ark., 2018). Son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalarda; antioksidan, anti-tumor, anti-inflamatuvar, antidiyabetik, anti-lipidemik ve immunmodülatör etkilere sahip olduğu, insan sağlığını korudukları ispatlanmıştır, özellikle bağışıklık sistemini düzenleyici ve güçlendirici etkisine dikkat çekmektedir (Muszynska ve ark., 2018). Mantarlar sahip olduğu besin ve tıbbi özelliklerinden dolayı bileşimlerinde bulunan etken maddelerin ekstrakte edilmesiyle birçok hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde etkin olarak kullanılmaktadır. Mantarların terapötik spektrumu çok fazladır, ancak en yaygın kullanımları kanser, hipertansiyon, inme, parkinson hastalığı, alzheimer hastalığı, mikrobik enfeksiyonlar, bağışıklık zayıflığı, diyabet vb. pek çok hastalıkta endikasyon bulmuştur. Mantarlar protein polisakkarit bileşikleri (Polisakkarit-K, Polisakkaritpeptid ve Lentinan), ikincil metabolitler (terpenler, alkaloidler ve laktonlar) ve enzimler (lakkaz, glukoz oksidaz ve peroksidaz) gibi teröpatik özelliğe sahip birçok karmaşık madde içerir (Li ve ark., 2012).

Bun mantarlar arasında, Aslan Yelesi Mantarı olarak da bilinen *Hericium erinaceus*, sıra dışı, sağlığı teşvik edici mantar türü olarak öne çıkmaktadır. Periferik nöropatilerin önlenmesi ve/veya tedavisi bu tıbbi mantardan faydalanılabilir mi? Bu

soruya yanıt aramak için çalışmamızda terapötik potansiyeli yüksek, yan etkisi son derece az bir mantar türü Aslan Yelesi Mantarı seçilmiştir.

2.6.1. Aslan yelesi mantarı (AYM) *Hericium erinaceus*

AYM, *Hericium erinaceus*, gıda olarak tüketilen ve geleneksel Çin tıbbında kullanılan iyi bilinen bir mantardır, hem yenilebilir hem de tıbbi bir mantar olarak şöhret bulmuştur. Faydalı doğal bitki kaynakları olarak kullanılan diterpenoid bileşikler, steroidler, P-glucan gibi önemli polisakkaritler, proteinler ve diğer fonksiyonel bileşenler gibi aktif bileşenlerden zengindir (Chen ve ark., 2017; Cheng ve ark., 2016). AYM uzak doğuda hafıza geliştirmek, geleneksel Çin tıbbında gastrointestinal bozuklukları tedavi etmek için kullanılmaktadır (Li ve ark., 2014). Önceki çalışmalar, AYM'nin bilişsel bozukluğu iyileştirdiği, hipoglisemiye düzelttiği ve gastrointestinal kanserlere karşı koruyucu etkiler gösterdiğini rapor etmiştir (Chen ve ark., 2017). AYM'nin Antibiyotik, antibitkinlik, anti-kanser (Kim ve ark., 2011), anti-mikrobiyal (Kim ve ark., 2012), anti-diyabetik (Yi ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2017a), anti-hiperlipidemik, antihipertansif (Choi ve ark., 2013; Liang ve ark., 2013), anti-oksidan (Li ve ark., 2012; Sanchez, 2017; Wang ve ark., 2017b), gastro-protektif (Wong ve ark., 2013), kardiyoprotektif, nefro-protektif, hepato-protektif (Hao ve ark., 2015), nöro-protektif (Diling ve ark., 2017; Lee ve ark., 2014; Raman ve ark., 2015; Trovato ve ark., 2016; Tsai-Teng ve ark., 2016; Wong ve ark., 2011; Yi ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2017b; Zhang ve ark., 2016a), immuno-modulatör (Chen ve ark., 2017; Diling ve ark., 2017) özellikler sahip olduğu, kognitif fonksiyonun geliştirilmesi, anksiyete ve depresyonun iyileştirilmesi gibi farklı farmakolojik özellik ve aktivasyonlar gösterdiği rapor edilmiştir (Friedman, 2015).

AYM'nin meyve gövdeleri ve miselleri, son derece büyük miktarda biyoaktif bileşenler içerir. Meyve gövdeleri ve miselyumlardan izole edilen organik bileşikler (erinacinler, aromatik bileşikler, steroidler, alkaloidler ve laktonlar) beş sınıfa ayrılmıştır. Burada, gözlemlenen, sağlığı teşvik edici özelliklerinden sorumlu olabilecek iki kimyasal bileşik Hericerin ve Erinasin'dir. Miselyum (erinacines A-I) veya meyve gövdeleri (Hericenone C-H), ilaç etkinliği ile birçok biyoaktif ekstrenin kaynağıdır (Lee ve ark., 2017).

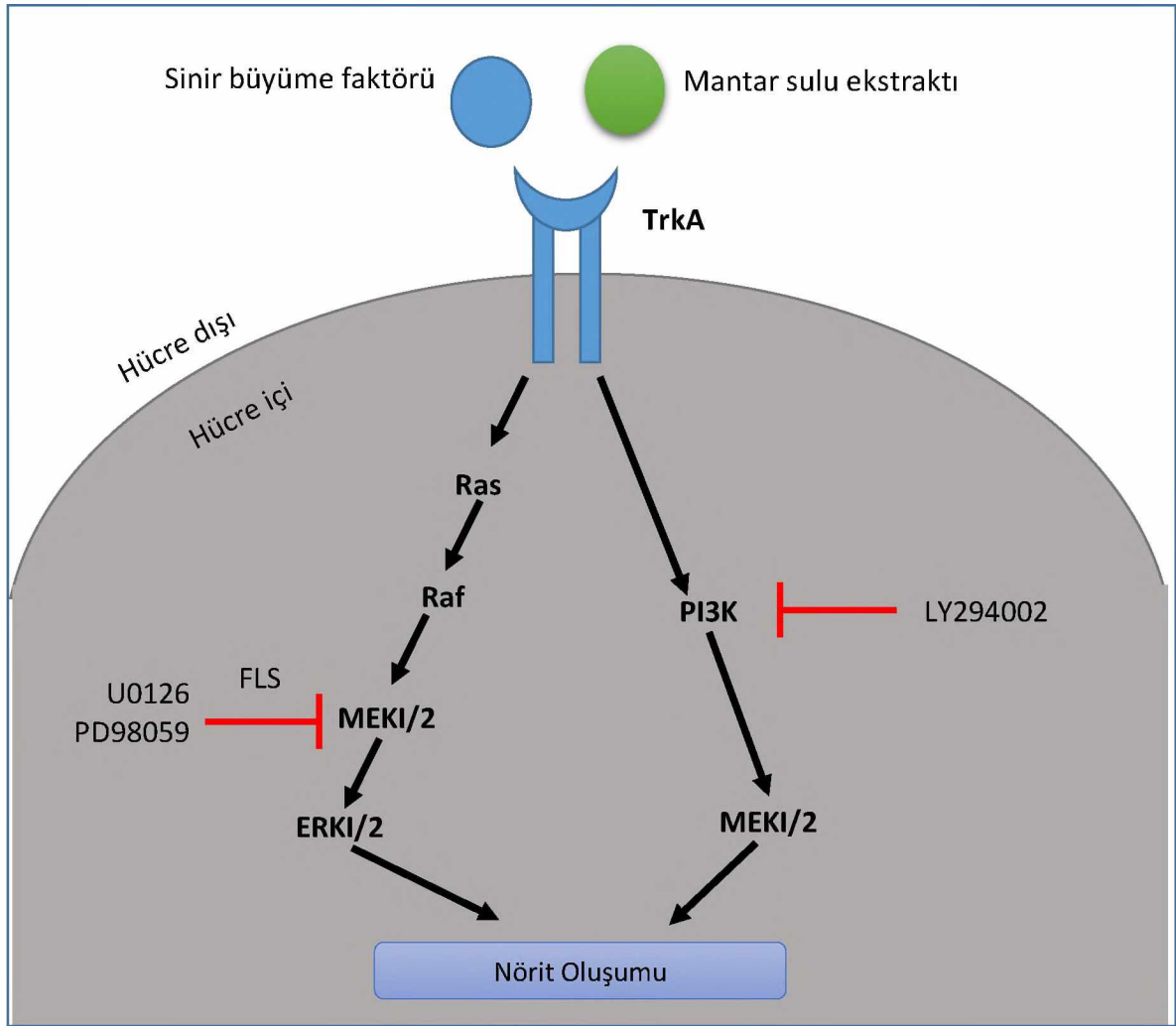
Tıbbi özellikleri olan aromatik bileşiklerden Hericerinler, *H. erinaceus*'tan izole edilmiştir, tanımlanmıştır ve antikanser özellikleri bildirilmiştir. (Friedman, 2015). Erinacinler (A-I) AYM'nin kültürlenmiş misellerinden izole edilen ana aktif maddedir. Astrositlerde in vitro olarak sinir büyüme faktörü (NGF) sentezinin çeşitli stimülasyonları yoluyla biyolojik özellikler gösteren diterpenoid bileşiklerdir (Lee ve ark., 2014).

Erinasinler potansiyel nöroprotektif özelliklere sahip olduğu Tang ve arkadaşları tarafından tanımlanan AYM da bulunan 24 diterpenoidlerin 20 üyesini içeren bir grup katyon-tipi diterpenoidlerdir (Tang ve ark., 2015). Ayrıca anti-kanser etkiler gösterdiği de bildirilmiştir (Lee ve ark., 2017).

Dört farklı yöntemle hazırlanan AYM ekstresinin kuru ağırlığının % olarak dağılımı; protein, karbonhidrat ve mineral (kül) içerikleri sırasıyla, 35.5 ila 38.5, 33.8 ila 39.5 ve 14.6 ila 19.0 arasında bulundu. Nem içeriği yaklaşık %8, lif ve yağ içeriği <% 1 idi. Az yağlı mantarlar iyi bir temel besin ve mikro besin kaynağıdır. (Kim ve ark., 2011).

AYM'nin kurutulmuş meyve gövdelerinden, sıcak su ekstraktı, etanol ekstraktı, asit ekstraktı ve alkali ekstraktı olmak üzere dört farklı çözücü ve yöntemle ekstrakt hazırlanmıştır (Kim ve ark., 2011; Kim ve ark., 2013). Bu ekstraktlar içerisinde, biyoaktif madde P-glucan miktarı en yüksek etanol ekstraktında (0.51), sonra sıcak su ekstraktında (0.47), daha sonra asit ekstraktında (0.17), en düşük oranda da alkali ekstraktında (0.13) bulundu (Kim ve ark., 2011).

PC-12 hücre hattı üzerinde *Hericiam erinaceus*(AYM), *Gcmodermcı lucidum*, *Gcmodermcı neo-japonicum*, *Grifola jroncosa* sulu ekstrelerinin nöritojenik etkileri test edilmiştir (Seow ve ark., 2013). Test edilen tüm sulu ekstreler, PC-12 hücrelerine karşı saptanabilir bir sitotoksik etki yapmaksızın, belirgin bir nörotogenez uyarılmasına neden olmuştur. Nöritogenezi teşvik etmek için NGF ve tıbbi mantar sulu ekstrelerinin trkA / MEK / ERK1/2 ve PI3K/Akt sinyalizasyon yollarını aktive ettiği bildirilmiştir (Seow ve ark., 2013) (Şekil 4).



Şekil 4 : Mantarların nörorejeneratif etkilerine ilişkin hipotetik mekanizması (Seow, 2013'ten uyarlanmıştır)

TÜBİTAK desteği ile ülkemizde üretilmeye başlanan AYM'nin periferik sinir hasarlarında rejeneratif etkileri ile ilgili çalışmalar ümit verici olmakla birlikte çok kısıtlı düzeyde kalmıştır. Deneysel periferik nöropati modellerinde yapılan bir araştırmaya rastlanmamıştır. Laboratuvar ortamında sisplatin ajanıyla periferik nöropati oluşturduktan sonra AYM'nin sıcak su ekstraktının rejeneratif etkileri araştırılacaktır. Etki mekanizması olarak merkezi sinir sisteminde bulunan oligodentrositler ve periferik sinir sisteminde yer alan schwann hücrelerinde NGF sekresyonunu artırarak rejeneratif etki yaptığı bildirilmiştir (Şekil 4) (Kim ve ark., 2013; Seow ve ark., 2013). Periferik sinir rejenerasyonunu başlatan Schwann hücrelerinin manipule olması ve nörotrofik faktörlerin kullanımındır (Simon ve ark. 1998).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan Materyali

Çalışmada hayvan materyali olarak; Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen BALB/C cinsi, 8-10 haftalık 36 yetişkin fare kullanıldı. Çalışmalar süresince deney hayvanlarının bakımı, beslenmesi ve barındırılması Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

3.1.2. Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri ile ilgili ayrıntılar Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Sarf malzeme listesi

Sıra No	Ürün İsmi	Marka	Katalog Kodu
1	Aslan Yelesi Mantarı (<i>Hericium erinaceus</i>)	Agrama Mantarcılık	Denizli
2	Xylazine (%2)	Bayer	Rompun
3	Ketamin-hcl (50mg/ml)	Pfizer	Ketalar
4	Fosfat Tuz Tamponu (FBS)	Sigma	P4417
5	Triton X-100	Merck	K26456203924
6	Anti-neurofilament 200	Sigma	NE14
7	Anti-tubulin β -III	Millipore	TU20
8	Polyclonal anti-myelin basic protein (MBP)	Santa Cruz	sc-13912
9	Polyclonal rabbit anti-S100 antibody	Dako	Z031129-2
10	Alexa fluor 488 goat anti- rabbit IgG	Invitrogen	A-11011
11	Alexa Fluor 488- goat anti-mouse IgM	Invitrogen	A-11029
12	Alexa fluor 568 goat anti- mouse IgG	Invitrogen	A-11004
13	Laktathringer solüsyonu	POLİFARMA	A14667
14	0.9%NaCl	POLİFARMA	B05BB01

3.2. Yöntem

3.2.1. Aslan yelesi mantar ekstraktının hazırlanması

Hericium erinaceus mantarının biyoaktif bileşenlerini elde etmek amacıyla uygulanan yöntemlerden biri sıcak su ile ekstrakte etmektir (Wong ve ark., 2011). Bu mantar AGROMA Mantarcılık Gıda Tarım ve Hayvancılık San. Tic Ltd. Şti Denizli' den tedarik edilmiş olan kültür mantarıdır. Mantarın sıcak su ekstraktı Raman ve arkadaşlarının uyguladıkları protokole göre hazırlanmıştır (Raman ve ark., 2015). Taze mantar basidiokarpları küçük parçalara ayrıldı, 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 (Hz) frekansta ajitatör 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 filtresinden (0.45 µm) 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/mg lik stoklara ayrıştırılarak -20°C'de saklandı (Raman ve ark., 2015).

3.2.2. Çalışma grupları

Bu çalışmada sham grubu (n=12), sisplatin grubu (n=12) ve sisplatin+AYM grubu (n=12) olmak üzere 3 grup oluşturuldu, 36 fare gruplara rastgele dağıtıldı. Önce deneysel periferik nöropati modeli oluşturmak için sisplatin grubu ile sisplatin+AYM gruplarındaki hayvanlara 20 gün boyunca 48 saatte bir 2.3 mg/kg/gün dozda intraperitoneal (IP) yolla sisplatin uygulandı (Woher ve ark., 2015; Wollerve ark., 2018). Hayvanların böbrek ve karaciğerlerini sisplatin toksisitesinden korumak için sisplatin uygulanmayan günlerde (48 saatte bir) 0.25 ml laktatlı ringer solüsyonu IP yolla uygulandı (Woher ve ark., 2015). Sham grubundaki hayvanlara ise aynı hacimde, serum fizyolojik verildi. Nöropati modeli oluşturulduktan sonra Sisplatin+AYM grubundaki deney hayvanlarına 35 gün boyunca 24 saatte bir, 10 mg/kg dozda IP yolla AYM sıcak su ekstraktı uygulandı (Kim ve ark., 2012; Kim ve ark., 2013; Yi ve ark., 2015). Sham ve sisplatin gruplarına ise 0.25 ml serum fizyolojik verildi.

3.2.3. Periferik nöropati ve terapötik etkinin değerlendirilmesi

Canlı ağırlık tartımı: Kemoterapik ajanlar hastalarda genellikle anoreksiye (iştah kaybına) yol açar. Sisplatin kaynaklı anoreksi, hipotalamustan gherelin (iştah hormonu) üretiminin baskılamasından ileri gelir (Yakabi ve ark., 2010). Ghrelin geni, mide içinde güçlü bir şekilde eksprese edilir ve hipotalamus ve hipofiz bezi de dahil olmak üzere beyinde zayıf bir şekilde eksprese edilir (Yakabi ve ark., 2010). Periferik ghrelin, esas olarak mideden dolaşım sistemine salgılanır; hipotalamusta bulunan iştah uyarıcı sistemi aktive etmek için vagus siniri üzerinde bulunan reseptörlerin üzerinden etki yapar (Yakabi ve ark., 2010). Anoreksi sisplatin uygulamasından 24 saat sonra ortaya çıkar ve etkisi 3 gün devam eder (Yamamoto ve ark., 2018). Diğer taraftan sisplatin kemoterapisi kalp yetmezliğine ve kalp kası toksisitesine neden olur (Cameron ve ark., 2016). Sisplatinin böbrekler üzerindeki toksik etkisi ise; tedavisi sonrası akut böbrek hasarı ve kronik böbrek yetmezliğidir. Sisplatin'in en ciddi yan etkisi, hastaların % 20 ila % 30'unda meydana gelen akut böbrek hasarıdır (Cao ve ark., 2018). Ayrıca katı tümörlü kanser hastalarının sisplatinle tedavisi sırasında akut karaciğer hasarı ortaya çıkar ki ciddi bir sorundur (Adeyemi ve ark., 2017). Netice itibarıyla kemoterapi nedeniyle, hem gherelin baskılanması hem de kalp, karaciğer ve böbrek toksisitesi hayvanlarda önemli oranda canlı ağırlık kaybına yol açmaktadır. Bu yüzden sisplatinin indüklediği periferik nöropatiyi, canlı ağırlık bakımından yorumlamak için, bu çalışmada ilaç uygulama öncesi (TÖ) ve sonrasında sekiz hafta süreyle (1.H-8.H) haftada bir sefer hayvanların canlı ağırlık ölçümleri gerçekleştirildi.

Elektrofizyolojik (elektromiyografi) testler: Tedavi uygulamasının sona ermesinden 48 saat sonra nöro-muskuler fonksiyonları test etmek için her üç gruptaki farelere elektromiyografik testler uygulandı. Elektromiyografik testler; akson dejenerasyonu, rejenerasyonu, demiyelinizasyon, remiyelinizasyon ve kas innervasyonunu değerlendirmek için anahtar bir yöntemdir. Bu test BIOPAC System (MP36) elektromiyografi cihazıyla, genel anestezi altında (ketamine 100 mg/kg / Xylazin 10 mg/kg) ve aseptik koşullarda gerçekleştirildi. Farenin sol uyluk lateral bölgesi traşlandı, %70'lik alkol spreyi ile bölge dezenfekte edildi, bacak eksenine paralel yapılan girişimle siyatik sinir açığa çıkartıldı. Gastroknemius kasından “Bileşik Kas Aksiyon Potansiyel (BKAP)” yanıtı (motor yanıt, kas yanıtı) almak için referans elektrot aşıl tendonuna, kayıt

elektrodu ise lateral gastroknemius kasının göbeğine yerleştirildi, siyatik sinir yaralanma bölgesinin 5 mm proksimalinde iki gümüş elektrotla supramaksimal olarak uyarıldı, aksiyon potansiyelinin pik amplitüt değeri (milivolt) kaydedildi. (BKAP amplitüdü innerve edilen kas liflerinin sayısı ile belirlenir ve sinir rejenerasyon çalışmaları için en faydalı indikatördür) (Alvarez ve ark., 2013; Navarro, 2016). Büyük miyelinli sinir liflerinde oluşturulan uyarının, rej enere olan aksonlar üzerinden, yaralanma alanının distalindeki sinirlere ve kaslara sinyali ulaştırma hızını güvenilir bir şekilde belirlemek için “sinir ileti testi” kullanılır. Siyatik sinir lifindeki “Başlangıç Latans Değeri”ni ölçmek için proksimal uyarı, yaralanma noktasının 5 mm proksimalinde siyatik çentikten verildi, yanıt lateral plantar kaslardan alındı, proksimal latans değeri milisaniye cinsinden kaydedildi. Bu test sinir-kas kavşağının ve myelinizasyonun değerlendirilmesinde güvenilir bir yöntemdir. Uyarı artefaktından BKAP'ın başlangıcına kadar olan gecikme süresi “Başlangıç Latansf” olarak adlandırılır (Navarro, 2016).

İmmunohistokimya: Tartım ve elektromyografik testler tamamlandıktan sonra, genel anestezi altında (ketamine 100 mg/kg / Xylazin 10 mg/kg), aseptik koşullarda ve özenle siyatik sinir diseksiyonu gerçekleştirildi (Tuffaha ve ark., 2016a). İmmunohistokimyasal incelemeler için her üç gruptan hayvanların siyatik siniri, uyluk kemiğinin 5 mm proksimalinden diseksiyonla elde edildi. Sinir kesitleri soğuk %4'lük paraformaldehid içerisinde fikse edildi. Daha sonra fosfat tampon solüsyonunda (FBS) hazırlanan %30'lük sükröz solüsyonunda 24 saat bekletildi. Frozen cryostat ile siyatik sinir dokusundan uzunlamasına 10 µm'lik kesitler poly-L lysine kaplı lamlara alındı. Kesitlere 30 dakika süreyle blok solüsyonuyla uygulama yapıldı ve primer antikorlar ile +4 °C de nemli ortamda 1 gece inkübe edildi, akson bütünlüğündeki değişiklikleri görüntülemek için; neurofilament (NF200) ve beta tubulin (P-III-tubulin) antikorları, miyelin yapısındaki değişiklikleri görüntülemek için myelin basic protein (MBP) antikor, Schwann hücre aktivasyonunu görüntülemek için Schwann hücre belirteci S100 antikor kullanıldı (Dun ve Parkinson, 2015; Ozturk ve ark., 2013; Tuffaha ve ark., 2016b). Kullanılan primer antikorlar: Mouse monoclonal anti-beta tubulin-III IgG (1/100, Millipore TU-20), anti-neurofilament heavy IgG (1/100, abeam, ab4680) ve anti-myelin basic protein (MBP, 1/50, Goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology sc-13912), polyclonal rabbit anti-S100 antibody (Dako, Z031129-2). Kesitler ertesi gün fosfat tuz tamponu (PBS) ile üç kez yıkandı ve daha sonra da sekonder antikorlarla +4 °C de nemli ortamda 1 gece inkübe

edildi. Kullanılan sekonder antikorlarlar: Alexa flüor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Al 1011, Carlsbad, CA), alexa flüor 488 goat anti-mouse IgG (İnvitrogen, Al 1029), alexa flüor 568 goat anti-mouse IgG (Invitrojen, A11004). Preparatlar PBS ile üç kez yıkandıktan sonra, lazer taramalı konfokal mikroskopta (LSM 510 META- Zeiss) görüntüleme gerçekleştirildi (Dun ve Parkinson, 2015; Ozturk ve ark., 2013; Tuffaha ve ark., 2016b).

Mikroskobik görüntüleme ve floresan görüntü analizleri: İmmunohistokimyasal boyaması yapılan preparatlar, lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntülendi (Zeiss LSM 510 META). Görüntülemeler için argon (488 nm) lazer ve helyum neon (543 nm) lazer kullanıldı. Görüntüleme de immersiyon yağlı 20X büyütme objektiften yararlanıldı. Aynı anda çoklu floresan ışınları göstermesi için uygun multitrack işlem modunda görüntüler alınıp kaydedildi (Dun ve Parkinson, 2015; Ozturk ve ark., 2013; Tuffaha ve ark., 2016b). Siyatik sinir preparatlarına ait lazer taramalı konfokal mikroskopta alınan floresan görüntüler LSM 3.0 yazılımı ile analiz edildi (Ozturk ve ark., 2013).

İstatistik analiz: Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler; Medyan, Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değer olarak ifade edildi. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal- Wallis analizi kullanıldı. Farklı grupları belirlemede Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Ayrıca grup içi ağırlıkların zamansal farkını ortaya koymak için Friedman Test analizi kullanıldı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS-20 istatistik paket programından yararlanıldı.

4. BULGULAR

Deneysel çalışma esnasında sisplatin toksisitesinden kaynaklandığını düşündüğümüz; sisplatin grubundan 5 hayvan, sisplatin+AYM grubundan 5 hayvan ölmüştür. Ölüm gerçekleşene kadar ölçülen canlı ağırlık verileri kullanılmıştır. Bu iki grupta 7 hayvana ait EMG ve immunhistokimya verileri kullanılmıştır.

4.1. Canlı Ağırlık Bulguları

Tüm gruplara ait tedavi öncesi ve tedavi sonrası 8 haftanın ortalama canlı ağırlık bulguları Tablo 2’de verildi, canlı ağırlık değişimleri grafik olarak Şekil 5’te gösterildi.

4.1.1. Sisplatin + AYM grubu

Bu grubun sisplatin uygulama sonrasındaki (4.H) ortalama canlı ağırlık bulguları (27,67) tedavi öncesi (TÖ) canlı ağırlık ortalaması (34,42) ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). AYM tedavisi sonrası (8.H) bulguları (32,71), sisplatin uygulama sonrası (4.H) bulguları (27,67) ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). AYM tedavisi sonrası (8.H) bulguları (32,71), TÖ bulgular (34,41) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yoktu (Tablo 2, Şekil 5).

4.1.2. Sisplatin grubu

Bu gruptaki hayvanların tedavi öncesi canlı ağırlık ortalaması (33,5), sisplatin uygulama sonrasındaki (4.H) canlı ağırlık ortalaması (24,5) ve deney sonundaki (8.H) canlı ağırlık ortalaması (28,29) ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark vardı ($P<0.05$) (Tablo 2, Şekil 5).

4.1.3. Sham-kontrol grubu

Bu gruptaki hayvanların tedavi öncesi canlı ağırlık ortalaması (36,08), tedavi sonrası canlı ağırlık ortalaması (39,00) ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark yoktu (Tablo 2, Şekil 5).

4.1.4. Canlı ağırlık ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması

Sisplatin uygulama öncesinde ve 1. Hafta sonunda gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 2., Şekil 5). Sisplatin uygulamaları sonunda (4.H) Sisplatin+AYM grubu (27,67) ve Sisplatin grubu (24,50), Sham-kontrol grubu (39,00) ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark bulundu ($P<0.05$). Sisplatin+AYM grubu (27,67) Sisplatin grubu (24,50) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yoktu.

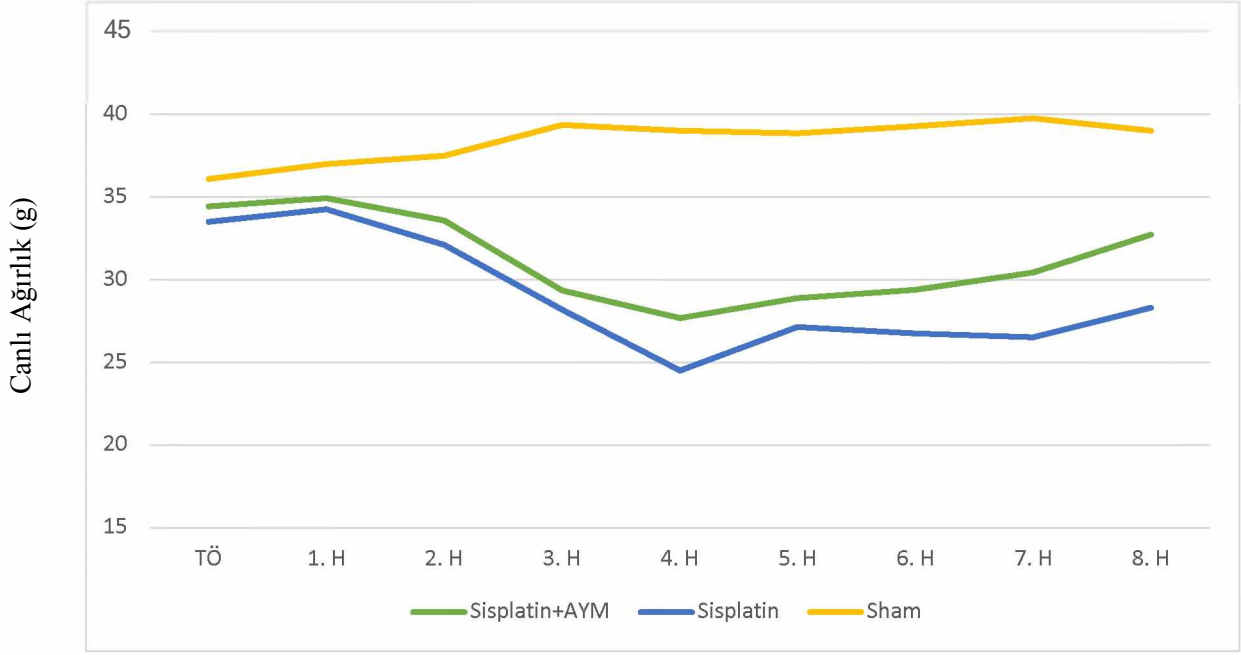
AYM tedavisi sonunda (8.H) Sisplatin+AYM grubu (32,71), Sisplatin grubu (28,29) ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark yoktu. Bununla birlikte Sisplatin+AYM grubunun canlı ağırlığında artış eğilimi gözlemlendi. Sisplatin+AYM grubu (32,71) ve Sisplatin grubu (28,29), Sham-kontrol grubu (39,00) ile karşılaştırıldığında Sham-kontrol grubunun canlı ağırlıklığı anlamlı derecede yüksekti ($P<0.05$).

Tablo 2. Canlı Ağırlık için tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

Hafta	Sisplatin+AYM grubu				Sisplatin grubu				Sham-Kontrol grubu				P
	Mean	St. Dev.	Min.	Max.	Mean	St. Dev.	Min.	Max.	Mean	St. Dev.	Min.	Max.	
T.Ö	34,42 a	5,28	26,00	41,00	33,50 a	4,81	26,00	41,00	36,08 a	3,45	31,00	41,00	0,386
1	34,92 a	4,81	28,00	42,00	34,25 a	4,05	26,00	39,00	37,00 a	3,16	32,00	42,00	0,239
2	33,55 ab B	4,48	27,00	41,00	32,08 ab B	3,42	25,00	36,00	37,50 a A	3,23	33,00	43,00	0,01
3	29,36 bc B	3,88	24,00	36,00	28,17 bc B	4,02	23,00	37,00	39,33 a A	3,17	35,00	45,00	0,01
4	27,67 c B	5,45	17,00	36,00	24,50 c B	5,78	19,00	39,00	39,00 a A	3,69	33,00	45,00	0,01
5	28,88 bc B	5,14	21,00	36,00	27,13 bc B	6,03	21,00	40,00	38,83 a A	3,38	35,00	45,00	0,01
6	29,37 bc B	4,90	22,00	36,00	26,75 c B	6,71	19,00	40,00	39,25 a A	2,83	36,00	44,00	0,01
7	30,43 abc B	3,15	26,00	35,00	26,50 c B	6,00	18,00	36,00	39,75 a A	3,39	35,00	45,00	0,01
8	32,71 ab B	4,39	27,00	38,00	28,29 bc B	5,82	20,00	37,00	39,00 a A	3,28	35,00	44,00	0,01
	p = 0.003				p = 0.003				p = 0.103				

A, B, C: ->■ Aynı satırda farklı büyük harfi alan gruplar arası fark anlamlıdır ($p<0.05$).

a, b, c: 4 Aym sütunda farklı küçük harfi alan haftalar arası fark anlamlıdır ($p<0.05$).



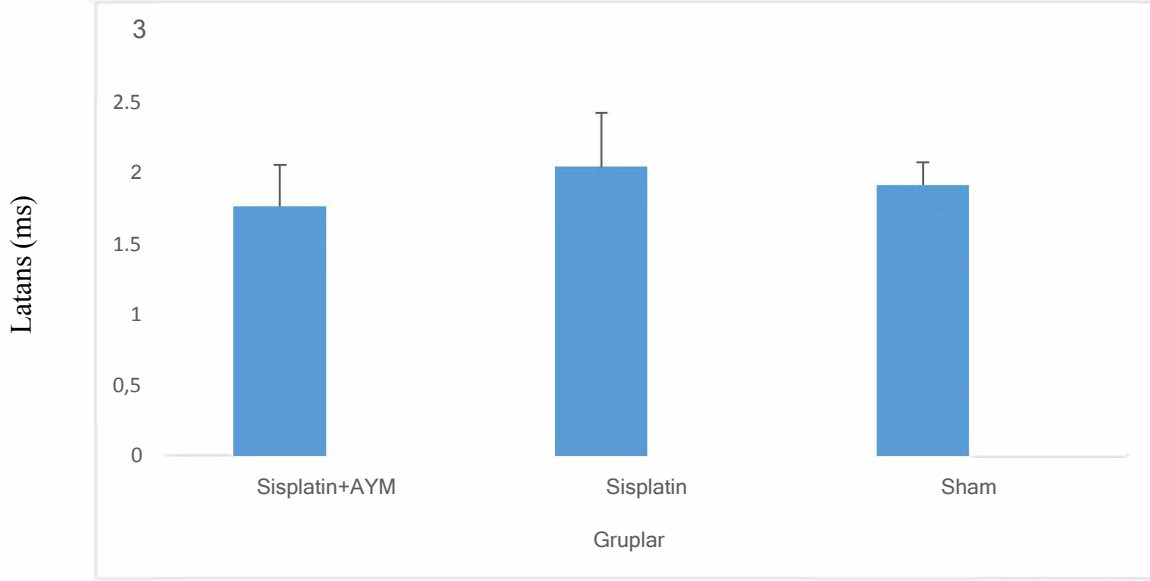
Şekil 5. Farklı gruplara ait haftalık ortalama canlı ağırlık değişim grafiği. Grupların ortalama ağırlık değerlerinin zamansal verileri sırası ile tedavi öncesi (TÖ) ve tedavi sonrası (1.H-8.H). Gruplar arası zamansal ağırlık farkı anlamlıdır ($P<0.05$).

4.2. Elektromiyografik Bulgular

Tüm grupların başlangıç latansı ve BKAP bulguları Tablo 3'te verilmiştir.

4.2.1. Başlangıç latansı

Sisplatin+AYM grubunda 1,77 ms, Sisplatin grubunda ise 2,05 ms, Sham grubunda 1,92 mV ölçülmüştür. Deney grupları ile sham kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark bulunmadı. Sisplatin+AYM grubu ile Sisplatin grubu arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı fark yoktu. Bununla birlikte Sisplatin grubunda latans değerinde uzama eğilimi, Sisplatin+AYM grubunda latans değerinde azalma eğilimi gözlemlendi (Tablo 3, Şekil 6).



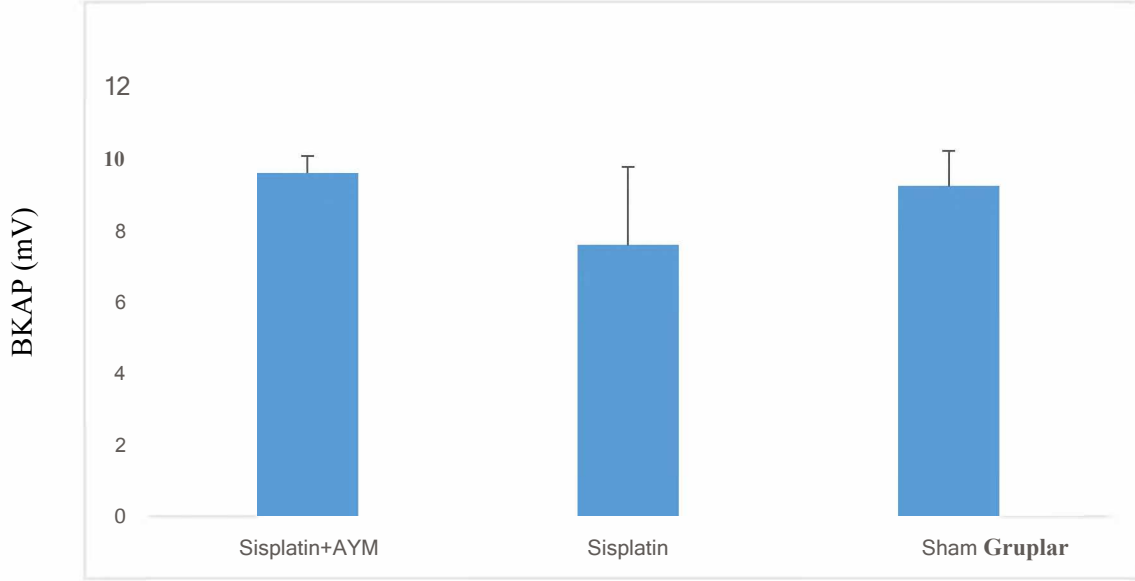
Şekil 6. Sisplatin uygulaması ve AYM tedavisinin siyatik sinir latans değerine etkisi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 3: Elektromiyografik ölçümlerin tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

	Gruplar	Medyan	Ort.	St. Sap.	Min	Mak.	p
Latans	Sisplatin+AYM	1,75	1,77	,29	1,40	2,18	0,401
	Sisplatin	1,88	2,05	,38	1,70	2,72	
	Sham-Kontrol	1,89	1,92	,16	1,72	2,26	
BKAP	Sisplatin+AYM	9,49	9,63	,47	9,07	10,38	0,095
	Sisplatin	9,09	7,61	2,19	4,35	9,62	
	Sham-Kontrol	9,63	9,27	,97	7,22	10,20	

4.2.2. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP)

Bileşik kas aksiyon potansiyeli Sisplatin+AYM grubunda 9,63 mV, Sisplatin grubunda ise 7,61 mV, Sham grubunda 9,27 mV ölçüldü. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark bulunmadı. Bununla birlikte BKAP değerinde Sisplatin grubunda düşme eğilimi, Sisplatin+AYM grubunda artma eğilimi gözlemlendi (Tablo 3., Şekil 7).



Şekil 7. Sisplatin ile AYM'nin Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli (BKAP) üzerine etkisi. Gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.3.1. p III tubulin bulguları

Beta III Tubulin akson iskeletini oluşturan yapılardan biridir. Sham-Kontrol Grubunda yukarıdan aşağıya düzgün, bütün ve sıkı yapıda izlendi. Sisplatin grubunda bütünlük ve düzgün yapı kaybedildi, tubulinler inceldi. Sisplatin+AYM Grubunda tubulin yapısının sütun tarzındaki düzgünlüğü ve bütünlüğü kayboldu, ancak tubulin yapısının sıklığında ve yoğunluğunda artış izlendi (Şekil 5).

4.3.2. Nörofilament bulguları

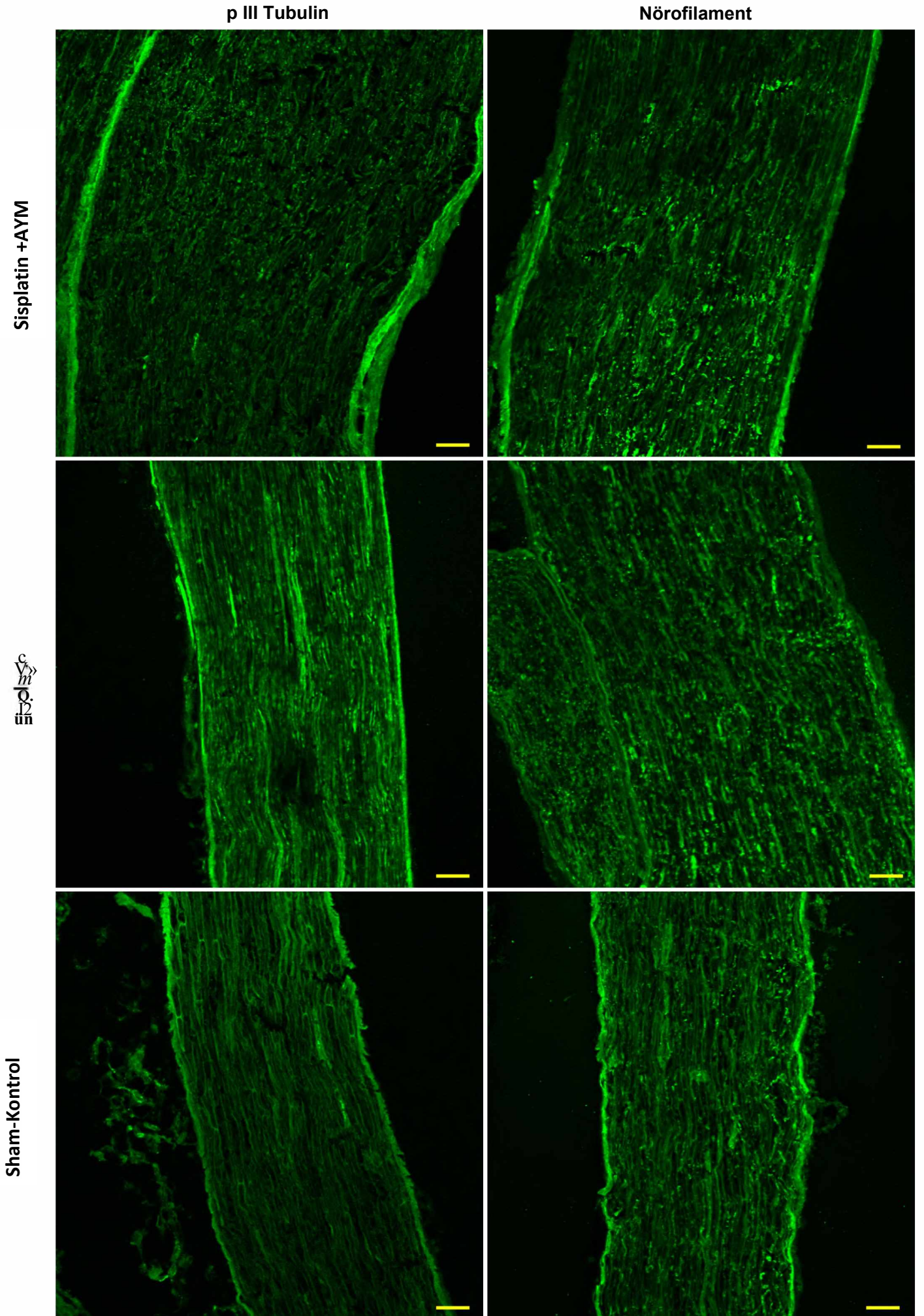
Nörofilament de beta tubulin gibi akson iskeletini oluşturan, akson bütünlüğü hakkında fikir veren yapılardan biridir. Sham-Kontrol Grubunda nörofilamentler oldukça düzgün, yoğun ve sıkı görünümlüydü. Sisplatin grubunda ise bütünlük bozuldu, yoğun ve sıkı yapı gevşedi, filamentler inceldi. Sisplatin+AYM grubunda filamentler de düzelme ve sıkılaşıma eğilimi gözlemlendi (Şekil 6).

4.3.3. Miyelin Bulgulan

Miyelin aksonların çevresini saran koruyucu kılıftır. Sinir lifinde sinyal iletim hızını artırır, enerji harcamasında tasarruf sağlar. Sham-Kontrol grubunda miyelinin düzgün, sıkı ve yoğun bir görünüme sahip olduğu izlendi. Sisplatin grubunda ise miyelinin yoğun, sıkı yapısını kaybettiği, gevşek görümlü olduğu izlendi. Sisplatin+AYM grubunda sisplatin grubuna göre miyelin yoğunluğunda artış görüldü. Bununla birlikte Sham-kontrol grubu ile aralarında önemli düzgünlük, bütünlük, yoğunluk ve sıklık farkı izlendi (Şekil 8).

4.3.4. S100 bulgulan

Schwann hücreleri S100 proteini eksprese eder, O yüzden S100 atikoru Schwann hücre belirteci olarak, Schwann hücre proliferasyon ve aktivasyonunu yorumlamak için kullanılır. Sisplatin grubunda S100 proteini, Sisplatin+AYM ve Sham-kontrol grupları ile karşılaştırıldığında zayıf, kuvvetli kırmızı floresan boyanma noktaları izlendi. Sham-kontrol grubunda S100 düzgün, sıkı yapıda görüldü. Sisplatin+AYM grubunda ise S100'ün sisplatinine göre daha sıkı, Sham-Kontrol grubuna göre düzensiz olduğu görüldü.

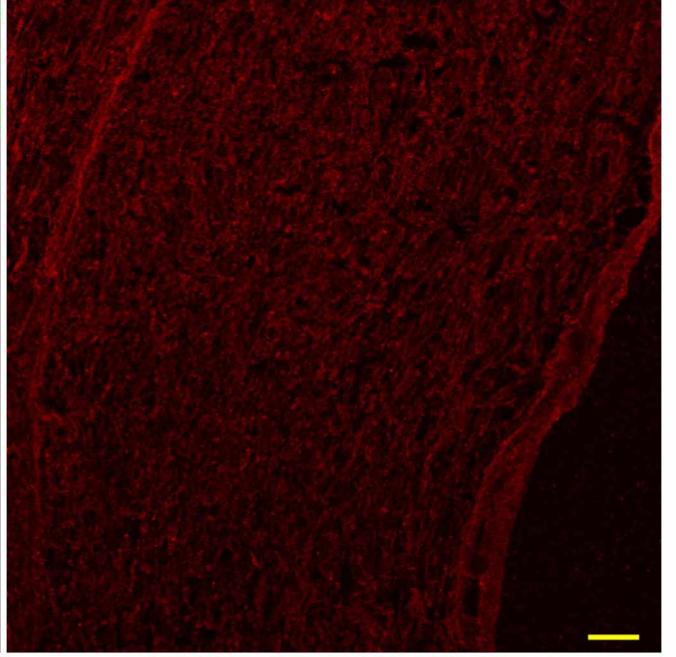
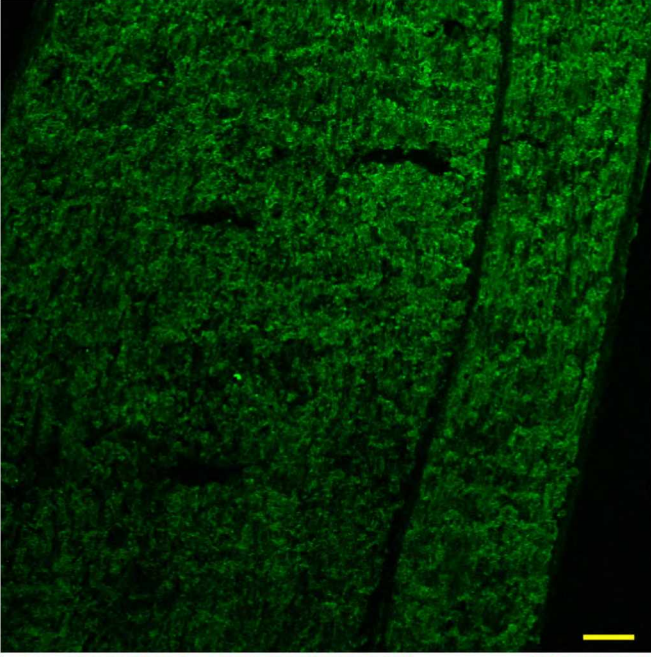


Şekil 8. Siyatik sinir kesitlerinde akson iskelet yapısını oluşturan β III Tubulin ve Nörofilament yapılarının konfokal mikroskopik görüntüsü. Skala bar: = 50 pm

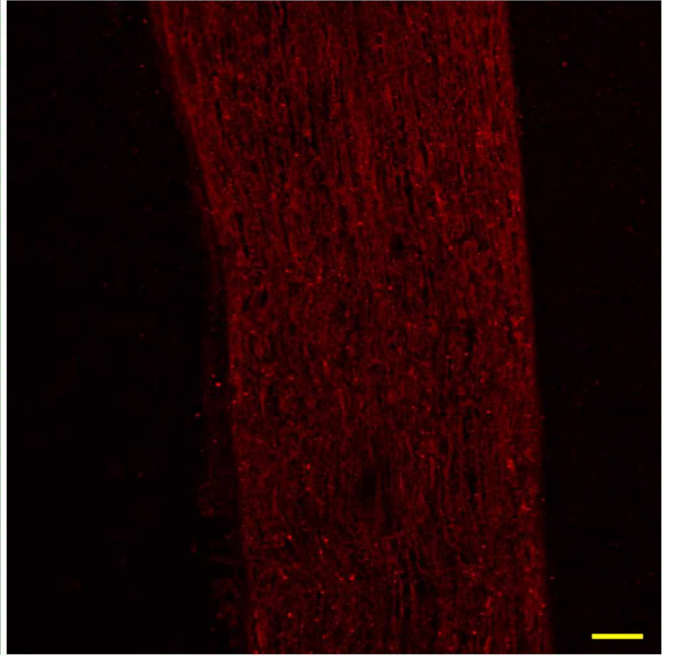
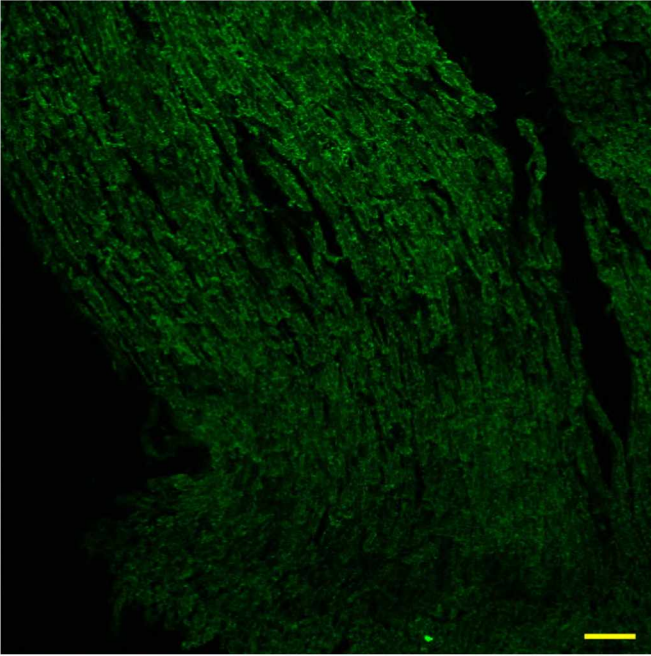
Miyelin Basic Protein

S100

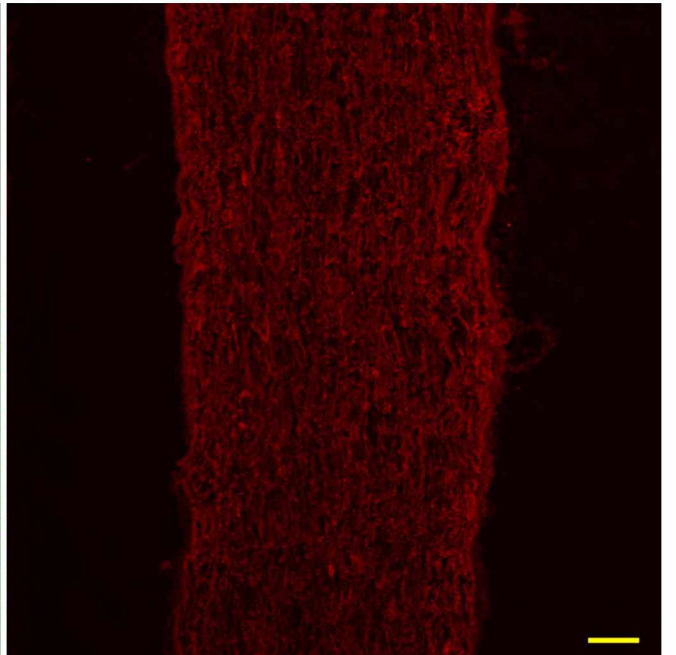
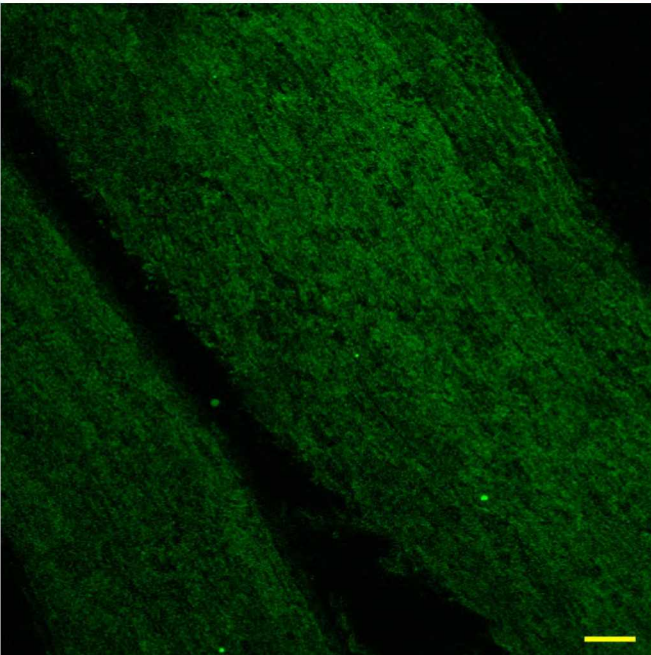
Sisplatin+AYM



Sisplatin



Sham-Kontrol



Şekil 9. Siyatik sinir kesitlerden miyelin belirteci MBP ve Schwann hücre belirteci S100 proteininin konfokal mikroskopik görüntüsü. Skala bar: = 50 um

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sisplatin, sisplatinum, ya da cis-diamminedichloroplatinum (II), dünya çapında iyi bilinen kemoterapik ajandır (Podratz ve ark., 2011). Bununla birlikte Sisplatin, alt ve üst ekstremitelerin çoğunlukla duysal nöropatisini indükleyen en nörotoksik kemoterapötik ilaçlardan biridir (Amptoulach ve Tsavaris, 2011). Periferik nöropatide aksonopatinin önemli bir belirtisi, periferik sinirlerin dejenerasyonu, epidermal sinir liflerinin kaybıdır (Landowski ve ark., 2016). Mevcut çalışmada sisplatine duyarlı BALB/c hayvan modeli tercih edildi, *in vivo* periferik nöropati modeli oluşturuldu, terapötik ajan olarak AYM'nın sıcak su ekstraktı kullanıldı. Akson yapısındaki dejeneratif-rejeneratif değişikliklerin yapısal ve fonksiyonel yöntemlerle aydınlatılması amaçlandı. Preklinik ve klinik çalışmaların literatür bilgileriyle, çalışmamızda tercih ettiğimiz deneysel hayvan modeli (Park ve ark., 2000; Podratz ve ark., 2016), uyguladığımız kemoterapik ajan (Bobylev ve ark., 2017; Cao ve ark., 2018; de Jongh ve ark., 2003; Krarup-Hansen ve ark., 2007) ve tedavi amacıyla seçtiğimiz mantar türünün (Li ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2017b) geçerliliği doğrulandı.

Sisplatin maruziyetinden önce (TÖ) yapılan canlı ağırlık ölçümlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. Sisplatin uygulamaları sonunda (3 .,4. Hafta) yapılan canlı ağırlık ölçümlerinde ise Sisplatin grubu ile Sisplatin+AYM grubunda canlı ağırlık ortalaması, uygulama öncesine (TÖ) göre önemli oranda azalma oldu. Bulgularımız intraperitoneal Sisplatin uygulamasının farelerde periferik nöropati oluşturduğunu gösterdi. Diğer taraftan her iki grupta 5'er hayvanın ölmesi, sisplatin toksisitesinin gerçekleştiği, periferik nöropati modelinin olduğu şeklinde yorumladık. Ölümün Sisplatinin kardiyotoksik, hepatotoksik ve nefrotoksik etkilerinden kaynaklanmış olabilir (Dasari ve Tchounwou, 2014; de Jongh ve ark., 2003). Klinikte sisplatin uygulaması, periferik nöropati komplikasyonu yanında, genellikle vücut ağırlığında önemli bir azalmaya (% 16.3 kayıp) neden olur (Bobylev ve ark., 2017; Maj ve ark., 2017). Canlı ağırlık kaybının iştahsızlık (Yakabi ve ark., 2010; Yamamoto ve ark., 2018), hepatotoksisite (Adeyemi ve ark., 2017), nefrotoksisite (Cao ve ark., 2018) gibi etkenlerin bir veya birkaçının etkisiyle gerçekleşmiş olabileceğini düşünüyoruz (de Jongh ve ark., 2003).

Sisplatinle nöropati oluşturulduktan sonra Sisplatin+AYM grubunda başlanan ve beş hafta süren AYM tedavisi sonrasında (8.hafta) ortalama canlı ağırlık değeri, Sisplatin uygulama sonu (AYM tedavi başlangıcına) (4.hafta) ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede arttı. Sisplatin+AYM' nin Canlı ağırlık ortalaması, sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında artış eğilimi gösterdi, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tedavi süresinin kısa tutulması ya da uyguladığımız tedavi dozunun düşük olması, oluşan toksik hasarın onarımı için yeterli gelmemiş olabilir. Şayet tedavi daha uzun süre devam etse, farklı dozlar uygulansaydı önemli fark çıkabilirdi. Sisplatin+AYM grubunda gerçekleşen ortalama canlı ağırlıkta artış eğilimi AYM'nin periferik nöropati modelinde terapötik etkisinin olabileceği hipotezini destekler (Guindon ve ark., 2014).

Deney sonunda gerçekleştirilen elektromyografik testlerle elde ettiğimiz başlangıç latans süreleri incelenmiştir. Sisplatin grubu, Sham-Kontrol ve Sisplatin+AYM grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır, bununla birlikte Sisplatin grubu latans uzama (gecikme) eğilimi göstermiştir. Latans gecikmelerinin, sisplatin kaynaklı myelin hasarından ve/veya nöromuskuler kavşak hasarından ileri gelmiş olduğu bildirilmiştir (Navarro, 2016). Sisplatinle tedavi edilen farelerde uyarıya yanıt, kontrollere kıyasla daha uzun bir gecikme ortaya çıkarıyorsa, bu gecikmenin duysal eksikliğin veya hissizliğin bir göstergesi olduğu rapor edilmiştir (Maj ve ark., 2017). Diğer taraftan Sisplatin+AYM grubu ile Sham-kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel anlamlı fark çıkmadı. Bulgularımız AYM'nin periferik sinirler üzerinde rejenerasyon kapasitesine işaret eder. MSS ve PSS üzerinde AYM ile yapılan çalışmalarda; AYM'nin, iskemik beyin hasarı sonrası serbest radikalleri süpürme ve inflamasyonu inhibe etme yetenekleri sayesinde nöroprotektif etkiler sunduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2014). Yine AYM'nin, nörit büyümesinin uyarılması, peroneal sinir hasarının fonksiyonel iyileşmesinin desteklenmesi gibi geniş bir tıbbi özellik yelpazesine sahip olduğu bildirildi (Raman ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar bizim bulgularımızı destekler niteliktedir.

Sisplatin grubunda BKAP bulguları, Sham-Kontrol grubu ve Sisplatin+AYM grubuna göre azalma eğilimi gösterdi. Ancak azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. BKAP azalmasının sisplatin toksisitesinden kaynaklı akson hasarından, akson sayısının azalmasına bağlı kas yanıtının küçülmesinden ileri geldiği bildirilmiştir (Alvarez ve ark.,

2013; Navarro, 2016). Sisplatin uygulamasının, genellikle vücut ağırlığında önemli bir azalma (%16.3 kayıp) haricinde fareler tarafından iyi tolere edildiği rapor edilmiştir (Bobylev ve ark., 2017). Sham grubu ile Sisplatin+AYM grubu karşılaştırıldığında aralarında neredeyse hiç fark yoktu. AYM'nin nöroprotektif ve nörorejeneratif özelliklerinin olduğu önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Friedman, 2015; He ve ark., 2017; Lee ve ark., 2014). Duysal sinir aksiyon potansiyellerinin amplitüdündeki azalma, Sisplatinin indüklediği periferik nöropati'nin nörofizyolojik temelinin işareti olduğu bildirilmiştir (Argyriou ve ark., 2014).

Nöronal bir belirteç olan P III Tubulin görüntüleri analiz edildiğinde Sisplatin grubunda P III Tubulin'in yoğunluğunu ve sıklığını kaybettiği, zayıfladığı, seyrekleştiği, filamentler arasında geniş vakuollerin bulunduğu görüldü. Elde ettiğimiz görüntüler Sisplatin'in aksonal iskelet yapısına verdiği hasarı ortaya koymakta, periferik nöropati oluşumunu doğrulamaktadır. Oksidatif stres, sisplatin toksisitesinde yer alan en önemli mekanizmalardan biridir. Oksidatif stres koşulları altında, aşırı reaktif oksijen türleri hücre proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilmektedir (Dasari ve Tchounwou, 2014). Rat dorsal kök gangliyon nöronlarının 24 saat boyunca 100 pmol yoğunlukta Sisplatin'e maruz bırakıldığı bir çalışmada, nöronların %45'inin öldüğü, nöron dışı hücre sayılarında, nörit alanında önemli azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (Guo ve ark., 2017). Sisplatin, N18D3 hibrid nöronlarında apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur (Park ve ark., 2000). 100 ng/ml NGF varlığında Sisplatin'e maruz bırakılan DRG nöronlarının, sisplatin maruziyetinden 48 saat sonra hücre hacminde azalma, soma ve nöritlerde mitokondrilerde bozulma, sayılarında azalma gözlenmiştir (Podratz ve ark., 2011). Sisplatin+ AYM grubundaki P III Tubulin daha sıkı, daha düzgün, daha yoğun yapısıyla Sham-Kontrol grubu görüntüsüne yaklaşmıştır. Bu görüntü AYM'nin rejeneratif yeteneğini desteklemektedir. AYM meyvelerinden hazırlanan sulu ekstrenin günlük oral uygulaması, iyileşmenin erken safhasında yaralanmış sıçan peroneal sinirinin rejenerasyonunu destekleyebileceği gösterilmiştir (Wong ve ark., 2011). Cisplatin tedavisi, daha küçük miyelinsiz duysal sinir liflerinin dejenerasyonuna neden olmuştur (Bobylev ve ark., 2017).

Bir başka nöronal belirteç olan nörofilament, Sisplatin grubunda gevşek ve zayıf yapıdadır. Bu Sisplatin'in indüklediği aksonopatinin bir göstergesidir. Sisplatinin

periferik sinir hücrelerinde genetik mutasyon, metabolik bozukluklar, aksonal taşınmanın engellenmesi, hücre iskelet yapılarının parçalanması, akson bütünlüğünün bozulması ve akson kaybına yol açabileceği rapor edilmiştir (Shin ve Cho, 2017). Sisplatin kemoterapisi esnasında periferik duysal nöropati gelişiminin, büyük dorsal kök gangliyon hücre gövdelerinin, ekstremitelerde ve medulla spinaliste bulunan büyük ve uzun miyelinli akson lifleriyle birlikte dejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir (Krarup-Hansen ve ark., 2007). Kohlea (iç kulak) tüy hücrelerinin anti-nörofilament-200 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyaması, sisplatin tedavisinin, iç kulak tüy hücreleri sayısını büyük ölçüde azalttığını göstermiştir (Wang ve ark., 2013). Sisplatin+AYM grubunda nörofilament yapısı Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında bir derece daha düzgün gözüksede, aralarında önemli bir fark yoktur. Sham grubundaki nörofilamentler hem sisplatin grubuna göre hem de sisplatin+AYM grubuna göre önemli oranda daha düzgün, daha sıkı, daha yoğun gözlendi.

Myelin yapısındaki morfolojik değişikliklerin değerlendirilmesi için siyatik sinir kesitlerimizde Myelin Basic Protein görüntüledi. Sisplatin grubunda düzgün, bütün, kompakt myelin yapısı bozuldu. Sisplatin ile gerçekleştirilen prelinik ve klinik nöropatolojik çalışmalar büyük miyelinli liflerin kaybını ve aksonal dejenerasyon kanıtlarını göstermiştir (Gill ve Windebank, 1998). Sisplatin tedavisi alan testis kanserli hastalar üzerinde, 4. tedaviden 9 ay sonra sural sinir EMG testi ve biyopsi incelemesi yapılmış. EMG bulgularında sisplatinin duysal sinir iletim hızlarını, büyük miyelinli liflerin kaybı ile uyumlu olarak 400-700 mg/m²'lik kümülatif dozlarda % 10-15 oranında azalttığı rapor edilmiştir, biyopsi bulguları da büyük miyelinli liflerin kaybını göstermiştir (Krarup-Hansen ve ark., 2007). Çalışmamızda Sisplatin+AYM grubunda rejenerasyon belirtisi olarak myelin yapısında sıkılık ve yoğunluk artışı izlendi. Önceki çalışmalarda AYM'nin sinir rejenerasyon özelliğine sahip olduğu ve miyelin oluşumunu desteklediği, sinir dokusunda iyileşme için kan beyin bariyerini geçebileceği rapor edilmiştir (Chang ve ark., 2016; Cheng ve ark., 2016). *In vitro* ortamda serebellar hücreler üzerinde AYM'nin miyelinizasyon üzerindeki etkileri araştırılmış, miyelinasyon sürecinin, kontrollere kıyasla daha erken başladığı ve daha yüksek bir oranla karakterize edildiği bildirilmiştir. Böylece, AYM ekstresinin, kültürü hazırlanmış serebellar hücrelerin normal gelişimini teşvik ettiği ve miyelin oluşumu süreci üzerinde düzenleyici bir etki

gösterdiği rapor edilmiştir (Kolotushkina ve ark., 2003). Önceki çalışmalarda elde edilen remiyelinizasyon bulguları bizim AYM ile aldığımız sonuçları destekler mahiyettedir.

Sisplatin grubunda S100'ün zayıfladığı görüldü. Bu grupta parlak kırmızı floresan görüntü noktaları, Schwann hücrelerinin aktivasyonunun işaretidir. Schwann hücrelerinin dejenerasyonu ve periferik nöropati alanında Schwann hücre aktivasyonu S100 immunhistokimya boyaması ve floresan görüntülemesiyle belirlenir. Hasarlı sinirlerin rejenerasyonu Schwann hücresi impuls yanıtına bağlıdır (Gomez-Sanchez ve ark., 2017). Hasarı takip eden 48 saate kadar Schwann hücreleri miyelin proteinlerini üretmekten vazgeçerler (Zhou ve ark., 2014). Çünkü axonal dejenerasyondan sonra Schwann hücrelerinin aktive edildiği, demiyelinizasyon denen süreçle miyelini parçaladığı, wallerian dejenerasyonu denen süreçle aksonları parçalayıp ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Tricaud ve Park, 2017). Periferik sinir rejenerasyonunun başarısı Schwann hücrelerinin proliferasyonuna ve bu hücrelerin rejenerasyonu destekleyecek trofik faktör üretme yeteneğine bağlıdır (Zhou ve ark., 2014). Sisplatin+ AYM grubunda S100'ün toparlanma eğilimi gösterdiği izlendi. AYM ekstraktı varlığında serebellar hücrelerin miyelizasyon süreci, kontrollere kıyasla daha erken başlamış ve daha yüksek bir oranla karakterize edilmiştir, AYM'nin miyelizasyon oluşum sürecinde düzenleyici etki yaptığı bildirilmiştir (Kolotushkina ve ark., 2003).

Sonuç olarak; periferik nöropatiler hastalarda duyu, motor ve otonom fonksiyon kayıplarına yol açabilmektedir. Lezyon bölgesinden uzakta zayıflatıcı karakterde kronik nöropatik ağrı gelişebilmektedir. Bu yüzden periferik nöropati gelişimini önlemek ve gelişen nöropatiyi tedavi etmek, klinikte hastaların yaşam konforunu sağlamak büyük önem arz etmektedir. Çalışma sonunda Sisplatin grubundaki hayvanlar diğer gruplarla karşılaştırıldığında canlı ağırlık ortalaması, latans süreleri, BKAP değerleri bakımından istatistik fark göstermemiştir. P III Tubulin, nörofilament, myelin ve S100 yapılarında dejeneratif bulgular izlenmiştir. Bununla birlikte Sisplatin+AYM grubunda Sisplatin grubuna göre canlı ağırlık, latans süresi, BKAP değerlerinde iyileşme eğilimi, p III Tubulin, nörofilament ve myelin ve S100 yapılarında rejenerasyon belirtileri gözlenmiştir. AYM tedavisi etkisiyle gerçekleştiğini düşündüğümüz bu iyileşme eğilimi, şayet AYM'nin farklı dozları denense, tedavi süresi daha uzun sürdürülse AYM'nin

terapötik etkisi istatistik olarak önemli olabilirdi. Sonuçlarımızın daha ileri prelinik ve klinik çalışmalara ışık tutacağı ümit edilmektedir.

Daha ileri çalışmalar için öneriler

- Sisplatinin nöropati oluşum mekanizması daha iyi aydınlatılmalı
- AYM'nin biyoaktif maddeleri saptanmalı ve etki mekanizmaları aydınlatılmalı
- Periferik nöropatiyi önlemek ve tedavi etmek için AYM'nin biyoaktif maddelerinin prelinik ve klinik ortamlarda olası uygulamasını desteklemek için doğal ve sentetik bileşikleri geliştirilmeli.
- AYM'nin periferik sinirler üzerinde rejenerasyon ve fonksiyonel iyileşme etkisinin daha iyi anlaşılması için farklı dozlar denenmeli, uzun süreli çalışmalar planlanmalı

ÖZET

Aden M, Deneysel periferik nöropatide aslan yelesi mantarının (*Hericium erinaceus*) rejeneratif etkisinin araştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2018. Kemoterapi kaynaklı periferik nöropati (CIPN), kanser hastalarında önemli, doz sınırlayıcı bir yan etkidir. Cis-diklorodiamin (II) platin (CDDP, sisplatin) platin bazlı kemoterapötik ajandır. Dünya Sağlık Örgütü'nün Temel İlaçlar Listesi'nde listelenen sisplatin, baş, boyun, küçük hücreli akciğer kanseri, testis, ovaryum, beyin ve mesane kanserleri gibi çeşitli katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nörotoksisite sisplatin'in en yaygın ve doz sınırlayıcı yan etkisidir. Sisplatin tedavisi alan kanser hastalarının % 30'unda ciddi akut ve kronik periferik nöropatiler görülmektedir. Bu bağlamda kemoterapiyle kanser hastalarını hayata bağlarken periferik nöropati komplikasyonuna karşı önlem almak, hastaların yaşam kalitelerini yükseltmek büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle, yeni, etkili ve güvenli nöroprotektif ajanların keşfine yönelik araştırmalar son yıllarda yaygınlaştı. Yenilebilir ve tıbbi bir mantar olan Aslan Yelesi Mantarı (AYM) (*Hericium erinaceus*) Asya ülkelerinde binlerce yıldır yaygın olarak tüketilmektedir. AYM'nin antikarsinojenik etkisinin olduğu, sinir ve beyin sağlığı ile ilgili terapötik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir Bu çalışmada sisplatin duyarlı B ALB/c ırkı farelerde periferik nöropati modeli oluşturuldu. AYM'nin sıcak su ekstraktı hazırlandı, intraperitoneal yolla hayvanlara uygulandı. Periferik sinirler üzerindeki etkiler canlı ağırlık testi, elektromyografik inceleme ve immunohistokimyasal tekniklerle araştırıldı. Bulgular periferik nöropati modelinin oluşturulduğunu doğruladı. Morfolojik ve fonksiyonel bulgular AYM'nin periferik nöropatili hayvanlarda periferik sinir rejenerasyonu başlattığını gösterdi. Ancak AYM tedavi grubunun sisplatin grubundan olan farkı istatistiksel olarak anlamlı değildi. AYM'nin rejeneratif kapasitesinin aydınlatılmasına yönelik uzun süreli ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Cisplatin, periferik nöropati, *Hericium erinaceus*, sinir rejenerasyonu

SUMMARY

Aden M, Investigation of the regenerative effect of lion's mane (*Hericium erinaceus*) mushroom in experimental peripheral neuropathy, Van Yuzuncu Yd University, Institute of Health Sciences, Faculty of Medicine; Department of Physiology, Thesis for Master of Science, Van, 2018.

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a substantial, dose-limiting side effect in cancer patients. Cis-dichlorodiamine (II) platinum (CDDP, cisplatin) is a platinum-based chemotherapeutic agent. Cisplatin, which is listed in the World Health Organization's List of Essential Drugs, is widely used in the treatment of various solid tumors such as head, neck, small cell lung cancer, testis, ovary, brain and bladder cancers. Neurotoxicity is the most common and dose limiting side effect of cisplatin. Severe acute and chronic peripheral neuropathies are seen in 30% of cancer patients receiving cisplatin therapy. In this context, it is very important to take preventive measures against peripheral neuropathy complications while increasing the quality of life of cancer patients with chemotherapy. For this reason, researches into the discovery of new, effective, and safe neuroprotective agents have become widespread in recent years. Lion's mane (*Hericium erinaceus*) mushroom (LMM), an edible and medical fungus, has been widely consumed in Eastern Asian countries for thousands of years. It has been reported that LMM has an anticarcinogenic effect and has therapeutic activities related to nerve and brain health. In this study, a peripheral neuropathy model was established in cisplatin-sensitive B ALB/c mice. The warm water extract of LMM was prepared, applied to the animals intraperitoneally. The effects on peripheral nerves were investigated by live weight test, electromyographic examination and immunohistochemical techniques. The findings confirmed that a peripheral neuropathy model was established. Morphological and functional findings showed that LMM initiated peripheral nerve regeneration in animals with peripheral neuropathy. However, the difference between the LMM treatment group and the cisplatin group (LMM) was not statistically significant. Long-term and further studies are needed to clarify the regenerative capacity of the LMM.

Key words: Cisplatin, peripheral neuropathy, *Hericium erinaceus*, nerve regeneration,

KAYNAKLAR

- Adeyemi OO, Ishola, IO, Ajani, ID (2017). Citrullus colocynthis Linn. Fruit extract ameliorates cisplatin-induced hepato-renal toxicity in rats. *J Complement Integr Med*, 15, 1.
- Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, 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.
- Alvarez S, Calin A, Graffmo KS, Moldovan M, Kramp, C (2013). Peripheral motor axons of SOD1(G127X) mutant mice are susceptible to activity-dependent degeneration. *Neuroscience*, 241, 239-249.
- Amptoulach S, Tsavaris N (2011). Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *ChemotherRes Pract*, 843019.
- Argyriou AA, Kyritsis AP, Makatsoris T, Kalofonos, HP (2014). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adults: a comprehensive update of the literature. *Cancer Manag Res*, 6, 135-147.
- Baas PW. (1999). Microtubules and neuronal polarity: lessons from mitosis. *Neuron*, 22, 1, 23-31.
- Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker, GA (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci, U S A* 85, 21, 8335-8339.
- Baas PW, Yu WQ (1996). A composite model for establishing the microtubule arrays of the neuron. *Molecular Neurobiology*, 12, 2, 145-161.
- Babaei G, Aliarab A, Abroon S, Rasmi Y, Aziz SG (2018). Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. *Biomed Pharmacother*, 106, 239-246.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139, 2, 267-284.
- Beuche W, Friede RL (1986). Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration of peripheral nerves depends on silica-sensitive, bg/bg-negative and Fc-positive monocytes. *Brain Res*, 378, 1, 97-106.
- Bobylev I, Joshi AR, Barham M, Neiss WF, Lehmann HC (2017). Depletion of Mitofusin-2 Causes Mitochondrial Damage in Cisplatin-induced Neuropathy. *Mol Neurobiol*, 55, 2, 1227-1235

- Bodurka-Bevers D, Basen-Engquist K, Carmack CL, Fitzgerald MA, Wolf JK, de Moor, C, Gershenson DM (2000). Depression, anxiety, and quality of life in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 78, 3 Pt 1, 302-308.
- Boron WF, Boulpaep EL (2017). *Medical Physiology*, 3rd Edition, Elsevier, Philadelphia.
- Cameron AC, Touyz RM, Lang NN (2016). Vascular Complications of Cancer Chemotherapy. *Can J Cardiol*, 32, 7, 852-862.
- Cao BB, Li D, Xing X, Zhao Y, Wu K, Jiang F, Yin W, Li JD (2018). Effect of cisplatin on the clock genes expression in the liver, heart and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 501, 2, 593-597.
- Cavaletti G, Alberti P, Marmioli P (2011). Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in the era of pharmacogenomics. *Lancet Oncol*, 12, 12, 1151-1161.
- Chang HC, Yang HL, Pan JH, Korivi M, Pan JY, Hsieh MC, Chao PM, Huang PJ, Tsai CT, Hseu YC (2016). *Hericium erinaceus* Inhibits TNF-alpha-Induced Angiogenesis and ROS Generation through Suppression of MMP-9/NF-kappaB Signaling and Activation of Nrf2-Mediated Antioxidant Genes in Human EA.hy926 Endothelial Cells. *Oxid Med Cell Longev*, 8257238.
- Cheng JH, Tsai CL, Lien YY, Lee MS, Sheu SC (2016). High molecular weight of polysaccharides from *Hericium erinaceus* against amyloid beta-induced neurotoxicity. *BMC Complement Altern Med*, 16, 170.
- Choi WS, Kim YS, Park BS, Kim JE, Lee SE (2013). Hypolipidaemic Effect of *Hericium erinaceum* Grown in *Artemisia capillaris* on Obese Rats. *Mycobiology*, 41, 2, 94-99.
- Coleman M (2005). Axon degeneration mechanisms: Commonality amid diversity. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 11, 889-898.
- Conforti L, Adalbert R, Coleman MP (2007). Neuronal death: where does the end begin? *Trends in Neurosciences*, 30, 4, 159-166.
- Dasari S, Tchounwou PB (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 740, 364-378.
- de Jongh FE, van Veen RN, Veltman SJ, de Wit R, van der Burg MEL, van den Bent MJ, Planting AS, Graveland WJ, Stoter G, Verweij J (2003). Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Brit J Cancer*, 88, 8, 1199-1206.
- Diling C, Xin Y, Chaoqun Z, Jian Y, Xiaocui T, Jun C, Ou S, Yizhen X (2017a). Extracts from *Hericium erinaceus* relieve inflammatory bowel disease by regulating immunity and gut microbiota. *Oncotarget*, 8, 49, 85838-85857.
- Diling C, Chaoqun Z, Jian Y, Jian L, Jiyan S, Yizhen X, Guoxiao L (2017b). Immunomodulatory Activities of a Fungal Protein Extracted from *Hericium erinaceus* through Regulating the Gut Microbiota. *Front Immunol*, 8, 666.

- Dun XP, Parkinson DB (2015). Visualizing peripheral nerve regeneration by whole mount staining. *PLoS One*, 10, 3, e0119168.
- Fried K, Govrinlippmann R, Rosenthal F, Ellisman MH, Devor M (1991). Ultrastructure of Afferent Axon Endings in a Neuroma. *Journal of neurocytology*, 20, 8, 682-701.
- Friedman M (2015). Chemistry, Nutrition, and Health-Promoting Properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia and Their Bioactive Compounds. *J Agr Food Chem*, 63, 32, 7108-7123.
- Fu SY, Gordon T (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*, 14, 1-2, 67-116.
- Gill JS, Windebank AJ (1998). Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J Clin Invest*, 101, 12, 2842-2850.
- Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, Fazal SV, Benito C, Wagstaff LJ, Mirsky R, Lessen KR (2017). After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. *Journal of Neuroscience*, 37, 37, 9086-9099.
- Gordon T (2009). The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus*, 26, 2, E3.
- Gordon T, English AW (2016). Strategies to promote peripheral nerve regeneration: electrical stimulation and/or exercise. *Eur J Neurosci*, 43, 3, 336-350.
- Gordon T, Fu SY (1997). Long-term response to nerve injury. *Adv Neurol*, 72, 185-199.
- Guindon J, Deng LT, Fan BC, Wager-Miller J, Hohmann AG (2014). Optimization of a cisplatin model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice: use of vitamin C and sodium bicarbonate pretreatments to reduce nephrotoxicity and improve animal health status. *Molecular Pain*, 10.
- Guo L, Hamre J, Eldridge S, Behrsing HP, Cutuli FM, Mussio J, Davis M (2017). Editor's Highlight: Multiparametric Image Analysis of Rat Dorsal Root Ganglion Cultures to Evaluate Peripheral Neuropathy-Inducing Chemotherapeutics. *Toxicol Sci*, 156, 1, 275-288.
- Hao L, Xie Y, Wu G, Cheng A, Liu X, Zheng R, Huo H, Zhang J (2015). Protective Effect of *Hericium erinaceus* on Alcohol Induced Hepatotoxicity in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 418023.
- Harvey AR, Lovett SJ, Majda BT, Yoon JH, Wheeler LP, Hodgetts SI (2015). Neurotrophic factors for spinal cord repair: Which, where, how and when to apply, and for what period of time? *Brain Res*, 1619, 36-71.

- He X, Wang X, Fang J, Chang Y, Ning N, Guo H, Huang L, Huang X, Zhao Z (2017). Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Herichium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review. *Int J Biol Macromol*, 97, 228-237.
- Hilliard MA (2009). Axonal degeneration and regeneration: a mechanistic tug-of-war. *Journal of neurochemistry*, 108, 1, 23-32.
- Jibu M, Hagan S, Hameroff SR, Pribram KH, Yasue K (1994). Quantum Optical Coherence in Cytoskeletal Microtubules - Implications for Brain-Function. *Biosystems*, 32, 3, 195-209.
- Jortner BS (2011). Preparation and Analysis of the Peripheral Nervous System. *Toxicol Pathol* 39, 1, 66-72.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum S, and Hudspeth AJ (2013). *Principles of neural science*, New York, NY ; London: McGraw-Hill.
- Kang MH, Law-Davis S, Balaratnasingam C, Yu DY (2014). Sectoral variations in the distribution of axonal cytoskeleton proteins in the human optic nerve head. *Exp Eye Res*, 128, 141-150.
- Karanth S, Yang G, Yeh J, Richardson PM (2006). Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Experimental Neurology*, 202, 161-166.
- Keefe KM, Sheikh IS, Smith GM (2017). Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, ARTN 548.
- Kim SP, Kang MY, Kim JH, Nam SH, Friedman M (2011). Composition and mechanism of antitumor effects of *Herichium erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice. *J Agric Food Chem*, 59, 9861-9869.
- Kim SP, Moon E, Nam SH, Friedman M (2012). *Herichium 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, 5590-5596.
- Kim SP, Nam SH, Friedman M (2013). *Herichium 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, 4898-4904.
- Kolotushkina EV, Moldavan MG, Voronin KY, Skibo GG (2003). The influence of *Herichium erinaceus* extract on myelination process in vitro. *Fiziol Zh*, 49, 38-45.
- Krarp-Hansen A, Helweg-Larsen S, Schmalbruch H, Rorth M, Krarp C (2007). Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. *Brain*, 130, 1076-1088.

Landowski LM, Dyck PJ, Engelstad J, Taylor BV (2016). Axonopathy in peripheral neuropathies: Mechanisms and therapeutic approaches for regeneration. *J Chem Neuroanat*, 76, 19-27.

Lee KC, Kuo HC, Shen CH, Lu CC, Huang WS, Hsieh MC, Huang CY, Kuo YH, Hsieh YY, Teng CC, Lee LY, Tung SY (2017). A proteomics approach to identifying novel protein targets involved in erinacine A-mediated inhibition of colorectal cancer cells' aggressiveness. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21, 588-599.

Lee KF, Chen JH, Teng CC, Shen CH, Hsieh MC, Lu CC, Lee KC, Lee LY, Chen WP, Chen CC, Huang WS, Kuo HC (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, 15073-15089.

Li HF, Wang YR, Huo HP, Wang YX, Tang J (2015). Neuroprotective effects of ultrasound-guided nerve growth factor injections after sciatic nerve injury. *Neural Regen Res*, 10, 1846-1855.

Li IC, Chen YL, Chen WP, Lee LY, Tsai YT, Chen CC, Chen CS (2014). Genotoxicity profile of erinacine A-enriched *Herichium erinaceus* mycelium. *Toxicol Rep*, 1, 1195-1201.

Li IC, Lee LY, Tzeng TT, Chen WP, Chen YP, Shiao YJ, Chen CC (2018). Neurohealth Properties of *Herichium erinaceus* Mycelia Enriched with Erinacines. *Behav Neurol*, 5802634.

Li X, Wang Z, Wang L, Walid E, Zhang H (2012). In vitro antioxidant and anti-proliferation activities of polysaccharides from various extracts of different mushrooms. *Int J Mol Sci*, 13, 5801-5817.

Liang B, Guo Z, Xie F, Zhao A (2013). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of aqueous extract of *Herichium erinaceus* in experimental diabetic rats. *BMC Complement Altern Med*, 13, 253.

Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S (1989). Absence of Wallerian Degeneration Does Not Hinder Regeneration in Peripheral-Nerve. *European Journal of Neuroscience*, 1, 27-33.

Maj MA, Ma J, Krukowski KN, Kavelaars A, Heijnen CJ (2017). Inhibition of Mitochondrial p53 Accumulation by PFT-mu Prevents Cisplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Mol Neurosci*, 10, 108.

Martini R, Schachner M, Brushart TM (1994). The L2/Hnk-1 Carbohydrate Is Preferentially Expressed by Previously Motor Axon-Associated Schwann-Cells in Reinnervated Peripheral-Nerves. *Journal of Neuroscience*, 14, 7180-7191.

Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC (2013). Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*, 29, 317-330.

- Mohan R, John A (2015). Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *Iubmb Life*, 67, 395-403.
- Murillo B, Sousa MM (2018). Neuronal intrinsic regenerative capacity: The impact of microtubule organization and axonal transport. *Dev Neurobiol*, 10.1002/dneu.22602
- Muszynska B, Grzywacz-Kisielewska A, Kala K, Gdula-Argasinska J (2018). Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 243, 373-381.
- Namgung U, Choi BH, Park S, Lee JU, Seo HS, Suh BC, Kim KT (2004). Activation of cyclin-dependent kinase 5 is involved in axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci*, 25, 422-432.
- Navarro X (2016). Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview. *Eur J Neurosci*, 43, 271-286.
- Nave KA, Werner HB (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 503-533.
- Ozturk G, Cengiz N, Erdogan E, Him A, Oguz EK, Yenidunya E, Aysit N (2013). Two distinct types of dying back axonal degeneration in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 39, 362-376.
- Park SA, Choi KS, Bang JH, Huh K, Kim SU (2000). Cisplatin-induced apoptotic cell death in mouse hybrid neurons is blocked by antioxidants through suppression of cisplatin-mediated accumulation of p53 but not of Fas/Fas ligand. *J Neurochem*, 75, 946-953.
- Park SB, Goldstein D, Krishnan AV, Lin CS, Friedlander ML, Cassidy J, Koltzenburg M, Kiernan MC (2013). Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: a critical analysis. *CA Cancer J Clin*, 63, 419-437.
- Perry VH, Brown MC (1992). Macrophages and nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 2, 679-682.
- Pfaff DW, Volkow ND (2016). *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, 2nd Edition, New York, Springer.
- Pisciotta C, Bai Y, Brennan KM, Wu X, Grider T, Feely S, Wang S, Moore S, Siskind C, Gonzalez M, Zuchner S, Shy ME. 2015. Reduced neurofilament expression in cutaneous nerve fibers of patients with CMT2E. *Neurology*, 85, 228-234.
- Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, Schlattau A, Lathroum L, Windebank AJ (2011). Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis*, 41, 661-668.
- Podratz JL, Kulkarni A, Pleticha J, Kanwar R, Beutler AS, Staff NP, Windebank AJ (2016). Neurotoxicity to DRG neurons varies between rodent strains treated with cisplatin and bortezomib. *J Neurol Sci*, 362, 131-135.

- Poggio F, Bruzzone M, Ceppi M, Ponde NF, La Valle G, Del Mastro L, de Azambuja E, Lambertini M (2018). Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*, 29, 1497-1508.
- Raman J, Lakshmanan H, John PA, Zhijian C, Periasamy V, David P, Naidu M, Sabaratnam V (2015). Neurite outgrowth stimulatory effects of myco synthesized AuNPs from *Herichium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. on pheochromocytoma (PC-12) cells. *Int J Nanomedicine*, 10, 5853-5863.
- Ranganath C, Rainer G (2003). Neural mechanisms for detecting and remembering novel events. *Nat Rev Neurosci*, 4, 193-202.
- Rosberg HE, Carlsson KS, Dahlin LB (2005). Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 39, 360-369.
- Rosso G, Liashkovich I, Young P, Shahin V (2017). Nano-scale Biophysical and Structural Investigations on Intact and Neuropathic Nerve Fibers by Simultaneous Combination of Atomic Force and Confocal Microscopy. *Front Mol Neurosci*, 10, 277.
- Sanchez C (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synth Syst Biotechnol*, 2, 13-22.
- Seow SLS, Naidu M, David P, Wong KH, Sabaratnam V (2013). Potentiation of neurotogenic activity of medicinal mushrooms in rat pheochromocytoma cells. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 13, Artn 157.
- Seretny M, Currie GL, Sena ES, Ramnarine S, Grant R, MacLeod MR, Colvin LA, Fallon M (2014). Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain*, 155, 2461-2470.
- Shin JE, ve Cho Y (2017). Epigenetic Regulation of Axon Regeneration after Neural Injury. *Mol Cells*, 40, 10-16.
- Shin YK, Jang SY, Yun SH, Choi YY, Yoon BA, Jo YR, Park SY, Pak MG, Park JI, Park HT (2017). Cooperative interaction of hepatocyte growth factor and neuregulin regulates Schwann cell migration and proliferation through Grb2-associated binder-2 in peripheral nerve repair. *Glia*, 65, 1794-1808.
- Song J, Li X, Li Y, Che J, Li X, Zhao X, Chen Y, Zheng X, Yuan W (2017). Biodegradable and biocompatible cationic polymer delivering microRNA-221/222 promotes nerve regeneration after sciatic nerve crush. *Int J Nanomedicine*, 12, 4195-4208.
- Starobova H, Vetter I (2017). Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Mol Neurosci*, 10, 174.
- Stoll G, Muller HW (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: Basic insights. *Brain Pathology*, 9, 313-325.

- Strumberg D, Brugge S, Korn MW, Koeppen S, Ranft J, Scheiber G, Reiners C, Mockel C, Seeber S, Scheulen ME (2002). Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. *Ann Oncol*, 13, 229-236.
- Sullivan R, Dailey T, Duncan K, Abel N, Borlongan CV (2016). Peripheral Nerve Injury: Stem Cell Therapy and Peripheral Nerve Transfer. *Int J Mol Sci*, 17.
- Taner D (2017). *Fonksiyonel Anatomi Ekstremiteler ve Sırt Bölgesi*. 11.Baskı, İstanbul, Nobel.
- Tang HY, Yin X, Zhang CC, Jia Q, Gao JM (2015). Structure Diversity, Synthesis, and Biological Activity of Cyathane Diterpenoids in Higher Fungi. *Current Medicinal Chemistry*, 22, 2375-2391.
- Tricaud N, Park HT (2017). Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm. *Cell Mol Life Sci*, 74, 22, 4049-4057.
- Trovato A, Siracusa R, Di Paola R, Scuto M, Ontario ML, Bua O, Di Mauro P, Toscano MA, Petralia CCT, Maiolino L, Serra A, Cuzzocrea S, Calabrese V (2016). Redox modulation of cellular stress response and lipoxin A4 expression by *Hericium Erinaceus* in rat brain: relevance to Alzheimer's disease pathogenesis. *Immun Ageing*, 13, 23.
- Tsai-Teng T, Chin-Chu C, Li-Ya L, Wan-Ping C, Chung-Kuang L, Chien-Chang S, Chi-Ying HF, Chien-Chih C, Shiao YJ (2016). Erinacine A-enriched *Hericium erinaceus* mycelium ameliorates Alzheimer's disease-related pathologies in APPswe/PS1dE9 transgenic mice. *J Biomed Sci*, 23, 49.
- Tuffaha SH, Budihardjo JD, Sarhane KA, Khusheim M, Song D, Broyles JM, Salvatori R, Means KR, Jr., Higgins JP, Shores JT, Cooney DS, Hoke A, Lee WP, Brandacher G (2016a). Growth Hormone Therapy Accelerates Axonal Regeneration, Promotes Motor Reinnervation, and Reduces Muscle Atrophy following Peripheral Nerve Injury. *Plast Reconstr Surg*, 137, 1771-1780.
- Tuffaha SH, Singh P, Budihardjo JD, Means KR, Higgins JP, Shores JT, Salvatori R, Hoke A, Lee WP, Brandacher G (2016b). Therapeutic augmentation of the growth hormone axis to improve outcomes following peripheral nerve injury. *Expert Opin Ther Targets*, 20, 1259-1265.
- Ullsperger M, Danielmeier C, Jocham G (2014). Neurophysiology of performance monitoring and adaptive behavior. *Physiol Rev*, 94, 35-79.
- Wang H, Zhu H, Guo Q, Qian T, Zhang P, Li S, Xue C, Gu X (2017a). Overlapping Mechanisms of Peripheral Nerve Regeneration and Angiogenesis Following Sciatic Nerve Transection. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 323.
- Wang M, Kanako N, Zhang Y, Xiao X, Gao Q, Tetsuya K (2017b). A unique polysaccharide purified from *Hericium erinaceus* mycelium prevents oxidative stress induced by H2O2 in human gastric mucosa epithelium cell. *PLoS One*, 12, e0181546.

- Wang P, Zhang P, Huang J, Li M, Chen X (2013). Trichostatin A protects against cisplatin-induced ototoxicity by regulating expression of genes related to apoptosis and synaptic function. *Neurotoxicology*, 37, 51-62.
- Watson JC, Dyck PJ (2015). *Peripheral Neuropathy: A Practical Approach to Diagnosis and Symptom Management*. *Mayo Clin Proc*, 90, 940-951.
- Woller SA, Corr M, Yaksh TL (2015). Differences in cisplatin-induced mechanical allodynia in male and female mice. *Eur J Pain*, 19, 1476-1485.
- Woller SA, Ravula SB, Tucci FC, Beaton G, Corr M, Isseroff RR, Soulika AM, Chigbrow M, Eddinger KA, Yaksh TL (2018). Systemic TAK-242 prevents intrathecal LPS evoked hyperalgesia in male, but not female mice and prevents delayed allodynia following intraplantar formalin in both male and female mice: The role of TLR4 in the evolution of a persistent pain state. *Brain Behavior and Immunity*, 69, 632-632.
- Wong J-Y, Abdulla MA, Raman J, Phan C-W, Kuppusamy UR, Golbabapour S, Sabaratnam V (2013). Gastroprotective Effects of Lion's Mane Mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers. (Aphyllphoromycetidae) Extract against Ethanol-Induced Ulcer in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-9.
- Wong KH, Naidu M, David P, Abdulla MA, Abdullah N, Kuppusamy UR, Sabaratnam V (2011). Peripheral Nerve Regeneration Following Crush Injury to Rat Peroneal Nerve by Aqueous Extract of Medicinal Mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. (Aphyllphoromycetidae). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 580752.
- Yakabi K, Sadakane C, Noguchi M, Ohno S, Ro S, Chinen K, Aoyama T, Sakurada T, Takabayashi H, Hattori T (2010). Reduced Ghrelin Secretion in the Hypothalamus of Rats due to Cisplatin-induced Anorexia. *Endocrinology*, 151, 3773-3782.
- Yamamoto K, Okui R, Yamatodani A (2018). Effects of a histamine H4 receptor antagonist on cisplatin-induced anorexia in mice. *Neurosci Lett*, 676, 103-107.
- Yi Z, Shao-Long Y, Ai-Hong W, Zhi-Chun S, Ya-Fen Z, Ye-Ting X, Yu-Ling H (2015). Protective Effect of Ethanol Extracts of *Hericium erinaceus* on Alloxan-Induced Diabetic Neuropathic Pain in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 595480.
- Zhang C, Li J, Hu C, Wang J, Zhang J, Ren Z, Song X, Jia L (2017a). Antihyperglycaemic and organic protective effects on pancreas, liver and kidney by polysaccharides from *Hericium erinaceus* SG-02 in streptozotocin-induced diabetic mice. *Sci Rep*, 7, 10847.
- Zhang CC, Cao CY, Kubo M, Harada K, Yan XT, Fukuyama Y, Gao JM (2017b). Chemical Constituents from *Hericium erinaceus* Promote Neuronal Survival and Potentiate Neurite Outgrowth via the TrkA/Erk1/2 Pathway. *Int J Mol Sci*, 18, 8, pii: E1659.
- Zhang J, An S, Hu W, Teng M, Wang X, Qu Y, Liu Y, Yuan Y, Wang D (2016a). The Neuroprotective Properties of *Hericium erinaceus* in Glutamate-Damaged Differentiated PC12 Cells and an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Int J Mol Sci*, 17, 11, pii: E1810.

Zhang M, Jiang MH, Kim DW, Ahn W, Chung E, Son Y, Chi G (2017c). Comparative Analysis of the Cell Fates of Induced Schwann Cells from Subcutaneous Fat Tissue and Naive Schwann Cells in the Sciatic Nerve Injury Model. *BiomedRes Int*, 2017, 1252851.

Zhang Z, Yu B, Gu Y, Zhou S, Qian T, Wang Y, Ding G, Ding F, Gu X (2016b). Fibroblast-derived tenascin-C promotes Schwann cell migration through betal-integrin dependent pathway during peripheral nerve regeneration. *Glia*, 64, 374-385.

Zhou Z, Liu Y, Nie X, Cao J, Zhu X, Yao L, Zhang W, Yu J, Wu G, Liu Y, Yang H (2014). Involvement of upregulated SYF2 in Schwann cell differentiation and migration after sciatic nerve crush. *Cell Mol Neurobiol*, 34, 1023-1036.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Van'da doğdu. İlk ve orta Öğretimini bu şehirde okudu. 2001 yılında İnönü Üniversitesi Tıbbi Labaratuar Programından, 2009 yılında Anadolu Üniversitesi Kamu Yönetimi Bölümünden ve 2011 yılında Y.Y. Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun olmuştur. Evli ve 4 çocuk babasıdır.

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 07/08/2018

Tez Başlığı / Konusu: **Deneysel periferik nöropatide aslan yelesi mantarının (*Hericium erinaceus*)**

rejeneratif etkisinin araştırılması

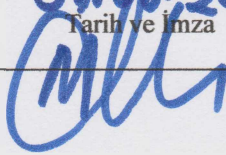
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 43 sayfalık kısmına ilişkin, 07/08/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Tuminin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6 (Altı) dır.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

07.08.2018
Tarih ve İmza


Adı Soyadı: Mustafa ADEN

Öğrenci No:.....

Anabilim Dalı: Van YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı

Programı: Tıp Programı.....

Statüsü: Y.Lisans X, DoktoraD

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR


Dr. Öğr. Üyesi Ramazan Üstün

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ

VAN YUZUNCUY/LUNİVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmannın Adı <i>Title of the Research</i>	Deneyisel Periferik Nöropatide Aslan Yelesi Mantarının (<i>Hericium erinaceus</i>) Rejeneratif Etkisinin Araştırılması Investigation of Regenerative Effect of Lion's mane mushroom (<i>Hericium erinaceus</i>) on Experimental Peripheral Neuropathy	
Araştırmacı(lar) <i>Investigator(s)</i>	Yürütücü / <i>Chief investigator</i> : Dr. Öğr. Ü. Ramazan ÜSTÜN Yardımcı Araştırmacı(lar) / <i>Co-investigator(s)</i> : Biyolog Mustafa ADEN	
Araştırmannın Başlama Tarihi / <i>Research Starting Date</i> : 01.06.2014		
Araştırmannın Bitiş Tarihi / <i>Research Completion Date</i> : 01.06.2018		
Proje Süresi / <i>Total Time of Project</i> : 48 Ay		
Proje No / <i>Project Number</i> : 2014-SBE-YL-149		
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		
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 28/06/2018 tarih ve 2018/06 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Van Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 28/06/2018 (decision number 2018/06).		
	OTL Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	ÜYE Prof. Dr. Sıddık KESKİN	ÜYE Prof. Dr. Suphi DENİZ
ÜYE Prof. Dr. Nalan ÖZDAL	ÜYE Dr. Dr. Atilla DÜKÜMÜŞ	ÜYE Doç. Dr. Yıldırım BASBUĞAN
ÜYE Doç. Dr. Ferda KARAĞUŞ	ÜYE Dr. Öğr. Ü. Ü. Oruc ALLAHVERDİYEV	ÜYE Dr. Öğr. Ü. Canser Yılmaz DEMİR
ÜYE Dr. Öğr. Ü. H. Er ŞAİN AYDINYURT	ÜYE Dr. Öğr. Ü. ONALAN	ÜYE Vel. Hek. Kerem OĞRAK
ÜYE Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	ÜYE Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10208432
Yazar Adı / Soyadı	MUSTAFA ADEN
T.C.Kimlik No	38068554302
Telefon	5053867115
E-Posta	mustafabitik65@hotmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	DeneySEL Periferik Nöropatide Aslan Yelesi Mantarının (HericiuM Erinaceus) Rejeneratif Etkisinin Araştırılması
Tezin Tercümesi	Investigation of the regenerative effect of lion's mane (HericiuM erinaceus) mushroom in experimental peripheral neuropathy
Konu	Fizyoloji = Physiology
Üniversite	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Fizyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2018
Sayfa	65
Tez Danışmanları	DR. ÖĞR. ÜYESİ RAMAZAN ÜSTÜN
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	

16.08.2018

İmza:  / F.F.M.F.H.S* / X/7