

KÜLTÜRE KEMİK İLİĞİ KÖK HÜCRESİNİN UÇ-İÇE ONARILMIŞ PERİFERİK SINIR REJENERASYONUNDAKİ ETKİSİ

AFFECT OF CULTURED BONE MARROW CELLS TO PERIPHERAL NERVE REGENERATION WHICH END-IN-END REPAIRED

*Mehmet Çıfci, *Ahmet Demir, *Yener Demirtaş, **Bülent Ayas.

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi AD, SAMSUN

** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji AD, SAMSUN

ÖZET

Periferik sinir yaralanmaları, travma ve tümör rezeksiyonu sonrası sık karşılaşılan sorunlardan biridir. Periferik sinir onarımında elde edilecek başarılı sonuçlar hastayı ve hekimi birçok problemden kurtaracaktır. Çalışmamız, sinir onarımını daha kaliteli hale getirebilmek amacıyla uç-ıçe onarım tekniği ile son yıllarda popüler olan kök hücre teknolojisini beraber kullanmıştır. On adet tavşanın her iki siyatik sinirinde kesi oluşturulup uç-ıçe onarım tekniği ile onarıldı. Ardından sadece sağ tarafa mezankimal kök hücre enjeksiyonu yapıldı. Birinci grup hayvandan (n=5) ilk ay sonunda, ikinci grup hayvandan (n=5) ise üçüncü ay sonunda onarım bölgelerinden örnekler alındı. Bu örneklerden hazırlanan preparatlarda akson rejenerasyon oranı, miyelin kılıf kalınlığı ve akson çapları stereolojik analiz ile incelendi. Elde edilen sonuçlar istatistik olarak karşılaştırıldığında mezankimal kök hücre uygulanan sağ tarafta anlamlı ölçüde aksonal rejenerasyonun fazla olduğu gösterildi ($p<0,05$).

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries are widespread problems and seen after tumor resection and trauma. Nerve regeneration line is the most important point in transition of signal and lots of tecnicis are developed for regeneration. In our study were used end-in-end repair recently restoration technique together with stem cell technology which is so popular, because of improving nerve regeneration. In both of ischiadic nerves of 10 New Zeland rabbits were performed incision and were repaired with the end-in-end repair technique. Then were given mesenchimal stem cell injection to only right sides. From the first group (n=5) in the end of first month and from the second group (n=5) in the end of thirth month were taken specimens. In the samples which were prepared from these specimens, were evaluated axonal regeration rates, myelin nerve thickness and axonal diameters with stereological analysis. Were demonstrated that in the right sides that were injected mecenchimal stem cell, axonal regeration were too much than others ($p<0.005$).

GİRİŞ

Periferik sinir onarımları; travma, tümör rezeksiyonu sonrası ve fonksiyonel kas transferi gibi durumlarda duyu ve motor fonksiyonları geri döndürmek amacıyla uygulanmaktadır. Periferik sinir onarımı için tercih edilebilecek yöntemler epinöral, fasiküler, grup fasiküler ve uç-ıçe onarım teknikleridir. Son yıllarda klinik uygulamaları giderek artan uç-ıçe onarım yönteminin bazı özellikleri ile diğer tekniklerden üstün olduğu gösterilmiştir.¹ Bu teknikte proksimal ve distal sinir uçları yan yana getirildikten sonra distal uç yaklaşık 0,5 cm epinöryumu sağlam kalacak şekilde sıyırılmaktadır. Proksimal uç, distal ucun içine gömülmekte ve sabitliği sağlamak için en az üç adet sütür konmaktadır. Bu şekilde koaptasyon hattı çevre dokular ile temas etmeden bir kılıf içerisinde korunmaktadır. Uç-ıçe sinir onarım tekniği, onarım alanında gerginlik ve kompresyon oluşturmadan sinir uçlarının yaklaşmasını sağlar. Aksonların onarım

hattından kaçışını önler. Daha az sütür materyali kullanıldığından yabancı cisim reaksiyonu ve fibrozis en az olur. Ayrıca aksonal sıvı ve nörotrofik faktörler sinir uçlarında birikerek rejenerasyon için en iyi ortamı sağlar.

Son yıllarda popüler olan kök hücre kavramı, doku ve organların yenilenme ihtiyacı olan birçok hastalıkta umut ışığı olmuştur. Kök hücre denildiğinde kendini yenileyebilen, birden fazla hücre serisine farklılaşabilen ve in vivo fonksiyon görebilen hücreler anlaşılmaktadır.^{2,3} Kök hücre tedavisi, merkezi sinir sisteminin travmatik ve tümöral hasarlarında denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmış olmasına rağmen periferik sinir sistemi üzerinde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda kök hücre teknolojisi ve uç-ıçe sinir onarım tekniği beraber kullanılmıştır. Uç-ıçe onarılmış sinir liflerinin arasında oluşturulan epinöral tüp, kök hücrelerin korunması ve fonksiyon görebilmesi için uygun bir ortam oluşturulup mezan-

kimal kök hücrelerin sinir dokusuna olan potansiyel etkisinin uzun süreli olması sağlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

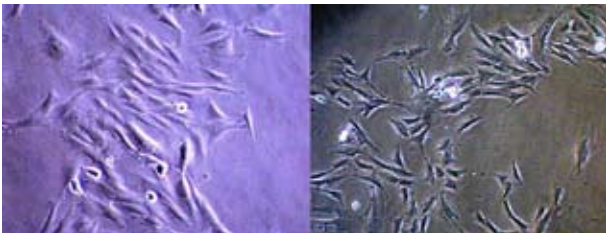
Çalışmamızda, ağırlıkları 2,5 ile 3 kg arasında değişen 10 adet erkek Yeni Zelanda beyaz tavşanı kullanıldı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Etik Kurulu onayı alınmasının ardından cerrahi işlemler ve kemik iliği alımı, intramusküler Ketamine Hidroklorid (Ketalar®) (50 mg/kg) ve Xylazine (Rompun®) (10 mg/kg) anestezisi altında yapıldı.

Çalışmamızın ilk aşamasını kemik iliği alımı oluşturmaktadır. Anestezisi sağlanan hayvanların sağ krista iliaka cildi traş edilip saha temizlendikten sonra özel bir aygıtta monte edilmiş enjektör ile kemik ilikleri aspire edildi. Elde edilen 3–6 cc miktarındaki aspirat steril koşullar altında besi yerlerine (Medyum) konuldu. Bu medyumun içeriği zengin glikoz ve amino asitten oluşmaktadır. Numaralandırılan tavşanlardan ayrı ayrı alınan kemik ilikleri medyumlara yerleştirilip +4 derecede korunarak Mezankimal Kök Hücre (MKH) elde edilmek üzere Trabzon'da bulunan Ati Teknoloji Merkezine gönderildi.

Tavşan mezankimal kök hücre (MKH) elde edilmesi:

Elde edilen kemik iliği aspiratı, MKH üretme vasatı (DMEM, FBS, Antibiyotik) ile karıştırılıp iki kez santrifüj (2000 rpm, 5 dk) edildikten sonra süpernatant atılıp hücre peleti üretme vasatı içerisinde süspansiyon edildi. Mononükleer hücre sayımı yapılarak belli sayıda hücre/cm² hesabıyla kültür kabına aktarılan hücreler 37 C°, % 5 CO₂, %95 RH inkübatörde kültüre alındı. Koloni yaparak üreyen MKH'ler monolayer üreme ile belli oranda konflüensi oluşturduklarında tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak ileri pasajları oluşturmak üzere aynı üretme ortamında kültüre alındı (Şekil 1). Kalite kontrol testleri gerçekleştirilen.^{2,3} pasaj hücrelerin bir kısmı deneylerde kullanılırken geri kalan kısmı krioprezervasyona alındı.^{4,5} Kemik iliği içerisinde bulunan stroma hücreleri, her tavşan aspiratında farklı miktarlarda olduğundan kültür sonuçları değişik zamanlarda elde edildi.

Ortalama iki hafta sonra Ati Teknoloji Merkezi'nden gönderilen mezankimal kök hücreler teslim alındıktan sonra cerrahi işleme geçildi. Bütün



Şekil1: Mezankimal kök hücre (x20) 3. pasaj kültür. ATİ Teknoloji Merkezi-TRABZON

tavşanların sağ ve sol siyatik sinirleri açıldı ve sinir hattına dik bir kesi yapıp ardından uç-üç tekniği ile sinir onarımı yapıldı. Sağ siyatik sinir onarım hattında epinöral tüp içine aynı hayvana ait mezankimal kök hücre enjeksiyonu uygulandı. Sol siyatik sinire ise onarımdan sonra mezankimal kök hücre tatbik edilmedi. Böylece sağ siyatik sinir deney tarafı olurken sol siyatik sinir kontrol tarafı oldu. Cilt altı ve cilt dikişleri ile cerrahi işlem sonlandırıldı. İşlem sonrası tavşanlar eşit iki gruba ayrıldı. Örnekler, onarım hattı ile beraber distal ve proksimalde 0,5 cm sinir dokusu içerecek şekilde alındı. İlk gruptan (n=5) doku örnekleri birinci ay sonunda alınırken, ikinci gruptan (n=5) doku örneği alımı için üç ay beklendi. Böylece mezankimal kök hücrenin sinir rejenerasyonu üzerine etkisi ve bu etkinin zamana bağlı değişimini izlemek mümkün oldu. Histolojik inceleme için her bir spesimenden üç adet parça alındı. Bu parçalar onarım bölgesi, onarım bölgesinin proksimali ve onarım bölgesi distali olarak adlandırıldı. Proksimal ve distal parçalarda rejenere aksonların toplam sinir alanına oranı, akson ve kılıf çapları ayrıca miyelin kılıf kalınlıkları stereolojik analiz yöntemi kullanılarak ölçüldü.^{6,7} Ardından deney ve kontrol gruplarından elde edilen sonuçlar istatistiksel analiz ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Genel Değerlendirme Bulguları:

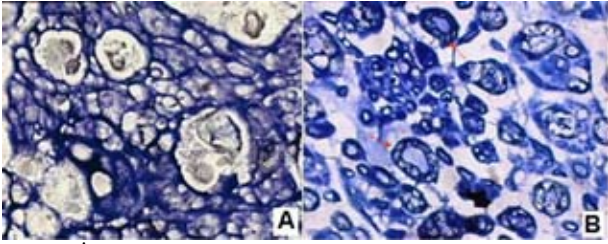
Tavşanların takipleri sırasında her iki bacak siyatik sinirleri kesildiğinden hareket kısıtlılığı gözlemlendi. Tavşanlar ayakta durmakta ve pozisyon değiştirmede zorluklar yaşadılar. Bu sorunlardan dolayı bazı tavşanların ayak topuklarında bası yaraları gelişti. Tavşanların genel durumları bozulmamasına rağmen bu durum morbiditeyi artırdı. Ayak topuklarında bası yaraları gelişen üç tavşan örnek alımları sırasında incelendi. Özellikle sağ (Mezankimal kök hücre uygulanan-deney grubu) tarafta bası yaralarının daha küçük ve yüzeysel olduğu veya daha erken iyileştiği gözlemlendi. Bu değerlendirmeler subjektif olsa da mikroskopi öncesi olumlu fikir vermesi bakımından önemliydi.

Takiplerimizde bir tavşanın ayak parmaklarında duyu kaybına bağlı olarak kendine zarar verme olayı gözlemlendi (self mutilizasyon). Tavşan, sol ayak parmaklarının iskelet sistemi ortaya çıkacak derecede tüm yumuşak dokuyu kemirmişti. Bu yaralanma yine siyatik sinir kesisine bağlı gelişti ve MKH uygulanan sağ ayakta gözlenmedi.

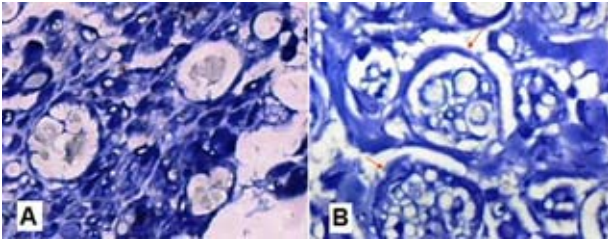
İstatistik Değerlendirme Bulguları:

Çalışmamızda elde edilen veriler önce normalite testi ile kontrol edildi. Grupların normal dağılıma uyduğu gözlemlendi. Ardından tüm gruplar kendi aralarında ve birbirleri ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma için Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi ve Student t testleri kullanıldı. Kök hücre uygulaması yapılan

sağ taraf siyatik siniri ile sol siyatik sinir arasında onarım hattı distali rejenerasyon alanlarının anlamlı derecede farklı olduğu istatistik çalışmaları ortaya çıkarıldı ($p=0,0003$)(Şekil 2). Yine iki taraf siyatik sinirleri arasında onarım hattı proksimali rejenerasyon alanlarının anlamlı derecede farklı olduğu görüldü ($p=0,0001$)(Şekil 3). Miyelin kılıf kalınlıkları ve akson çapları arasında ise anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Rejenerasyon üzerinde zaman faktörünü araştırdığımız birinci ve ikinci gruplar arasında yine anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Rejenere akson oranları, akson çapları ve miyelin kılıf kalınlıkları ortalama değerleri Şekil 4, 5 ve 6'da gösterilmiştir.



Şekil 2. İkinci gruba ait sinir segmentleri distallerinin karşılaştırılması. (x100) A: Sol siyatik sinir, B: Sağ siyatik sinir. Myelin kılıf ve aksonal rejenerasyon sağda belirgin (kırmızı oklar)

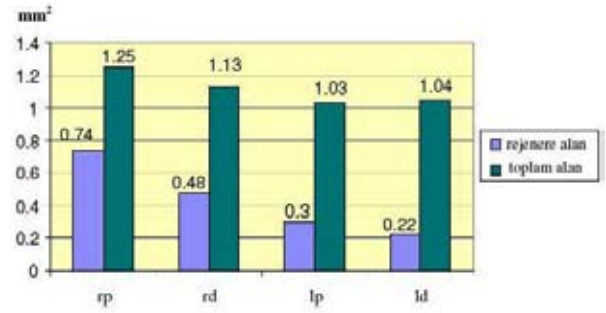


Şekil 3. Birinci gruba ait sinir segmentleri proksimallerinin karşılaştırılması. (x100) A: Sol siyatik sinir, B: Sağ siyatik sinir. Sağda myelin kılıf oluşumu ve aksonal rejenerasyon daha net görülüyor. (kırmızı oklar)

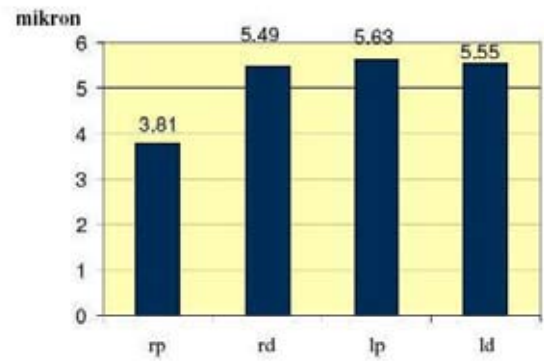
TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları ve serbest fonksiyonel kas transferi sırasında yapılan nöral koaptasyon, sinir uyarılarının son organa ulaşmasında en önemli aşamadır. Onarım sonrası distal sinir segmentinde gerçekleşmesi beklenen rejenerasyon, uyarının hareket veya duyu olarak organlara dağılmasını sağlar. Bu özelliğinden dolayı koaptasyon bölgesinde sinir onarımının kalitesi, aksonal rejenerasyonun başarısında ayrı bir önem kazanır.⁸

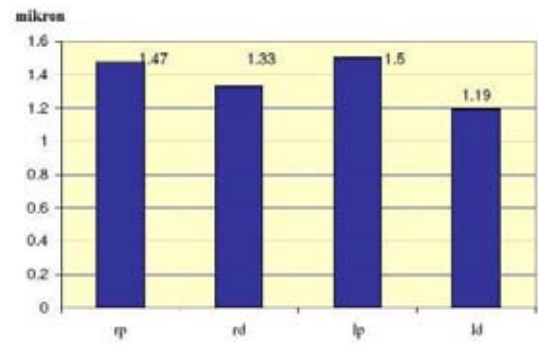
Periferik sinir onarımı için birçok cerrahi teknik tarif edilmiştir. Siemionow ve arkadaşları tarafından iki binli yılların başına geliştirilen "uç-ıçe sinir onarım tekniği" bazı özellikleri ile öne çıkmıştır. Anastomoz hattından kablo kaçışına izin vermemesi, nörotrofik faktörleri içeride ve inflamatuvar mediatörleri dışarıda tutması ve sütürün anastomoz hattında kalmayarak daha az yabancı cisim reaksiyonu oluşturması diğer onarım yöntemlerinden üstün olan özellikleridir.⁹



Şekil 4. İkinci gruba ait rejenerere ve toplam sinir alanı ortalama sonuçları. (rp: sağ siyatik sinir onarım hattı proksimali, rd: sağ siyatik sinir onarım hattı distali, lp: sol siyatik sinir onarım hattı proksimali, ld: sol siyatik sinir onarım hattı distali)



Şekil 5. İkinci gruba ait akson çapları ortalamaları.



Şekil 6. İkinci gruba ait miyelin kılıf kalınlığı ortalamaları.

Periferik sinir cerrahisinde kök hücre kullanımı da yeni bir uygulamadır. Murakami ve ark. periferik sinir defektlerinde transplante edilen nöral kaynaklı kök hücrelerin Schwann hücrelerine benzer şekilde destek hücrelerine dönüşerek anlamlı derecede aksonal rejenerasyonu sağladığı rapor edilmiştir.¹⁰ Cuevas ve ark. stromal hücrelerin, periferik sinirlerin kesik uçlarına implante edildiklerinde yeni fiberlerin rejenerasyonunu desteklediğini göstermiştir.¹¹ Choi ve arkadaşlarının 15 tavşan üzerinde yaptıkları çalışmada, oluşturulan siyatik sinir defekti ven grefti ile onarılmış ve deney tarafına ven grefti içine kültüre

edilmiş kemik iliği stromal hücreleri transplante edilmiştir. 4, 8 ve 12. haftalarda ven grefti, numune olarak alınarak elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Rejenere olan akson sayısı, fiber çapları ve miyelin kılıf kalınlıkları karşılaştırıldığında akson sayılarında anlamlı derecede artış tespit edilmiştir.¹² Sanchez-Ramos ve ark gerek insan gerek fare kemik iliği stromal hücrelerinin sıçan mezensefalik ve striatal hücreleri ile kültüre edildiğinde nöron benzeri hücrelere farklılaştığını göstermişlerdir.¹³

Çalışmamızda mezenkimal kök hücrelerin sinir rejenerasyonuna etkileri incelenmiş ve bu hücrelerin onarım hattının hem distal hemde proksimalinde rejenerasyon alanını artırdığı gösterilmiştir. Onarım sonrası sinir rejenerasyonunun artırılması ile hem fonksiyonel kazanımın artırılabilceği hem de iyileşme süresinin kısaltılabileceği öngörülebilir. Bu çalışmada kullanılan yöntemin kliniğe uyarlanabilmesi halinde sinir onarımı sonrasında elde edilecek sonuçların daha başarılı hale getirilmesi mümkün olacaktır fakat bu yöntemin klinikte kullanımını kısıtlayan; mezenkimal kök hücrelerin kemik iliğinden elde edilmesi ve hazırlanmasındaki zorluklar, yöntemin maliyetli olması gibi dezavantajları olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenlerle gerek bu dezavantajların ortadan kaldırılması, gerekse yöntemin etkinliğinin fonksiyonel sonuçlarda içerecek şekilde araştırılması için ileri çalışmalara da ihtiyaç vardır.

SONUÇ

Çalışmamız, yeni geliştirilen iki yöntemi birleştirerek sinir rejenerasyonu üzerinde kullanmıştır. Bu yöntemlerden ilki olan uç-ıçe sinir onarım tekniği ile sinir uçları yumuşak bir şekilde bir araya gelmiş ve onarım hattı dışında az sayıda olan sütür materyali sayesinde yabancı cisim reaksiyonu da engellenmiştir. Aksonal rejenerasyonun bir yönde olması sağlanıp nöroma oluşumunun önüne geçilmiştir. Uygulanan uç-ıçe tekniği ile sinir dokusu onarım hattının dış çevre ile bağlantısı kesilerek nörotrofik mediatörlerin sızması engellenmiştir. Aynı zamanda bu yöntem, sağ siyatik sinire verilen mezankimal kök hücrelerinde ortamda kalmasını sağlayarak, çevreye yayılmasını önlemiştir.

Dr. Mehmet ÇİFCİ
Diyarbakır Devlet Hastanesi
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği DİYARBAKIR
E-posta: plsmehmet@gmail.com

KAYNAKLAR

1. Siemionow M, Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E. Epineural Sleeve Neurorrhaphy: Surgical Technique And Functional Results- Preliminary Report. *Annals of Plastic Surgery* 2002; 48: 3-10
2. Kök Hücrelerin Kullanım Alanları, Kök Hücre Araştırmalarında Güncel Kavramlar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları 2006; Sayı: 7 s:14-21
3. Okarma TB, Lebkawski J, Schain L, Harwey M. The AIS CELLector: A new technology for stem cell purification *Prog Clin Biol Res*. 1992; 377: 487- 502
4. Im GI. Repair Of Cartilage Defect in The Rabbit With Cultured Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow. *J. Bone Joint Surg Br*. 2001; 83: 289-94
5. Kernan NA, Flomenberg N, Dupont B, O'Reilly RJ. Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. Identification of host-derived antidonor alloctotoxic T lymphocytes. *Transplantation*. 1987 Jun;43(6):842-7.
6. Howard CV and Reed MG. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, 1998, p. 39-44.
7. Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc*. 1986 Jul;143(Pt 1):3-45.
8. Seckel BR. Current Status of Peripheral Nerve Surgery. *Perspectives in Plastic Surgery* 1990; 4: 91
9. Ayhan S, Markal N, Siemionow K, Araneo B, Siemionow M. Effect Of Subepineural Dehydroepiandrosterone Treatment On Healing Of Transected Nerves With The Epineurial Sleeve Technique. *Microsurgery* 2003; 23: 49-58
10. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M. Transplanted Neuronal Progenitor Cells In A Peripheral Nerve Gap Promote Nerve Repair. *Brain Research* 2003; 974: 17-24
11. Cuevas P, Carceller F, Garcia Gomez I, Yan M, Dujovny M. Bone Marrow Stromal Cell Implantation for Peripheral Nerve Repair. *Neuronal Res* 2004; 26: 230-32
12. Choi BH, Zhu JS, Kim BY, Huh JY, Lee HS, Jung JH. Transplantation of Cultured Bone Marrow Stromal Cells Improve Peripheral Nerve Regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34: 537-54
13. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardoza-Pelaez F, Hazzi C. Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neuronal Cells in vitro. *Experimental Neurology* 2000;164: 247-56
14. Emsley J G, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult Neurogenesis and Repair of The Adult CNS With Neural Progenitors, Precursors, and Stem Cells. *Progress in Neurobiology* 2005;75: 321-38
15. Solchaga LA et al. High variability in rabbit bone marrow-derived mesenchymal cell preparations. *Cell Transplant* 1997; 8: 511-519