

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK OMURİLİK YARALANMA MODELİNDE ERİŞKİN
OMURİLİK KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİNİN CHİTOSAN TÜPLER
İÇERİSİNDE İNTRAMEDÜLLER İMPLANTASYONUNUN
SONUÇLARI

Dr. Gökhan BOZKURT

İLERİ NÖROLOJİK BİLİMLER PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2008

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK OMURİLİK YARALANMA MODELİNDE ERİŞKİN
OMURİLİK KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİNİN CHİTOSAN TÜPLER
İÇERİSİNDE İNTRAMEDÜLLER İMPLANTASYONUNUN
SONUÇLARI

Dr. Gökhan BOZKURT

İLERİ NÖROLOJİK BİLİMLER PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu

ANKARA

2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından İleri Nörolojik Bilimler Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı ve Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu,
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı



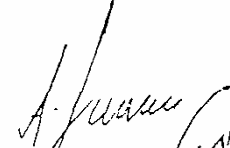
Üye: Prof. Dr. Nejat Akalan
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı



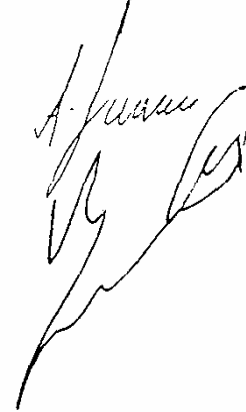
Üye: Prof. Dr. Servet İnci
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Ali Savaş
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı

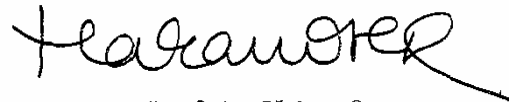


Üye: Doç. Dr. Yasemin Özdemir
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan Ozer

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Prof. Dr. Charles Tator (Canada, Toronto Western Research Institute, Toronto Western Hospital, Department of Surgery and Neurosurgery) tez çalışmasının gerçekleşmesi için gerekli ortamı sağlamıştır. Omurilik yaralanmalarındakiengin bilgi birikimi ve deneyiminden yararlanılmıştır.

Sayın Prof. Dr. Molly S. Shoichet (Department of Chemical Engineering & Applied Chemistry, University of Toronto) biyomühendislik fakültesinde chitosan tüplerin hazırlanmasında yardımcı olmuştur. Omurilik yaralanmalarında kullanılan biyomateryaller ile ilgili mükemmel bilgi ve deneyiminden yararlanılmıştır.

Sayın Prof. Dr. Tunçalp Özgen (HÜ Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı) yurt dışında görgü, bilgi ve deneyim kazanmam için gerekli ortamı sağlamıştır.

Sayın Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu (HÜ Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı) bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde gerekli ortamın sağlanmasında yardımcı olmuştur ve omurilik yaralanmalarındaki deneyimlerinden yararlanılmıştır.

Sayın Andrea J. Mothe (Canada, Toronto Western Research Institute) ve **Sayın Tasneem Zahir** (Canada, Toronto, Terrace Donnelly Centre for Cellular & Biomolecular Research) GFP+ ratlardan omurilik kaynaklı kök hücrelerin izole edilmesi ve bu hücrelerin in vitro ortamda kültüre edilmesi ve hazırlanması aşamasında ve istatistiksel olarak planlamasında yardımcı olmuştur.

Sayın Howard Kim (Department of Chemical Engineering & Applied Chemistry, University of Toronto) biyomühendislik fakültesinde chitosan tüplerin hazırlanmasında yardımcı olmuştur.

Sayın Rita van Bendegem (Canada, Toronto Western Research Institute) ve **Sayın Linda Lee** (Canada, Toronto Western Research Institute) çalışmanın histolojik ve immünohistokimyasal işlemlerinin gerçekleştirilmesinde teknik yönden yardımcı olmuştur. Aynı zamanda hayvanların fonksiyonel değerlendirilmesinde katkıları olmuştur.

Bu çalışma **Ontario Neurotrauma Foundation, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Canadian Paraplegic Association (Ontario Branch)** dan sağlanan bir grant ile gerçekleştirilmiştir.

ÖZET

Bozkurt, G. Kronik omurilik yaralanma modelinde erişkin omurilik kaynaklı kök hücrelerinin chitosan tüpler içerisinde intramedüller implantasyonunun sonuçları. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İleri Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, Ankara, 2008. Erişkin beyin ve omurilikten izole edilen nöral kaynaklı kök hücreler değişik derecelerde aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel iyileşme ile sonuçlanan deneysel hayvan modellerinde hasarlı omurilik içerisine transplante edilmiştir. Herşeye rağmen nöral kök hücrelerin transplantasyon sonrası yaşamda kalma özelliklerinin iyi olmaması omurilik yaralanmalarının onarımında hücre tedavilerinin geliştirilmesinde büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Hasarlı omurilik içerisinde gelişen kaviteyi yeniden inşa etmek ya da köprülemek, aksonal yeniden gelişimi ve filizlenmeyi sağlamak ve rejenerasyon için uygun koruyucu bir çevre oluşturmak için chitosan tüpler daha önce kullanılmıştır. Bu çalışmada hasarlı omurilik içerisine intramedüller chitosan tüplerde verilen nöral kök hücrelerin yaşamda kalma ve farklılaşma özellikleri değerlendirildi. Direkt intramedüller enjeksiyon ile verilen nöral kök hücrelerin yaşamda kalma ve farklılaşma özellikleri ile karşılaştırıldı. Erişkin GFP+ transjenik ratların omuriliğinden elde edilen erişkin nöral kök hücreleri ihtiva eden chitosan tüplerin intramedüller implantasyonu omurilik T8 düzeyinde 35g ekstradural klip kompresyonundan 3 hafta sonra gerçekleştirildi. Bu grupta elde edilen sonuçlar kök hücrelerin direkt enjeksiyonunu ve sadece duratominin yapıldığı travma grubunu içeren 2 farklı gruba karşılaştırıldı. Nöral kök hücrelerin yaşamda kalma ve farklılaşma özellikleri immünohistokimyasal ve histopatolojik incelemelerle değerlendirildi. Fonksiyonel iyileşme travma sonrası 9 haftalık süreçte BBB skorlaması ile tayin edildi. Bu çalışmada kronik omurilik yaralanma modelinde intramedüller chitosan tüplerin nöral kök hücrelerin yaşamda kalma yeteneğini artırdığı gösterildi. Ancak her 2 grubun fonksiyonel iyileşmesinde hiçbir düzelme gözlenmedi. Chitosan tüpler kronik olarak hasarlı omurilik içerisinde nöral kök hücreler yaşamda kalma yeteneğini artırmada etkin biyomateryallerdir.

Anahtar Kelimeler: Chitosan tüp, erişkin omurilik kaynaklı kök hücreler, intramedüller implantasyon, erişkin kronik omurilik yaralanması, rejenerasyon

ABSTRACT

Bozkurt, G. The results of intramedullary implantation of the adult neural stem/progenitor cells (NSPCs) in the chitosan channels (CCs) at chronic spinal cord injury (SCI) model. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Advanced Neurological Sciences Programme. NSPCs isolated from fetal or adult brain and spinal cord have been transplanted into the injured spinal cord (SC) in experimental animal models resulting in varying degrees of axonal regeneration and functional recovery. However, the poor survival of NSPCs posttransplantation remains a major problem in the development of cell therapies for SCI repair. CCs have been previously used to bridge/reconstruct the cavity created within the damaged SC, to promote axonal regrowth or sprouting, and to provide a protective environment hospitable to regeneration. In this study we evaluated the survival and differentiation of NSPCs delivered in intramedullary CCs into the injured SC and compared it with direct intramedullary injection of NSPCs. Intramedullary implantation of CCs containing adult NSPCs harvested from the SC of adult green fluorescent protein transgenic rats was performed 3 weeks after extradural 35g clip injury at T8. This group was compared to two different groups, including direct intramedullary injection of NSPCs and trauma/durotomy alone. We evaluated the survival and differentiation of NSPCs using immunohistochemical and histopathological techniques. Functional improvement was also assessed for 6 weeks with the BBB score. We found that intramedullary CCs enhance the survival of NSPCs in a chronic model of SCI. However, no significant improvement in functional recovery was observed in the group with CCs containing NSPCs relative to the direct intramedullary injection of NSPCs. We conclude that CCs provide an effective means of enhancing the survival of NSPCs within the chronically injured SC.

Key Words: Chitosan channel, adult neural stem/progenitor cells, intramedullary implantation, chronic spinal cord injury, regeneration

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii-viii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix-x
1. GİRİŞ	1-4
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Lezyon yerinde ortaya çıkan moleküler ve hücrel değişiklikler	4-6
2.2. Erişkin memeli SSS neden aksonal rejenerasyon konusunda yetersizdir?	6-9
2.3. Hasarlı aksonların iyileşmesi nasıl sağlanabilir?	9-11
2.4. Aksonal rejenerasyonu teşvik eden deneysel yaklaşımlar	11-39
3. ERİŞKİN SSS KAYNAKLI KÖK HÜCRELER VE REJENERASYON	39-41
3.1. SSS'deki endojen stem/progenitor hücreler ve travmaya cevap	41-43
3.2. SSS yaralanmasında kullanılan nörotrofik ve büyüme faktörleri	43-44
3.3. Kök hücrelerin soyunun belirlemesinde kontrol mekanizmaları	44-46
3.4. Kök hücrelerin kaderinde bölge spesifitesinin önemi	46-47
3.5. Omurilik ve Beyin Travmasında Nöral Kök Hücreler	47
3.6. Nöral kök hücreleri işaretleme ve tanıma	47-51
3.7. SSS'ne nöral kök hücrelerin transplantasyonu	51-53
3.8. Nöral kök hücrelerle ilgili deneysel ve klinik çalışmalar	53-55
3.9. SSS kaynaklı olmayan kök hücrelerle ilgili klinik çalışmalar	55
3.10. Nöral kök hücrelerin implantasyonunda biyomateryallerin yeri	55-56
4. GEREÇ ve YÖNTEM	57
4.1. Erişkin omurilik kaynaklı nöral stem/progenitor hücrelerin hazırlanması	57-58
4.2. Chitosan tüplerin hazırlanması	59
4.3. Hayvan Grupları	59-60

4.4. Omurilik travması ve transplantasyon	60-64
4.5. İmmünohistokimyasal ve immünofloresan inceleme	64-65
4.6. Davranış Analizi	65
4.7. İstatistiksel Analiz	66
5. SONUÇLAR	66
5.1. Histoloji ve İmmünohistokimya	66-72
5.2. Erişkin omurilik kaynaklı kök hücrelerin yaşam süresi	73-74
5.3. Erişkin omurilik kaynaklı kök hücrelerin fenotiplendirilmesi	74-77
5.4. Fonksiyonel analiz	77-80
6. TARTIŞMA	80-97
7. SONUÇ	97
8. KAYNAKLAR	98-126

KISALTMALAR

MHC: Major histocompatibility complex antigen

NSPCs; Neural kök hücreler

SSS: Santral sinir sistemi

GFP: Yeşil floresan protein

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

NT3: Neurotrophin 3

FGF1: Fibroblast growth factor 1

FGF2: Fibroblast growth factor 2

NGF: : Sinir büyüme faktörü

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

EGF: Epidermal growth factor

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

SVZ: Subventriküler zon

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

PDGF-AA: Platelet kaynaklı büyüme faktörü

O2A: Oligodendrosit tip2 astrosit

IGF1: Insulin benzeri büyüme faktörü

Id: Inhibitor of DNA binding gene

bHLH: Basic helix-loop-helix

LIF: Leukemia inhibitory factor

BMPs: Bone-morphogenetic proteinler

Shh: Sonic Hedgehog

TEN-C: Tenascin C

NCAM: Nöral hücre adezyon molekül

ECM: Ekstrasellüler matriks

NI 35/250: Nörit gelişiminin inhibitörü

MAG: Myelinle eşlik eden glikoprotein

TEN-C: Tenascin-C

CSPG: Kondroitin sulfat proteoglikan

HSPG: Heparan sulfat proteoglikan

KSPG: Keratan sulfat proteoglikan

NMDA: N-Metil-D-Aspartat

NT-4/5: Neurotrofin-4/5

TGF: Transforming growth factor

IGF: Insulin-like growth factor

MAG: Myelin associated glycoprotein

TGF- β : Transforming growth factor

BMP: Bone-morphogenetic proteinler

Shh: Sonic Hedgehog

BrdU: Bromodeoxyuridine

RDA: Rhodamine dextrane amine

CFDA-SE: Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester

PGA: Poly-glycolic acid

PLA: Poly-lactic acid

PLGA: Poly-lactic-coglycolic acid

PLLA: Poly-L-lactic acid

PLGA: Poly-D,L-lacticacid-co-glycolic acid

PCL: Poly- ϵ -caprolactone

PDLLA: Poly-D-L-lactic acid

PEG: Polyethylene glycol

PHEMA: Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)

PHEMA-MMA: Poly(2-hydroxy-ethyl methacrylate-co-methyl methacrylate)

PHPMA: Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]

PAN/PVC: Poly(acrylonitrile-co-vinylchloride)

1. Giriş

Erişkin insan omurilik yaralanmalarında, aksonların devamlılığını bozan herhangi bir hasar ya da patolojik sürecin (santral sinir sisteminde yer alan onarım mekanizmalarının eksikliği nedeniyle) uzun süre devam eden fonksiyonel kayıplara yol açmasının hasta, aile, toplum ve hatta devlet üzerinde fiziki, emosyonel ve ekonomik boyutta harap edici sonuçları vardır. Akut omurilik yaralanmaları ile ilgili yurt dışı istatistikler bizlere 24–40/milyon/yıl insanın bu travmalarla karşı karşıya kaldığını göstermektedir. Bu rakam Kuzey Amerika ülkelerinin istatistiklerine göre yıllık 11.000 kişidir.

Günümüzde gelinen nokta itibarıyla bir takım temel nöro bilim çalışmalarından alınan sonuçlar, travmatik omurilik yaralanması sonrası fizyolojik fonksiyonun yeniden kazanılmasının mümkün olduğunu göstermektedir. Ancak şimdiye kadar insanlarda kullanılan tedavi edici stratejilerin travmatik omurilik yaralanmalarında gelişen hasarı rejenerasyon süreci ile ortadan kaldırması ve sonuç olarak fonksiyonel tam bir iyileşmenin sağlanması mümkün olmamıştır. Sonuç olarak bu yaklaşımların gelişim basamaklarının başında olduğunu da unutmamalıyız.

20. yüzyıl içerisinde omurilik travmasını takiben ortaya çıkan sekonder hasarın yaklaşık 25 farklı mekanizması tanımlandı ve özellikle deneysel olarak farmakolojik tedavide çok önemli gelişmeler sağlandı. Deneysel alanda sağlanan bu başarının insanlar üzerinde uygulamasında bir yetersizlik olduğu günümüze kadar gerçekleştirilen randomize prospektif kontrollü çalışma sayısının toplam 9 olmasından anlaşılmaktadır. Her ne kadar metilprednizolon ve tirotropin salıveren hormonun insanlarda kullanımının sekonder hasarı önlemede etkin olduğu ispat edilse de çalışmaların yöntem ve sonuçlarının yorumlanması bakımından çok fazla sayıda eleştiri aldığı da bir başka gerçektir. Aynı zamanda omurilik yaralanmalarında cerrahi dekompresyon ve füzyonun değerli olup olmadığını gösteren tek randomize prospektif kontrollü çalışmada ise erken ya da geç dönemde gerçekleştirilen cerrahinin fonksiyonel iyileşme üzerinde etkisinin olmadığı gösterildi.

20. yüzyılın başlarında Ramón y Cajal tarafından erişkin omurilik lezyonunda onarımın bir takım şartlar altında olası olduğu belirtildi. 1980’lerde Aguayo ve arkadaşlarının santral sinir sisteminde periferik sinir transplantasyonu ile ilgili öncü çalışmaları ile “santral sinir sisteminde bulunan nöronların uygun ortamda aksonları geliştirme kapasitesine sahip olduğu” kuvvetli bir şekilde desteklendi (1-3). Bu çalışmalarda hasarlı santral sinir sistemi aksonlarının periferik sinir implantı içerisine doğru başarılı bir şekilde uzandıkları ancak

greftten komşu santral sinir sistemine yeniden uzanımı ya da girişi sağlayamadıkları ve aksonal büyümenin durduğu gösterildi. Eş zamanlı olarak moleküler düzeyde ve hücre biyolojisinde var olan gelişmeler erişkin omuriliğinde aksonal yeniden gelişime ve büyümeye engelleyici faktörlerin tanımlanmasına neden oldu. Bu süreçten sonra omurilik yaralanmalarında parçalanmış olan aksonların yeniden gelişiminin sağlanması ve fonksiyonel ve anatomik olarak önemini kaybetmiş olan yolların yeniden yapılandırılması konusunda büyük mücadeleler verildiği ve rejenerasyon yönünde çalışmaların sayısının arttığı gözlemlendi.

Bugün geline nokta itibarıyla rejenerasyon çalışmalarından elde edilen iyi sonuçların insan omurilik yaralanmalarına yönlendirilmesinde ve uygulanmasında istenilen düzeye ulaşılamamıştır. GM1 gangliosid, otolog makrofajlar, periferik sinir greftleri ve implantlar, nörotrofik ve büyüme faktörleri, elektrik stimülasyon, kemik iliği kök hücreleri, periferik kan kök hücreleri, insan fetus omurilik transplantasyonu, olfaktor kılıf glia ve olfaktor bulbus, Schwann hücre transplantasyonu, fetal domuz kök hücresi ile ksenotransplantasyon, PEG uygulaması, Rho antagonist, Anti-Nogo-A inhibitör ve diğer inhibitörler ve insan embriyonik kök hücrelerle insanlar üzerinde rejenerasyon çalışmaları birçok ülkede yapılmakta ya da sürdürülmektedir. Hiçbirinin etkin ya da etkin olmadığı bilimsel olarak ispatlanmamıştır. Omurilik rejenerasyonunu kolaylaştırmak için gerçekleştirilen transplantasyon çalışmalarının büyük kısmı ise kronik ve subakut dönemde gerçekleştirilmiş, kontrol içermeyen, bağımsız denetleyicisi olmayan ve çok büyük oranda literatürde kayıt altına alınmamış ve değişik hücre transplantasyonlarının yer aldığı bilimsel değerlendirmelerden uzak faz I çalışmalarıdır.

Rejenerasyon ile ilgili transplantasyon çalışmalarının odak noktası erişkin santral sinir sisteminin travmaya karşı endojen cevabının yetersiz olmasıdır. Omurilikte santral kanal çevresindeki ependimin beyindeki subependimden farklı olarak doğumdan sonra inaktif durumda olduğu, travmadaki bir takım uyaranların bu hücreleri aktif hale getirdiği ve ancak bu cevabın kısa bir mesafe ve zaman sonra kaybolduğu anlaşıldı. Travma sonrası omurilik santral kanalını döşeyen ependimal hücrelerin çoğaldığı, travma alanı göç ettikleri ve santral sinir sisteminin diğer hücrelerine farklılaştıkları gösterildi. Kök hücre kaynağı olarak kullanılabilineceklerinin anlaşılmasından sonra endojen cevaptaki yetersizliğin buradan elde edilen hücrelerin in vitro ortamda çoğaltılması ve travma alanına değişik şekillerde eksojen transplantasyonu ile aşılabacağı düşünüldü. Bu nedenle vücudun diğer bölgesindeki dokulardan farklı olarak santral sinir sisteminde içerisinde yer alan nöronların kendisini yeniden yapılandırma yeteneğinden yoksun olduğu ve parçalanmış aksonları yeniden geliştirmeyi başaramadığı ifade edildi. Zaman içerisinde omurilik yaralanmalı erişkin hastalarda rejenerasyonda ortaya konulan bu endojen cevaptaki yetersizlik, in vitro olarak kök hücre

kaynaklarından elde edilen dokuların çoğaltılması ve sonrasında hasarlı alana ya da komşu bölgeye değişik doku ve hücre transplantasyonu uygulamaları ile aşılmaya çalışıldı ve bir grup hasta için büyük bir umut kaynağı haline geldi.

Hasarlı SSS'nin rejenerasyonunu teşvik etmede en ilginç ve karmaşık olanaklardan biri olan hücre transplantasyonu hasarlı alanda kaybolan hücrelerin yerini doldurmak ve fonksiyon kaybını gidermek için oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak lezyonun büyüklüğü ile omurilik yaralanmalarının bir kısmında meydana gelen ağır aksonal parçalanma, fonksiyon ve doku kaybı daha da artmakta ve bu kayıpların giderilmesi ve rejenerasyon için geriye kalan doku yeterli olmamaktadır. Bunun için yeterli sayıda aksonun üzerinde gelişip büyüyebileceği ve hasarlı alanı dolduran ve lezyonun her iki tarafını birbirine yaklaştıran bir köprü yapının sağlanması gereklidir. Hasarlı omurilikte sinir köprülerinin oluşturulmasında hücresel/hücresel olmayan greftleri ya da her ikisini bir arada kullanan doku mühendisliği stratejilerinden yararlanılmaktadır. Bu stratejiler içerisinde hücresel greftler en sıklıkla kullanılsa da omuriliğin yetersiz rejenerasyon cevabına ek olarak lezyonun büyüklüğü ve transplante edilen hücresel greftlerin yetersizliği hasarlı bölgeye hücresel olmayan implantlar aracılığıyla hücrelerin ulaştırılması ihtiyacını ortaya koymuştur. Bu yönde omurilik yaralanmalarının rejenerasyonunda omurilik yapısı ile uyumluluk gösteren, omurilik dokusu için toksik ya da zararlı olmayan, rejenerasyon sürecinde bütünlüğünü bozulmadan koruyan, rejenerasyon sonucunda ortamdaki uzaklaşan, mekanik direnci oldukça iyi biyomateryaller hızlı bir şekilde geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Bu çalışmada konu bütünlüğünün sağlanması için ilk bölümde santral sinir sisteminde travma sonrası karşılaşılan moleküler ve hücresel değişiklikler, erişkin santral sinir sisteminin travmaya karşı endojen cevabındaki yetersizlik ve nedenleri ve aksonal rejenerasyonu teşvik eden yaklaşımlar anlatılmaktadır. İkinci bölümde ise günümüzde geline nokta itibarıyla santral sinir sistemi kaynaklı kök hücrelerin rejenerasyondaki rolü ve yeri hakkında bilgiler okuyucuya verilecektir. 3. konu başlığı olan rejenerasyonda biyomühendislik stratejilerinin ve biyomateryallerin yeri ve önemi her 2 bölüm içerisinde ayrıntılı bir şekilde anlatılacaktır.

Bu çalışmanın amacı insanlarda (erişkin) karşılaşılan omurilik travmalarının bir benzeri olan deneysel kontüzyon modelinde kronik süreçte gelişen hasar ya da kavite alanı içerisine erişkin omurilik kaynaklı kök hücrelerin bir biyomateryal (chitosan) aracılığıyla intramedüller olarak implantasyonu ile ortaya çıkan sonuçları literatür eşliğinde değerlendirmektir. Özellikle bu biyomateryallerin erişkin omurilik kaynaklı kök hücrelerin çoğalma, yaşam süresi ve yaşamda kalma, farklılaşma ve göç etme kabiliyeti üzerindeki etkisi ve fonksiyonel sonuçları üzerinde durulacaktır. Ayrıca bu tip hücrelerin bir biyomateryalle birlikte kullanımının hasarlı alanının

proksimal ve distal kısmı arasında bir köprü yapı oluşturma yeteneği ve bu biyomateryallerin omurilik dokusu ile biyouyumluluğu, biyobozulabilirlik ve toksisiteleri araştırılacaktır.

2. Genel Bilgiler

2.1. *Lezyon yerinde ortaya çıkan moleküler ve hücresel değişiklikler*

Travmatik SSS yaralanmaları genel olarak lezyon yerinde oldukça karmaşık ve bir seri patofizyolojik cevaba yol açar (4, 5). Erken dönemde kan damarlarının parçalanması lezyon alanına kanın ekstrasvaze olmasına ve monosit, lenfosit ve inflamatuvar araçlardan oluşan hematojen kaynaklı bir pıhtının lezyon alanına dolmasına yol açar. Damarda daralmanın da eklenmesi üzerine lokal iskemi, hipoksi, ve hipoglisemi gelişir. Daha sonra aşikâr vazojenik ödeme hücrelerin nekrozisi eşlik eder. Lezyon sonrası çok erken dönemde ekstrasellüler sıvı bileşiminde de belirgin bir değişiklik ortaya çıkar. Glutamat ve aspartat gibi eksitatör aminoasitler salınır. Aynı zamanda hücre içerisindeki depo proteinlerden demir salınır ve oksijen radikallerin katalizi sağlanır. Aşırı kalsiyum ve potasyum ortalığa çıkar ve proteazlara ek olarak büyüme faktörleri yara içerisinde toplanır. Tüm bu faktörler hasarlı alanda nöron ve glial hücrelerin ölümüne ve aksonların dejenerasyonuna yol açan bir reaksiyonlar zincirine sebep olur.

Ekstrasellüler ortamdaki bu akut değişikliklerin yanı sıra glial hücrelerin lezyon uyarısıyla istirahatten aktif duruma geçişine normalde santral sinir sisteminde düşük seviyelerde bulunan faktörlerin artması ve yeni moleküllerin ekspresyonu eşlik eder (6). Astrositler özellikle travma sonrası çok aktif hale gelir. Moleküler düzeyde gerçekleşen birincil değişiklikler ise GFAP düzeyinde ve MHC antijenlerin indüksiyonunda artıştır (7, 8). Travma sonrası eksprese edilen astrositik moleküller difüzyon gösteren polipeptid faktörler, membran ilişkili makromoleküller, ekstrasellüler adezyon molekülleri ve membran proteinlerini içermektedir. Bu moleküllerin en belirgin örnekleri laminin ve fibronektin glikoproteinler, farklı tiplerde kollajen, proteoglikanlar, TEN-C ve nörotrofik faktörlerdir. Bunların ekstrasellüler dağılımlarında oldukça geniş bir farklılık gözlenmektedir. Genel olarak aksonal uzama için çekici özellikleri olan laminin ve kollajen tip IV aslında lezyon uyarısı ile gelişen kan damarları çevresinde bazal lamina gibi ve yara içerisinde glia limitansın bir parçası gibi organize olur. TEN-C ve proteoglikanlar ekstrasellüler matrikste ve astrositler içerisinde yaygındır (9-14). Lezyonu takiben astrositler aynı zamanda hücresel membranın bileşimini ve mimarisini yeniden şekillendirir. Hücre-hücre iletişiminin belirleyicileri, nöral hücre adezyon molekülünün salınımı ve düzaçılı (orthogonal) düzen ve gap bileşkelerin sayısı belirgin olarak

artmaktadır (15). Güçlü sekretuar özelliklere sahip astrositler, aktif mikroglia ve monositler/makrofajlar, değişik türde sitokin, proteazlar gibi indirgeyici enzimler ve lokotrienler ve süperoksit gibi küçük biyoaktif moleküller salarlar (16). Travmaya moleküler cevap karmaşıktır ve ECM'nin tam bir yeniden yapılanması ile sonuçlanır. ECM'nin bileşimi travmanın tipine bağlı olarak oldukça fazla dinamiktir ve sürekli olarak değişmektedir. Bu nedenle ECM bileşenlerinin nöronal cevaba nasıl katıldığı veya katılıp katılmadığı değerlendirilmelidir ve lezyona bağlı nöronal dejenerasyon ve rejenerasyon sürecini anlamamıza yardım edecektir.

Travmaya nöronal olmayan hücrelerin cevaplarına baktığımızda ekstrasellüler çevrede akut fazda ortaya çıkan moleküler değişiklikler nöroglial (astrositler ve mikroglia/makrofajlar) ve diğer nöral olmayan hücre tiplerinin hızlı aktivasyonu sonucu ortaya çıkar. Travmatik hasara erken cevabın sonucu olarak her iki glial hücre tipinde belirgin hipertrofi, proliferasyon, migrasyon ve farklı bir morfolojik fenotipe geçiş ve sonuç olarak oldukça yoğun bir ağ ile karakterize reaktif gliosis gelişir (17). SSS lezyonunun bir belirleyicisi olan bu yapı aynı zamanda fibroblastları, endotelyal hücreleri, oligodendrositleri, nötrofil granülositleri, lenfositleri ve değişik ECM proteinleri içeren lezyon skarının da temel bir elemanıdır. Lezyon sonrası gelişen glial cevapların birkaç özelliği farklı lezyon tiplerinde ortaktır ve SSS lezyonunun olduğu alandan bağımsızdır. Örnek olarak glial cevabın çabukluğu, alan içerisinde dağılımı, mikroglia/makrofaj ve daha sonra astrositlerin sırayla aktivasyonu, lezyon çevresi alanda aktif astrositlerin geçici yokluğu gösterilebilir (18, 19).

Dinamik bir süreç olan endojen glial hücrelere ilk yapısal cevaplar lezyon sonrası 5–20 dakika arasında gözlenir ve lezyonun merkezinden çevre nöropile (SSS'nin gri maddesinin bir kısmı) yayılır. Lezyon sonrası 2–3 haftada glial reaksiyonlar pik yapar. Belirgin fenotipik astrositik değişikliklere ilave olarak makrofajlar lezyon sonrası 2 yıla kadar bulunur (12, 20). Böyle uzun dönem için aktif glial hücrelerin bulunması etkilenmiş SSS alanında fizyolojik özellikleri etkileyebilecek metabolik değişikliklerin varlığının göstergesidir.

Gliotik cevabın oluşumundaki benzerliklerin yanı sıra travmanın yeri ve hayvanın yaşına göre moleküler çatı ve bileşimde değişiklikler nedeniyle farklılıklar vardır (21). Yoğun gliosis genellikle beyaz cevher alanlarında görülürken gri cevherdeki gliosis değişken olmaya meyillidir. SSS lezyonuna gliotik cevabın değişik olması ile ilgili bir diğer gözlem ise travmaya yenidoğanın astroglial cevabının olmayışı ya da daha az olmasıdır (22). Aynı gliotik reaksiyon içerisinde bile, reaktif astrositlerin bireysel cevapları (Örneğin; glikoproteinlerin ve proteoglikanların salınımı) hücrenin lezyon merkezine olan pozisyonuna göre de değişmektedir (12, 14, 20, 21).

Beyin endotelyal hücrelerinde göç ve çoğalma ve bazal lamina ile çevrelenmiş sayısız kan kapillerlerinin yara içerisinde toplanması lezyon içerisinde yoğun damar ağından oluşan kan dolaşımının yeniden oluşturulmasına neden olur (12, 20, 23). Bu süreçte ortaya çıkan vasküler onarım, lezyondaki kapiller sayısında artma, astrosit endotelyal hücre birlikteliğinde azalma, perivasküler mesafede genişleme ve belirgin ECM depositlerini içeren kan beyin bariyerinde uzun dönem değişiklikler ile eş zamanlı olarak ortaya çıkar (24).

Travmaya nöronların cevabında ise SSS'de gri cevheri direk olarak etkileyen lezyonlar 3 şekilde nöronal ölüme yol açar. Direk fiziksel travma (birincil hücre ölümü), indirek lokal çevre içerisindeki değişimler (ikincil hücre ölümü) ve hücre gövdesine yakın aksonal lezyon (retrograde hücre ölümü). Her şeye rağmen lezyon beyaz cevheri etkilerse ve hücre gövdesinden belirli bir uzaklıkta oluşursa erişkin nöronların çoğu yaşamda kalır. Aksonlar temelde tam olarak parçalandığı veya basit bir biçimde ezildiği zaman proksimal ve distal segment diye 2 stoplazmik bölüme ayrılır ve travma sonrası ayrılan bu uçlar bir açıklık bırakarak büzülür. Lezyon sonrası 1 ve 8. günler arası aksoplazma, hücre iskeletini oluşturan komponentlerin parçalanması nedeniyle daha granüler ve karanlık görünüm alır. Aksonların büzülmesi, myelin retraksiyonu, vesiküllerde şişme ve dağılma aksonal lezyon sonrası en çok karşılaşılan patolojik özelliklerdir (17, 25, 26). Geriye kalan aksonal ve myelin debris makrofajlar, aktif mikrogliya ve astrositler tarafından fagosit edilir. Ancak SSS içerisinde debrisin uzaklaştırılması PSS'de olduğundan daha yavaştır (27). Distal aksonal uç dereceli olarak kaybolurken proksimal uç büyüme konisinin ortaya çıkmasından dolayı değişik bir morfoloji gösterir. Lezyon sonrası ilk 3 hafta içerisinde erişkin memeli SSS aksonları ilk büyüme cevabını gösterir. Herşeye rağmen filizlenen aksonlar büyümeyi durdurmadan önce sadece 1mm kadar çok kısa mesafelere uzanırlar veya dejenere olurlar ya da lokal olarak lezyon sınırında sonlanırlar (20, 25). Bu durumla ilgili bir takım beklentiler olmasına rağmen erişkin SSS'de çok sayıda filizlenen akson lezyon yerine girmeyi başaramaz. Bununla birlikte son gözlemlerde lezyon alanının kendisinin rejenerasyon yetersizliğinden birincil derecede sorumlu olduğunu göstermektedir.

2. 2. Erişkin memeli SSS neden aksonal rejenerasyon konusunda yetersizdir?

Erişkin memeli SSS'nin rejenerasyon başarızlığı hakkındaki fikirler, 1911'de Tello'nun "dejenere aksone ait büyüme konisi uygun çevre içine yerleştirilirse uzun mesafe aksonal rejenerasyon gerçekleşir" ifadesi ile değişikliğe uğradı (28). Bir asır içerisinde aksonal yeniden büyüme ve gelişim ya da rejenerasyon konusunda pek çok mekanizmanın tanımı

yapıldı. Rejenerasyonu engelleyici olduğu bilinen bir çok intrinsek ve ekstrinsek faktör ve yapının bilinmesi ve onların doğrultusunda strateji ve tedavilerin geliştirilmesi maalesef başarısız rejenerasyon sorununu değiştirmemiştir. Ancak gelinen noktada SSS’de erişkin bir nöronun bir aksonla yeniden bağlantı kurmasının lezyon alanındaki büyüme ile ilişkili genlerin kabiliyetine, nöritlerin büyüme faktörlerini kullanmasına, büyümeyi inhibe eden moleküllerin varlığına ve glial skar oluşumuna bağlı olduğu anlaşılmaktadır.

2.2.1. Rejenerasyonda içsel belirleyiciler

Aksonal yaralanma sonrası nöronlar gen ekspresyonunda değişikliğe giderek aksonal rejenerasyonda yeniden büyüme periyodunu spesifik proteinlerin ekspresyonu ile yani büyüme ilişkili proteinler (GAP-43), immediate early genler ve transkripsiyon faktörleri (c-fos, c-jun ve KROX 24), ve tubulin ve aktinin selektif ekspresyonu ile kontrol etmeye çalışır. Karşılık gelen genlerin kontrol edilmesi aksonal rejenerasyonun uyarılmasında bir temel sağlayabilir. Özellikle yaralanma sonrası arttığı veya rejenerasyon döneminin sonunda azaldığı bilinen 3 proteinin (GAP-43, immediate early gen ailesi c-jun’nun transkripsiyon faktörü ve protooncogene bcl-2) nörit gelişiminde belirgin rol oynadığını düşünülmektedir. Bu genlerin aşırı salınımı en azından erken perinatal peryod esnasında SSS aksonlarının rejenerasyonunu destekler ve nörit gelişiminin intrinsek bir belirleyicisi olarak bir fonksiyon ortaya koyar (29-31). Ancak bcl-2’yi aşırı salan ve sürekli c-jun eksprese eden nöronlar matür SSS’deki aksonal rejenerasyonu gerçekleştiremeyebilir. Rejenerasyon aksonların bir kısmı GAP-43 eksprese etmez. Bu büyümeyle ilişkili genlerin ekspresyonu erişkin SSS’de aksonal rejenerasyon için önkoşul değildir.

2.2.2 Rejenerasyonda dışsal belirleyiciler

SSS’de gelişen lezyonun içinde bulunduğu çevre, 3 temel özelliği ile rejenerasyonun tersi yönde harekete neden olur. Bunlar; aksonal yeniden gelişimin devam ettirilmesinde gerekli olan nörotrofik/nörit gelişimini teşvik eden faktörlerin yokluğu, büyümeyi önleyici bileşenlerin varlığı, akson uzamasının bir fiziksel engelleyicisi olan skar hareketidir.

PSS’in rejenerasyonunda Schwann hücrelerinin nörotrofik ve nörit teşvik edici özellikleri düşünüldüğünde SSS nöronlarının rejenerasyon etmedeki yetersizliğinin nöritojenik/nörit gelişimini teşvik eden moleküllerin eksikliğine bağlı olarak geliştiği düşüncesine neden olabilir (1, 28). Ancak yapılan çalışmalarda SSS lezyon alanında FGF ve CNTF gibi nörotrofik faktörlerde artmanın gösterilmesi ile nörotrofik aktivitenin tam yokluğundan daha ziyade yetersiz olduğu düşüncesi doğdu (32-34).

Bu arada kültür ortamında geliştirilen nöronların en uygun trofik faktör şartlar varlığında bile optik sinir eksplantları içine nöritlerini uzatamamasının nedeni olarak (erişkin memeli SSS nöronlarının rejenerasyon yetersizliği) nörit gelişimini inhibe eden moleküller gösterildi (35). Oldukça büyük sayıda olan bu grubun en belirgin üyeleri NI 35/250, MAG, TEN-C ve CSPG, HSPG ve KSPG gibi birkaç proteoglikandır. Omurilik yaralanması sonrası aksonal elongasyonu engellediği gösterilen myelin protein NI 35/250'in hasar alanında skar dokusunun uzaklaştırıcı bir elemanı olmadığı anlaşıldı (36, 37). Benzer şekilde myelin protein MAG in vitro olarak nörit gelişimini güçlü bir şekilde engellediği ancak in vivo olarak aksonların dejenere myelin boyunca veya myelin lifli traktuslar boyunca uzun mesafeler büyüdüğü gözlemlendi. Daha da ötesi MAG'dan izole farelerin aksonal rejenerasyonu düzelttiği gösterilemedi (38, 39). Böylece akson gelişiminde inhibisyon ile myelin hipotezi arasında belirsizlik erişkin SSS'de rejenerasyon yetersizliği için kesin bir açıklama ortaya koymadı.

Lezyon sonrası asositler tarafından salınan nöronal gelişimi engelleyen TEN-C, nöron bağlama ve göç etme, nöron uzaklaştırma ve nörit büyümesinin kontrolünde çok yönlü bir glikoproteindir (40, 41). TEN-C'nin etkisi diğer ECM moleküllerle etkileşimine olduğu kadar mevcut olan formuna da bağlıdır. PSS rejenerasyonunda etkin olan TEN-C'nin hasarlı SSS'de büyümenin durdurulduğu yerde eksprese edilmemesi nedeniyle büyümenin inhibisyonunda rolü hakkında kesin bir tanımlı yoktur ve akson rejenerasyonunda bu molekülün katkısı detaylarıyla ortaya konulmamıştır.

ECM'nin çok yaygın bileşenleri olan proteoglikanlar SSS'de eksprese edilir (42). Travmayı takiben hasarlı alanın sınırında bulunması ve orada çoğalması, ECM organizasyonunda yer alması ve nörit gelişiminin engellendiği bölgelerde yeniden bir araya gelmesi dışında nörit uzanımında inhibitör etkiler gösterirler (43-47). Ancak nörit gelişiminde bir kısmı yardımcı bir kısmı da inhibitör olan pek çok farklı proteoglikan vardır. Ayrıca proteoglikanların etkisi yoğunluk, ekspresyon zamanı ve dağılımı ve belirli bir çevre ile moleküler etkileşime bağlıdır. Lezyonun tipine bağlı olarak farklı tipte proteoglikanların yeniden ekspresyonu söz konusu olduğu için nörit gelişiminde farklı etkilere yol açabilir.

Erişkin SSS'de hasarlı aksonların yeniden gelişimini engelleyen üçüncü ekstrensek yapı glial skar dokusudur. SSS rejenerasyonunun tanımlandığı tüm örneklerde rejenere sinir lifleri nörogial skar dokusunu atlar ya da geçemez. Skar matriks, aksonal gelişimi devam ettiren yapı, yüzey ve trofik-tropik faktörler bakımından uygunsuzdur ve aksonal rejenerasyonun mekanik bir bariyeri olarak hareket eder (19, 36, 37). Ancak glial skar dokusunun aksonal büyümeyi engellenmesinden sorumlu mekanizmalar bir takım gözlemlerle sorgulanmıştır. Bunlar, yeniden büyüyen aksonların skar içine girererek uzun bir süre için orada kalmaya

devam etmesi, skar dokusunun bileşiminin ve etkisinin hasarın tipine ve etkilenen SSS bölgesine bağlı olması, astrositlerin yaş ve farklılaşma döneminin aksonal büyüme üzerinde destekleyici ya da engelleyici kapasitesi, skar dokusunun merkezinde yer alan astrogliozisin yeniden gelişen aksonların ilerlemelerini engellemiyor olmasıdır (12, 48-50).

SSS'de rejenerasyon lezyon skarı tarafından engellenir. Gliotik skarın fiziki bir bariyer oluşturması dışında skar içindeki hücrelerin moleküler özelliklerinde değişiklikler olması söz konusudur. Bu bölgede yardımcı faktörlerin yokluğu ve bir başka geçirgen olmayan skar komponenti bazal laminanın bulunması hoşgörülü olmayan çevrenin diğer nedenleridir (51). Ancak lezyon sonrası aksonal yeniden gelişim üzerinde bu faktörlerin direk etkisinin ne olduğu bilinmemektedir.

2.3. Hasarlı aksonların iyileşmesi nasıl sağlanabilir?

SSS içerisinde hasarlı alanın tam rejenerasyonu gelişim esnasında normalde katedilen aşamaların bir benzeridir. Bunlar; sağlıklı nöronun hasarlı aksonunun kendiliğinden filizlenmesi, lezyon alanını boyunca bir geçit, doğru yönde aksonal uzama, normal hedefin topografik reinnervasyonu, daha önce var olan elektrofizyolojik özelliklerin yeniden yapılandırılmasıdır.

SSS'de aksonlara olan hasar öncelikle distal kökün tam dejenerasyonu ve proksimal aksonların kısmi dejenerasyonu ve retraksiyonu ile sonuçlanır. Bunu başlangıçtaki rejenerasyon cevabı izler. Proksimaldeki kesik uçlarda hasar alanı doğrultusunda ilerleyen büyüme eğrileri oluşur. Her şeye rağmen hasarlı aksonlardan yayılan bu terminal filizlenmeler geçicidir ve kısa bir süre sonra ortadan kalkar. Asla hasarlı alan içerisine 1mm'den fazla uzanmaz (25, 37). Bu filizlenmeler daha sonra büzülür ve genellikle kesilmiş olan aksonun proksimal kökü tekrardan ölür. Bu 'dying-back' fenomeninin istisnaları ısrarcı kortikospinal aksonların ve transekte olmuş postcommisural forniksin aksonlarının terminal filizlenmeleridir (20). Sonuncu olanlar lezyondan 2 yıl sonrasına kadar lezyon yerinde bulunmaya devam eder. Ayrıca spontan terminal filizlenmenin sağlam aksondan kaynaklanan filizlenmeden ayırt edilmesi gereklidir. Her iki tip filizlenme SSS'de hasar sonrası birbirine paralel olarak uzanabilir ancak travma sonrası gözlenen çoğu filizlenme hasarsız aksondan denerve olmuş SSS bölgesine uzanan afferent projeksiyonların kollateral filizlenmeleridir (52). İlginç olarak kollateral ve terminal filizlenme sadece küçük veya myelin içermeyen bölgelerde yer alır (46, 53). Hasarlı aksonların kendiliğinden terminal filizlenmesi matür SSS nöronlarının rejenere olma potansiyeli ve başlangıçtaki rolünü ortaya koyar. Ancak akson filizleri kısa bir mesafe sonra uzamasını durdurur. Aksonal uzamayı durdurmada kalıtsal bir

anahtarın etkin olduğu düşünölse de şu ana kadar kabul edilen gerçek büyüme konisinin hemen çevresindeki ekstrensek büyümei inhibe eden faktörlerin etkinliğidir. Böylece aksonal filizlenme ve aksonal uzamanın farklı şekillerde kontrol edildiğinin en güzel örneği parçalanmış kortikospinal akson filizlenmesi nörotrofik faktörler tarafından kontrol edilirken aksonal uzama hasar sonucu ortaya çıkan ekstrensek belirleyiciler tarafından kontrol edilir (54).

Yeniden büyüyen aksonların bir diğer büyük sıkıntısı lezyon yerindeki skar dokusudur. Aksonal rejenerasyonda uyarılan lifler lezyonun merkezinden daha ziyade lezyonun çevresindedir. Bu yüksek olasılıkla aksonların yanlış yola yönelmelerinin ve normal hedefi innerve etmede başarısızlığın bir açıklamasıdır. Aynı zamanda çevresel projeksiyonlarla bu aksonların istenilmeyen etkileşiminin de başarısızlıkta rolü vardır. Bu nedenlerle başarılı aksonal rejenerasyonun en önemli bileşenlerinden birisi de daha önceki lezyon yeri boyunca devam eden bir yolun sağlanmasıdır.

Aksonlar skar engelini üstesinden gelir gelmez daha önceki hedeflerine ve doğru hedef nöronlarına ulaşmak için doğru yolu seçme problemi ile karşı karşıya kalırlar. Çalışmalarda bu problemin çözümünde normal sinir sistemi gelişimi göz önüne alındığında bu gelişimin çevredeki substratların moleküler bileşimine bağlı olduğu gösterildi. Büyüme konileri kısa (hareketsiz) ve uzun (yayılabilir) vadeli sinyalleri olan destekleyici veya itici değişik rehber moleküllerle karşılaşırlar (55). İlginç olarak hareketsiz moleküllerin bir kısmı yeniden salınır veya yapısal olarak hasarlı yollar boyunca mevcuttur. Bu hasarlı yollar boyunca rehber moleküller TEN-C ve proteoglikanlar kolaylıkla salınır ve myelin gelişiminin inhibitörleri lezyon alanının sınırlarındaki hasarsız myelinli nöropilde bulunmada ısrarı ile nöronların geniş bir mesafeden uzanan uzantılarının gelişimini yönlendirir ve bu teşvikte ECM molekül lamininin belirli bir rolü vardır (56). Alternatif olarak büyüme konilerinin iyonlar ve transmitterlerin diffüze olabilen büyüme faktörleri tarafından yönlendirildiği kabul edilir ve çok olasıdır ki denerve olan hedeften salınan bu faktörler yeniden büyüyen aksonları uygun lokalizasyonlara çekebilir (57, 58). Son olarak hipokampal formasyonda NGF'in sınırlı dağılımı hangi bölgelerin filizlenen aksonlar tarafından yeniden innerve edildiğini gösterdi (59). Çok benzer şekilde omurilik içerisinde NGF duyu liflerinin girişine engel olan beyaz cevherin izin vermesini sağlar (60). Böylece NGF'in tropik olduğu ve uygun akson rehberliği ile yönsel hedef bağımlı bilgiyi sağladığı söylenebilir. ECM molekülleri ve NGF hasarlı yol boyunca rehber aksonlarla birlikte hareket edebilmekte ve bunların her biri farklı bir akson popölasyonu için rehberlik yapmaktadır.

Hedef içerisinde stop sinyaller veya docking sinyaller gelen aksonları uygun hedef nöronlara yönlendirmek için gereklidir. Böyle bir docking mekanizmanın iyi çalışılmış örneği retinotektal projeksiyondur. Temporal retinanın liflerine yönelik olarak anteroposterior tektal eksenini spesifik eden moleküller erişkin süperior kollikülüste denervasyon durumunda yeniden eksprese edilir. Bu moleküller ELF-1 (ephrin-2) ve RAGS (ephrin A-5, Al-1) Eph-ilişkili reseptör tirozin kinazların ligandlarıdır ve sırasıyla temporal veya temporal-nasal retinal aksonlar için uzaklaştırıcıdır (61). ELF-1 konsantrasyon gradienti büyüme konisinin çapını %5 veya daha fazla geçerse ganglion hücre aksonlarının uzaması durur (62). Nörotransmitterler ve NMDA reseptörleri akson gelişiminin durdurucu sinyallerini ihtiva eden diğer sınıf moleküllerdir ve bu suretle hedef hücre seçimine katılabilirler (63).

Son aşamada, yeniden büyüyen aksonlar hedef nöronlarla sinaptik teması ve ileti hızı ve alsiyon potansiyeli amplitüdü gibi normal fonksiyonel özellikleri yeniden kazanmalıdır. Ancak aksonun çapı ve yönü ve myelin kılıfının varlığı da önemli parametrelerdir.

Moleküler ve hücrel reaksiyonlarla ilgili arka arkaya işleyen bu süreç hasarlı SSS projeksiyonlarının fonksiyon ve yapısını yeniden onarmak için gereklidir.

2.4. Aksonal rejenerasyonu teşvik eden deneysel yaklaşımlar

Moleküler ve biyokimyasal tekniklerde hızlı ilerleme ve nörodejenerasyon ve rejenerasyonun altında yatan mekanizmaların bilinmesi hasarlı nöronların yeniden büyüme cevabını artırmaya çalışan birkaç girişimi teşvik etti. Bunlar;

1. İntrensek nöronal kapasitenin artırılması:

A. Aksonal rejenerasyonu teşvik eden genlerin salınımı,

B. Hasarlı nöronun akson ve perikaryası komşuluğunda nörotrofik faktörlerin verilmesi ile intrinsik nöronal kapasitenin aktivasyonu ile sağlanır.

2. Hoşgörülü olmayan hasar alanı ve çevresinin değiştirilmesi: Hücrel olmayan rehber protezler, fetal nöral doku, glial hücreler kullanılarak sağlanır.

3. Büyümeyi inhibe eden moleküllerin etkinliğinin kaldırılması

4. Lezyon skarının geçirgenliği

5. Lezyon yerini geçen elektriksel alan uygulamasıdır.

2.4.1. Nörit gelişimi ile ilişkili proteinlerin aşırı salınımı

SSS nöronlarının büyüme özelliklerini en iyi şekilde ortaya koyan GAP-43, Bcl-2 ve c-Jun'dur. Ancak birkaç nöron popülasyonu yüksek seviyelerde bu genleri eksprese etmeye

devam eder ve yüksek derecede plastisite sağlarlar. Transjenik fare ile yapılan çalışmalar akson rejenerasyonunda böyle genlerin temel rolü hakkında bilgimizi artırmaktadır (64, 65). Etkilenmiş olan nöronlarda bu genlerin salınımının artırılması aksonal rejenerasyonun teşvikinde faydalı bir yaklaşım olabilir. Bu anlamda etkin tedavi, gen transfer metodlarının kullanımını ile sağlanabilir. SSS'de büyüme ile eşlik eden proteinlerin salınımını kolaylaştırmaya yönelmiş gen tedavisi travmaya bağlı hasarların tedavisi için yeni bir strateji oluşturmaktadır.

2.4.2. Nörotrofik maddelerin verilmesi

Nöronların yaşamda kalma, büyüme, çoğalma, göç etme ve farklılaşmasını destekleme ve gelişim esnasında ve sinaptik plastisitenin kontrolünde önemli olan nörotrofik faktörler SSS'de sınırlı miktarlarda bulunurlar. NTF'ler gen transkripsiyonu ve protein sentezini uyaran hücresel değişiklikleri saatler ve günler içerisinde sinyal yollar aracılığıyla teşvik eder. İlk tanımlanan NGF sıklıkla tüm NTF'lerin bir ilk örneği olarak kabul edilir. NTF listesinde BDNF, NT-3, NT-4/5 dışında farklı protein ailesinden olan FGF, PDGF, TGF ve IGF yer alır (66). NTF'ler hedef kaynaklı moleküller olsa da otokrin ve hedefsel olmayan özellikleri de tanımlanmıştır. Bunlar astrositler, oligodendrositler ve nöronlar tarafından sentez edilir ve hem nöronlar hem glial hücreler üzerine etkilidir (67). İlginç olarak nöronların bireysel anlamda bir kısmı değişik NTFlere cevap verebilirken tersine tek bir faktör birkaç farklı nöronal popülasyonu etkileyebilir. Nörotrofik faktörlerin gelişim esnasında nöronal yaşamda kalma ve farklılaşmada rolleri dışında erişkinde omurilik yaralanması sonrası onarım ve iyileşmeyi teşvik edici rolleri vardır (379). Lezyon içerisine NT-3, NT-4/5 veya BDNF gibi nörotrofik faktörlerin verilmesi nöronal hasarı sınırlar ve omurilik yaralanması sonrası rejenerasyonu teşvik eder (190, 294, 295). Rat omurilik transeksiyonunda FGF-1, NT-3 veya BDNF ile kültüre Schwann hücreler veya otolog periferik sinirlerin kombine edilmesi parçalanmış olan aksonların anatomik bağlantısının yeniden oluşması ve sonuçta fonksiyonel iyileşmeye yol açtı (70). Tüplerin iç lümeninde ekili olan kültüre Schwann hücreler ve NT-3, BDNF ve GDNF gibi nörotrofik faktörler ile kombine tubuler PAN/PVC kanallar, rat omurilik yaralanmasında umut verici sonuçlar ortaya koydu (357, 359, 361). Ancak diğer nörotrofinlerin yerine FGF-2 kullanan benzer stratejiler aksonal yeniden gelişimi teşvik etmedi ama rat omurilik transeksiyon yerine komşu omuriliğe nöronal yaşamda kalmaya katkısı oldu (380).

Nöronların yaşamda kalmaları üzerinde belirgin etkilerinin yanı sıra in vitro çalışmalarda aksonun yeniden büyüme ve gelişimi ve dallanmalarının uyarılmasında NTF'lerin önemli

rollerinin olduğu gösterilmiştir (68). Nörit gelişimi üzerinde belirgin etkilerle birlikte trofik faktörlerin yokluğunun rejenerasyon başarısızlığına yol açıp açmadığı ve NTF'lerin lezyon oluşumu sonrası verilmesinin akson büyüme ve gelişimini sağlayıp sağlamadığı sorusunu mantıklı bir şekilde ortaya koymaktadır. NT-3 kortikospinal projeksiyonların filizlenmesini uyarmaktadır. BDNF ve NT-3 infüzyonu propriospinal ve beyin sapı aksonlarının aksonal rejenerasyonunu kolaylaştırır ve motor ve beyin sapı aksonları kadar duyu aksonlarında da hasarlı omurilikte NGF'in etkisi söz konusudur (54, 69, 70).

Sistemik olarak dolaşan proteinlerin SSS'ne girişini engelleyen kan beyin bariyerinin varlığı ve yüksek konsantrasyonda bu maddelere olan ihtiyaç onların invaziv tekniklerle verilmesini gerektirmektedir. Deneylerde NTF'ler osmotik mini pompa veya kanüller acılığıyla intraventriküler olarak verilir. CSF ve beyin parankimi içerisinde nörotrofik maddelerin kinetikleri bilinmemesine ve bir kısmının kısa biyolojik yaşam süresine rağmen akson rejenerasyonunda belirgin etkileri ortaya koyduğu gösterilmiştir. Yine de NTF'ler nadiren tek nöronal hedef popülasyonu etkilediği için intraventriküler NTF uygulaması multiple hedef olmayan hücreler üzerinde yan etkilere sebep olabilir (69). Bu yan etkilerin varlığı klinik kullanımı sınırlamaktadır. Aksonal rejenerasyonu teşvik etmek için kullanılan NTF'lerin kullanımında bir diğer engel sınırlı doku penetrasyonudur (71). Böylece NTF'in lezyon yerine direk kullanımı ve birkaç hafta yüksek nörotrofin seviyelerinin devam etmesinin gerekli olduğu ve tekrarlı enjeksiyonlar ve rezervuarlı pompanın yeniden doldurulmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. İdealde SSS'ne nörotrofin uygulanmasının bir cevabın ortaya konması açısından hedefe özel, bölgesel olarak kısıtlı, yeterli konsantrasyonda ve çok iyi tolere edilir olması gerekmektedir.

NTF infüzyonunun alternatifleri, biyolojik olarak parçalanabilen polimer matriks içerisine gömülmüş aktif protein ihtiva eden yavaş salınımlı intraserebral implantlar ve tanımlanan NTF'i sekrete eden genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerdir (72, 73). Gen transferi için en sıklıkla kullanılan teknik ex vivo yaklaşımdır. Genetik olarak değiştirilmiş hücreler SSS içerisine transplante edilir. Birçok çalışmada NTF'lerin in vitro gen transferi için fibroblastlar ve viral vektörler kullanılmıştır (74). Bu yaklaşımın kullanımından kaynaklanan en büyük sıkıntı değişik derecelerde tümör oluşumuna yol açan implantasyon sonrası sürekli fibroblast gelişimidir (75). Polimer enkapsülasyonu tümör oluşumu ile ilgili mevcut riski engellediği ve genetik olarak modifiye hücreleri immün harabiyetten koruduğu için bu problemin üstesinden gelebilir. Genetik olarak modifiye rat astrositlerinin transplantasyon sonrası iyi bir şekilde yaşadığı ve tanımlanan proteini eksprese ettiği gösterildi. İnsan astrositleri NGF geni barındıran bir retrovirüs ile etkili bir şekilde infekte edilirken rat Schwann hücreleri

omurilikte aksonal rejenerasyonu artıran BDNF'i sekrete etmesi için genetik olarak modifiye edildi. Astrositler SSS'nin doğal konukları oldukları ve in vitro genişletilebildikleri için sonuncu hücre tipi gen taşıyıcı olarak kullanışlı olabilir (76-78).

Hasarlı SSS alanlarında NTF eksprese etmek için bir diğer strateji in vivo viral vektör aracılıklı gen transferidir. Herpes virüs, adenovirüs, adenoassociated virüs ve human immundeficiency virüsden kaynaklanan vektörleri içeren sayısız vektörün gen transferinde etkili olduğu gösterilmiştir. Nörotrofin genlerini taşıyan viral vektörler hasarlı SSS içerisinde nörotrofik molekülleri lokal olarak eksprese etmek için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (79, 80). Herşeye rağmen enjekte edilen virüslerin mevcut viral kuşakların sitotoksitesini gösteren immün yanıtlar ortaya koydukları gösterilmiştir.

Nörotrofik hareketleri etkilemede uygun olabilecek bir diğer yaklaşım endojen büyüme faktörlerinin sentez, salınım ve aktivitesinin uyarılmasıdır. Hormonların, kortikosteroidlerin, troid hormonun ve retinoik asidin NTF sentezindeki rolü NTF ekspresyonun farmakolojik yönlendirilmesini ortaya koymaktadır (81).

2.4.3. Greftleme ve köprü yaklaşımlar

Omurilik yaralanmalarının onarımı ile uğraşan araştırma merkezleri ve çalışma gruplarının en temel amacı omurilikte parçalanmış olan aksonlar arasındaki bağlantıyı sağlamak ve aksonal yeniden gelişimi ve büyümeyi başarmaktır. Bilindiği gibi bu araştırmaların büyük çoğunluğu akson rejenerasyonda etkili olduğu bilinen hasarlı omuriliğin içinde bulunduğu çevreye yönelmiştir. Bu çevrenin akson rejenerasyonunda olumlu şartlar sunmasına rağmen yetersiz olduğu bir gerçektir. Aksonların yeniden gelişimini engelleyici bir takım bariyer ve faktörlerin etkisini, hasar alanını geçen ve hedeflerine ulaşan aksonlar sağlamak adına engellemek ya da sınırlamak gerekmektedir.

Doku mühendisliği teknolojileri insan omuriliğinin onarımı ile ilgili bir strateji geliştirmek için bir takım moleküllerin nasıl kontrol edildiğini anlamamızı sağlamaktadır (381). İnsanlarda karşılaştığımız omurilik yaralanmalarının yaklaşık 1/3'ü komplet transeksiyon iken kalan kısım daha sıklıkla beyaz cevherin korunduğu inkomplet yaralanmalardır (382). Bu yaralanmalarda meydana gelen ağır aksonal parçalanma ve gelişen skar dokusu ile birlikte lezyon alanını geçen devamlılık halinde bir doku kalmakta ve bir miktar rejenerasyon göstermektedir. Ancak lezyonun büyüklüğü arttıkça kaybedilen fonksiyonlar artmakta ve geri kalan doku rejenerasyon için yeterli olmamaktadır. Bunun için yeterli sayıda aksonun üzerinde gelişip büyüyebileceği ve hasarlı alanı dolduran ve lezyonun her iki tarafını birbirine yaklaştıran bir köprü ya da yapının sağlanması gereklidir.

Hasarlı omurilikte sinir köprüleri yaratan doku mühendisliği stratejileri ya hücrenel veya hücrenel olmayan köprüler ya da her ikisinin birleşimini kullanmaktadır. Bu stratejiler içerisinde en sıklıkla kullanılan bir köprü oluşturmak için yara alanına hücrelerin implantlar aracılığıyla transplante edilmesidir (383). Başlangıçta çalışmaların büyük çoğunluğu hasarlı SSS içerisinde köprü greft olarak Schwann hücreler, olfaktor ensheating hücreler, genetik olarak yönlendirilmiş fibroblastlar veya periferik sinirlerin transplantasyonu şeklindeydi (288, 384). Hücrenel transplantasyon ile aksonal rejenerasyonun uygun bir çevrede gelişebileceği bir takım çalışmalar ile gösterildi (227, 385). Daha sonraki çalışmalarda ise hücreden bağımsız ya da değişik şekillerde hücreleri barındıran biyoyumlu materyaller kullanıldı (386-389).

Omuriliğin onarımı için hücre ihtiva eden transplantların kullanımının bir takım cazip gelen tarafları vardır. Örneğin, kültür ortamında bir biyopsi materyalinden elde edilen Schwann hücresi büyük miktarlarda çoğaltılabilmektedir. Bir çalışmada 1cm'lik biyopsiden 30m'lik alanı dolduracak kadar Schwann hücre çoğaltılabileceği ifade edilmiştir (383). Ancak bu tür greftlerin saflaştırma ve çoğaltma işlemleri belirli bir zamana gereksinim duyduğu için akut yaralanmalarda kullanımı çok söz konusu değildir. Aynı zamanda bir diğer insan ya da hayvandan elde edildikleri için alıcıda immün reaksiyona yol açması olasıdır (390). Bu nedenle akson rejenerasyonunu teşvik ve inflamatuvar ve glial reaksiyonları kontrol etmek için gerekli moleküler özelliklere sahip hücre barındırmayan biyomateryallerin geliştirilmesi hasar alanındaki endojen hücre varlığının kontrolü ve kullanılması açısından oldukça önemlidir. Zaman içerisinde elde edilecek olan biyoyumlu materyaller ile sağlanacak köprü greftler aksonal büyümeyi olumlu yönde teşvik edecektir.

Köprü Greftler

Omurilikte hasarlı alanı geçen aksonları taşıyabilecek süspansiyon köprüleri inşa etmek için 3 farklı bölgeye dikkat çekilmektedir (391).

1. "on-ramp" adı verilen yeniden gelişen ve büyüyen aksonlarla gerçek köprü arasındaki yüzey
2. "the bridge" adı verilen yeniden gelişen ve büyüyen aksonların lezyon alanını geçmesi için gerekli yol (köprü)
3. "off-ramp" adı verilen yeniden büyüyen aksonları köprüden sürükleyecek ve tekrar hasarsız omurilik dokusuna girmesini sağlayacak ve aksonları nihai hedeflerine ulaştıracak kısım

Bu alanların her biri parçalanmış aksonların başarılı bir şekilde yeniden bağlantısını oluşturmak için aksonal popülasyona ve bölgeye uygun gereksinimlere sahiptir. Özellikle

hücresele greftlerle ilgili sonuçlar hasarlı SSS aksonlarının daha uygun bir çevreye girmek için “on ramp” üzerinde seyahat edebildiklerini ve buraya girdiklerinde daha uzun mesafelere uzanabildiklerini göstermektedir. Özellikle Schwann hücre greftlerde aksonlar “off-ramp”’a geçmeyi başaramamakta ve greftten dışarı çıkamamaktadır (384). Aynı şekilde hasarlı duyu nöronları dorsal kök giriş zonunda durdurulmaktadır (392). Başarıyı sağlamak için “on-ramp” ve “off-ramp”i aksonların geçmesini sağlayacak ya da kolaylaştıracak biyomateryaller yaratılmasıdır. Ancak daha sıklıkla da “off-ramp” in inhibitör özelliklerinin engellenmesinin gerekliliği üzerinde durulmalıdır. Lezyonlar inen motor ve çıkan duyu traktlarının parçalanmasına sebep olur ve bu her bir nöronun kendisine özel olan gereksinimleri nedeniyle bu tür köprü oluşturma çalışmalarında kullanılacak olan greftin her bir nöronun kendisine has olan gereksinimlerini bir araya getirecek birkaç farklı köprüden oluşmasını gerektirmektedir.

Köprü içerisinde akson gelişiminin teşvik edilmesinde rol oynayan faktörler hücrenin adezyonu, büyüme konisine sinyal gönderilmesi ve gen ekspresyonudur. Bilindiği gibi in vitro ya da in vivo olarak akson gelişimi, ilgili alanın karşılıklı yüzeylerinde, hem büyüme konisinin adezyon gücünün sağlanmasına hem de büyüme makinesine gerekli sinyallerin iletilmesini sağlayan moleküllerin ortaya çıkmasına bağlıdır. Akson gelişimine genellikle aksonları çeken büyüme konisi ile yaratılan bir güç eşlik etmektedir. Bu adezyon gücü nörit gelişimini adezyon molekülünün yoğunluğu ve çekim gücüne bağlı olarak değiştirmektedir (393). Bu güç çok yüksek ya da çok düşük ise akson gelişiminin engelleneceği bilinmektedir (394). Böylece bir köprü akson geliştirebilecek bir yüzeyi sağlamalı ya da gelişime engel olacak derecelerde olan adezyon güçlerine karşı koymalıdır. Normalde bu sinyaller matriks ve hücre yüzey molekülleri tarafından sağlanır. Matriks ve hücre yüzey molekülleri üzerindeki aksonal gelişim ise hem adezyon hem de transmembran sinyaller ile kontrol edilir. Matriks molekülün adezifliği ile onun akson gelişimini teşvik etme yeteneği arasında kötü bir korelasyon vardır. Bu da yeterli adezyon sağlanırsa sinyalin gelişimini sağlamak için yeterli olabileceğini ortaya koymaktadır (394).

Köprü yüzey adezyon moleküllerinin en temel görevi büyüme konisi içerisinde sinyalleme yolunun aktivasyonu ile aksonal yeniden gelişimi teşvik etmektir. Adezyon moleküllerinin aracılık ettiği matriks moleküller ve hücre yüzey sinyallerinin her ikisi tarafından integrin reseptörlerin aktivasyonu birkaç farklı sinyal yolu aracılığıyla aksonal gelişimi belirgin teşvik edici etkiye sahiptir (395-399). Normalde hücre adezyon ve ekstrasellüler matriks moleküller tarafından aktive edilen sinyalleme yollarının aktivasyonuna yol açan moleküller köprüye dahil olmalıdır. Bu fonksiyonlar matriks molekülü yaratan peptid çatı veya karbohidratlara

yönlendirilebilir. Matriks moleküllerin kendisi çok büyüktür ve özellikle onları inşa etmek kolay değildir. Peptid ve karbohidratların kendilerinin sinyal molekülün hareketine benzedikleri gösterilmiştir (400, 401). Bu peptid ve karbohidrat moleküller tam uzunlukta olan diğer moleküllerden daha kolaylıkla yapay köprü içerisine iştirak ettikleri için mühendislik ile elde edilen köprüler için fazlasıyla önemlidir. Maksimum gelişimi temin etmek için peptid ve karbohidrat kombinasyonu üzerinde durulmaktadır (391). Embriyonik aksonlar optimal olarak aksonlarının gelişmesine izin vermek için kendi çevrelerindeki matriks moleküllerin konsantrasyonuna cevap olarak matriks reseptörlerin seviyesini değiştirebilir. Her şeye rağmen erişkin aksonlar bunu daha az yapabilme yeteneğindedir. Böylece kendi çevrelerindeki ligandların konsantrasyonları oldukça kritik düzeyde olabilir (402-404). Selektif hücre adezyonu mühendisliği köprü materyaller için büyük bir gelecek olacaktır. Örneğin gelişimi kolaylaştırmak için aksonların ve diğer hücrelerin bağlanmasını sağlamak gereklidir ve aynı zamanda nöronal gelişimin inhibitörü olan oligodendrosit progenitor hücre ve meningeal hücre gibi hücreleri uzaklaştırmak arzu edilen bir durumdur (405-408). Birkaç molekül bu özelliğe sahiptir. İntegrinlerin selektif ekspresyonu ve belirli matriks moleküllerle etkileşimleri nöronal migrasyon ve aksonal gelişimi içeren doku morfogenezinde önemli rol oynar (395, 409, 410). Gerçekte nöron popülasyonu spesifik integrinler salar ancak bunların bir kısmı gelişim ve migrasyon için inhibitör özellikler sunmasına rağmen integrin ekspresyonu hasarlı nöronlarda artar ve selektivite ortaya koyar (411-413). Belirli integrinler belirli matriks proteinler içindeki motifleri tanır ve böylece migrasyon ve hücre adezyonu teşvik edilir (414, 415). Bir kısım motifler ise birkaç farklı integrin tarafından tanınır ve bunların selektivite ortaya koymalarından bahsedilemez. Buna zıt olarak matriks moleküllerin birkaç motifi daha sınırlı bir bağlanma oranına sahiptir ve böylece selektivitelerinden bahsedilebilir. Kortikospinal nöronlar gibi hedef nöron popülasyonları tarafından spesifik reseptör ve integrinlerin ekspresyonunun tanımlanması köprü materyal içerisine uygun ligandların katılmasına yol açacaktır. Aynı zamanda köprü yüzey üzerinde spesifik karbohidrat tanınma motiflerinin olması selektivite açısından arzu edilmektedir. Benzer teknikler köprü içerisinde büyümeyi teşvik ve trofik motifleri geliştirmek için mühendislikte kullanılmaktadır.

Hem nöritin gelişim kapasitesi hem de adezyon moleküllerine nöronal cevap intrasellüler sinyal yolunu biçimlendiren büyüme faktörleri tarafından değiştirilebilir. Büyüme faktörlerinin pasif difüzyon veya sellüler ihtiyaca cevap olarak polimerlerden kontrollü salınımı (416-418) sinyal yollarını değiştirmek ve rejenerasyonu uyarmak için bir strateji olabilir. Diğer yandan growth faktörlerin sayısı fazla iken aksonal gelişimi kontrol etmek için

bir araya gelen sinyal yollarının sayısı oldukça az olabilir. Bu yolların bir kısmı çok iyi bilinmektedir. Örneğin intrasellüler kalsiyum seviyesinde lokalize artışlar büyüme konisinin davranışı (özellikle dönme ve uzanma hareketi) üzerinde belirgin etkiye sahiptir ve hem voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının araya girmesi hem de internal depolardan salınım yol gösterici işaretlere cevap olarak aksonal yol göstericiliği ve gelişimi değiştirebilir.

Optimal akson gelişimi sadece uygun genlerin ekspresyonu ile birlikte olur. Travmayı takiben nöronal gen ekspresyonunda bir takım normal değişiklikler aksonal gelişim için faydalıdır (419, 420). Bir kısım nöronlar akson elongasyonu ile ilgili moleküller yaratmak için aksotomiye takiben gen ekspresyonunu değiştirirler (421). Bunlar GAP-43, L1, integrinler ve cytoskeletal proteinler gibi bazı adezyon moleküllerini ihtiva ederler. Her şeye rağmen purkinje hücreleri gibi diğer nöronlar büyüme ile ilişkili genleri çoğaltmayı sağlayamaz ve bunun gibi nöronlar ilave uyarılara ihtiyaç duyarlar (422). Ekspresyonda bu değişikliklerin bir kısmı transkripsiyon sonrası iken diğer kısmı transkripsiyondaki değişikliklere bağımlı olabilir. Birkaç tip nöron içerisinde artan rejeneratif kapasiteyi ve büyümeyi eşlik eden proteinleri çoğaltmanın yolu uygun trofik faktörlerin uygulanmasıdır (423, 424). Bunlar genellikle çözünebilir moleküller gibi uygulanırken nörotrofinler, FGF2 ve bir takım kemokinler gibi bir kısmı matriksin bir parçası olarak ortaya çıkabilir ve bu nedenle köprü oluşturulmasında düşünülebilir.

Eğer aksonlar rastgele olarak ortamda dolaşıyorlarsa akson rejenerasyonun uyarılmasında küçük bir nokta vardır. Aksonlar kemotaktik ve haptotaktik mekanizmaların rehberliğindedir. Rejenere aksonlara yol göstermenin en pratik yolu SSS gelişimi veya periferik sinirlerin rejenerasyonu esnasında meydana gelen bir seri olayı kopyalamaktır. Periferik sinir aksonları ekstrasellüler bir matriks kılıf ile çevrili Schwann hücrelerinin uzun bir silindiri olan Büngner bandı olarak bilinen bir yapı boyunca rejenere olur. Her bir band bir myeline aksonun dejenerasyonu ile geride kalır ve kendi yolu üzerinde tekrar ortaya çıkar. Aksonal büyüme konileri basal lamina içerisinde Schwann hücrelerle temasta bir yüzeyde ve basal lamina tüpün iç yüzü ile temasta bir yüzeyde rejenere olur. Büngner bandı ile bu durum oluşur oluşmaz çok nadir bu olay bir diğerine geçer. Benzer yapay çatı büyümeyi teşvik eden moleküllerle kaplı benzer veya hafif büyük hacimli bir tüp veya lif olacaktır. Yapay maddeler üzerindeki akson gelişimi yol daraldığı zaman en doğru olacaktır ve bu çok sayıda küçük paralel lifler veya tüplerden oluşan bir köprünün yönlendirilmiş gelişimi kolaylaştıracağı fikrini destekler.

Köprü materyali aksonal destek ve gelişim için fiziki bir substrat sağlamalı ancak uzun süreli irritan ya da yabancı cisim olmamalıdır. Köprü materyali veya degradasyon ürünleri toksik

olmamalı veya immün sistem için bir uyarıcı oluşturmamalıdır. Köprü, büyüme ve yol göstermeyi teşvik eden moleküllerin büyüme konusunda var olabilmesi için modifikasyona uygun durumda olmalıdır. Sonuç olarak akson ve büyüme konisinin (olası astrositler) bağıllığına izin veren ve aktif olarak inhibitör hücre tiplerini uzaklaştıran yüzey selektivitesine sahip olması gereklidir. Böylece hidrofobik yüzeyler meningeal bağlantıyı engeller ama hidrofobisite sadece birkaç memeli hücresinin bir özelliğidir. Polimer implantlar glial skar oluşumu artırır ve sonunda yabancı cisim olarak tedavi edilebilir. Böylece kalıcı implantların uzun dönem sonuçlarını tahmin etmek güçtür. Bu nedenle optimal substrat sinir rejenerasyonu dönemine uygun çözölme zamanı ile biyouyumlu materyallerden ibaret olmalıdır (425-428).

Doku mühendisliğinin biyoindirgenabilir polimerik materyalleri ya peptid ya da non-peptid bileşenlerden yapılmıştır. Yapay polimerler hücre bağıllığını ve yönlendirilmiş nörit gelişimini kolaylaştırır ve kolaylıkla liflere dönüştürülebilirler (429-431). Bu polimerlerin degradasyon ürünleri inflamatuvar reaksiyona sebebiyet verebilirken bir kısmı bulunduğu süreç içerisinde immünolojik olarak cevapsızdır. Natif polimerlere aksonların bağıllığı oldukça düşüktür ancak laminin gibi matriks moleküllerle kaplamak suretiyle hücresel bağlantı artırılır (430). Daha da ötesi bu polimerler hücre yüzey reseptörleri ile etkileşen matriks moleküllerin parçalarını veya ilaçları çatlak yerlerine bırakmak için üretilmiş olan peptitlerin bağlantısına izin vermek için türetilirler. Polisakkaritlerde doku mühendisliğinde kullanılmaktadır. Hyaluronik asit sinir rejenerasyonunu kolaylaştırabilir (432). Suda çözölünür ve doku bağıllığı gibi özelliklere sahip polimerler geliştirilmeye çalışılmaktadır (433). Kollajen lifler ve tüpler aksonların yönlendirilmiş büyümesini destekler ve diğer matriks moleküllerle kombine edilen kollajen lifler sinir sistemini rejenerasyonunu teşvik etmek için sınırlı derecede başarılarla kullanılmıştır (434, 435). Fibronektin matlar aynı zamanda kullanılabilir ve bunlar trofik faktörleri salmak için türetilir (436).

Her şeye rağmen doğal materyaller başlangıç noktasındadır. İstenilen özelliklere sahip polipeptid polimerler kimyasal sentez ya da genetik mühendisliği yolu ile yapılabilir. Özellikle tekrarlayan motifler temelinde olan proteinler herhangi bir kimyasal türevlendirme olmaksızın polimer içine direk olarak katılım, yol gösterme ve büyümeyi teşvik etmeyi sağlayan motifleri yerleştirmek için yaratılabilir. Nörit gelişimini destekleyen peptid çatı bir araya gelen özellikleri teşvik için tasarlanabilir. İpek temelli peptidlerde materyalin gücünü azaltma ya da bir araya gelen özelliklerini bozulma olmaksızın ipek molekülündeki hücrenin tanınması için fonksiyonel motifler ilave edilmesi olasıdır. Protein yapısında materyaller immün sistem için bir sorun ortaya koymakta immünojenik olarak tanınmayan gerekli yapısal özellikleri sağlayan motifleri tanımlamak olası olmalıdır.

Herşeyden önce bir köprünün içerisine aksonları çekmesi gereklidir. Travma sonrası belirli mesafe için büzülen aksonlar köprüyle temas kurmadan önce SSS dokusu içerisinde kısa bir mesafe için rejenere olmalı ve daha sonra SSS dokusundan köprü materyale geçebilmelidir. Kesilmiş aksonların periferik sinirin greftine girmesi konusunda sorun yoktur. Schwann hücre yüzeyi nöronal gelişim için çok hoşgörülüdür ve akson kemoatraktanları olan değişik trofik faktörler salarlar (437-439). Aynı zamanda bu hücreler uygun reseptörleri taşıyan aksonlar doğrultusunda hem olumlu hem de olumsuz olan netrin 1 sekrete eder ve aynı zamanda laminin, tenascin, ve chondroitin ve heparan sulfate proteoglikanlar gibi diğer matriks molekülleri (bunların bir kısmı kemoatraktan özelliklere sahip) sekrete eder (440). Bu özellikler Schwann hücre greftlerinin başarısına katkıda bulunur. Schwann hücrelerin implantasyonu ile beraber nörotrofin infüzyonu implante edilen kanallar içerisinde rejenerasyonu artırır (359). Bu trofik faktör ve kemoatraktan salan polimerlerin köprü içerisinde olmasının avantajlı olabileceğini göstermektedir. Haptotactic moleküller temas aracılığında yol gösterici işaretleri sağlar. Bunlar aynı zamanda genetik mühendisliği ile de oluşturulabilir. Bu faktörlerin bir kısmı ya da hepsi desteklenirse aksonlar travma sonrası çok çabuk bir şekilde implante edilen köprüye kolaylıkla girebilir.

SSS travmasını takiben birkaç hafta içerisinde bir dizi reaktif değişiklik sonucu glial skar oluşmaktadır. Bilindiği gibi glial skar dokusu içerisine basitçe bir köprü yerleştirmenin çok fazla başarılı olması olası değildir. Aksonların köprü içerisinde yeniden oluşan glial skar dokusu ve glia limitans boyunca büyümesi engellenecektir (441). Böylece travmayı takiben implantasyon belirgin şekilde geciktirilirse köprünün yerleştirileceği yerde skar dokusunun kaldırılması, çözülmesi veya değiştirilmesi gerekecektir. Aksonlar köprüye girer girmez büyüyen aksonlar için glial skar dokusu konu dışıdır. Ancak gene de "off-ramp" de engelleneceklerdir (442). Her şeye rağmen aksonların hepsi bir anda giremeyecekleri için tekrar skar dokusu oluşumu söz konusudur. Çevre SSS dokusu ile köprünün ilişkisi kesilecektir. Aynı zamanda aksonların köprüyü geçmesi zaman alacağı için glial skar dokusu "off-ramp" te tekrar oluşacaktır.

Başarılı bir şekilde köprüyü geçen aksonların köprüden çıkması ve nihai hedefine ulaşması için SSS dokusuna tekrar girmesi gerekmektedir. Köprü greftin yerleştirilmesi glial skar oluşumu ile sonuçlanacaktır. Böylece "off-ramp" in problemi aksonları köprüde karşılaşılan daha hoşgörülü çevreden daha az hoşgörülü bir çevreye ikna etmektir. Bu durumun ciddiyeti periferik sinir ve Schwann hücre greftlerde görülür. Aksonlar geniş sayılarda bu greftlere çekilir ve bunların çoğunluğu greftin ucuna ya da sonuna greft aracılığıyla büyüyebilir. Hemen hemen hiçbir akson glial skar dokusu aracılığıyla Schwann hücrelerden SSS'nin

hakim olan astrositik çevresine geri dönmemiştir. Şu ana kadar OEG hücre greftlerin artan sayıda aksona bir greftten ayrılması için izin verdiğini gösteriyor (384). Bunun nedeni OEG'lerin arkalarındaki aksonları çekerek göç etmesi ve greftin dışına büyümeyi sağlamak için moleküller sekrete etmesidir (126). Bu özellikler anlaşılırsa onlar "off-ramp içerisine katılabilirler.

Akson gelişimi ve yol göstericilik rejenere aksonların önde giden uç kısımlarındaki büyüme konisi ile kontrol edilir. Büyüme konisinden uzanan filopodia sabit bir şekilde çevreyi örnekler ve hem lineer aksonal büyüme hem de büyüme konisinin dönüşünü kontrol etmek için değişiklikleri iletir (443). Astrosit kaynaklı proteoglikanların keskin sınırları büyümeyi durdurur veya Schwann hücreler-astrositler ve astrositler-meningeal hücreler arasındaki sınırlarda olduğu gibi dönüşü in vitro teşvik eder (444). Her şeye rağmen aksonlar daha dereceli olarak uyum sağlayabilir (445). Daha hoşgörülü bir greftten hasarsız omuriliğe geçişteki glial skar dokusundan kaynaklanan engellerin azaltılması veya büyüme konilerinin bu sınırdan geçmeye ikna edilmesi "of-ramp" in problemidir. Geçişteki keskinlik ya sentezin engellenmesi ya da inhibitör moleküllerin nötralizasyonu veya tahrip edilmesi ile azaltılabilir. Glial skar hasarlı dokudan ve lezyon yerini işgal eden hücrelerden salınan sitokin ve kemokinlere cevap olarak oluşur. Bu çözülebilir moleküllerin etkilerini engelleyen faktörlerle tedavi skar oluşumunu azaltır. Glial skarın en büyük inhibitör molekülleri CSPG'ların kendi inhibitör aktiviteleri kısmi olarak uzun glikozamin zincirlerine bağlıdır (446-448). CSPG'ların inhibitör etkileri bunların glikozaminoglikan zincirini sindirmek suretiyle azaltılabilir (449). Böylece SSS'ni rejenerasyona daha hoşgörülü hale getirir. SSS çevresinin inhibitör doğası, uyarıcı ve engelleyici moleküller arasında bir dengedir (450). Böylece inhibitör CSPG'lar "off-ramp" da büyümeyi teşvik eden matriks moleküllerin dahil olmasıyla veya greft yerleştirildiği zaman çözülebilir faktörler gibi moleküllerin verilmesiyle engellenir. CSPG'lardan biri olan NG2, SSS yaralanmalarında hipertrofiye olan ve bölünen oligodendrosit precursorler tarafından üretilir (451). Prolifere olan hücreler antimitotik ajanlar tarafından öldürülebilir ve böylece antimitotik kemoterapi kullanarak oligodendrosit precursorlerin proliferasyonunu engellemek olasıdır ve bu da SSS'ni rejenerasyona daha hoşgörülü hale getirir (452). Antimitotik tedavi aynı zamanda yeni travma alanına meningeal hücrelerin invazyonunu ve proliferasyonunu kısıtlar.

Son çalışmada büyüme konisinin sinyal mekanizmalarını manüple etmek suretiyle aksonları daha az atraktif bir çevreye geçirmenin in vitro olarak olası olduğu gösterildi. Protein kinase C'nin aktivitesini değiştiren ve cAMP'nin konsantrasyonlarını modüle eden Rho GTPase inhibitörleri büyüme konisi cevabını değiştirebilmiştir (453-455). Büyüme konisinin yol

göstericiliği intrasellüler kalsiyum seviyeleri ile ayarlanabilir (456). İç dış sinyal aracılığıyla artan integrin aktivasyonu matriks faktörlere cevap olarak nörit gelişimini artırabilir (457). Bu sinyal mekanizmalarının herbiri aktin seviyesinde etkileşir ve böylece aksonal yol göstericinin kontrollü son uyum noktası olarak hizmet edebilir (458). Bir diğer strateji bir pozitif kemoatraktan sinyali negatif uzaklaştırıcı sinyale dönüştürmek için intrasellüler sinyal mekanizmalarını kullanmak olabilir (459). Bu strateji kommisural nöronlar tarafından omurilik gelişimi esnasında gerçekleştirilir. Bu nöronlar netrin1'in etkisi ile orta hatta çekilir. Orta hatta ulaşınca netrin1'e cevabını kendiliğinden kaybeder ve uzaklaştırıcı faktör tarafından uzaklaştırılır. Bunun netrin1 reseptörle slit reseptörün intrasellüler etkileşimi nedeniyle olduğu ortaya çıkıyor. Buna göre bir köprü planlamada "on-ramp"te netrin1 gibi bir kemoatraktan ve köprünün ortasında bir yarık varlığının sağlanması gereklidir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda köprünün görevi aksonların hasarlı omuriliğin proksimal güdüğündeki bir traktustan distal güdükte uygun beyaz ve gri cevher bölgesine büyümesini (ya da duyu aksonlarının varlığında distal güdükten proksimal güdüğe) bir kanal ya da oluk aracılığıyla sağlamaktır. Köprünün durumu yaralanmanın komplet ya da inkomplet olmasına, yaralanmanın ve köprünün kendisinin uzunluğuna ya da genişliğine, kistik kaviteler gelişip gelişmediğine göre her bireyde farklılık gösteren omurilik yaralanmasının tipine bağlıdır.

Motor ve duyu yollara rehberlik eden her bir köprünün donatılması gerekebilir. Her bir köprü yara alanı içerisinde tam bir yerleşime izin verecek kadar geniş olmalıdır. Aynı zamanda spinal kanalı ve BOS dolaşımını engellemeyecek şekilde olması gereklidir. Ayrıca hasar alanını çevreleyen skar dokusunu eksizye etmek köprü yerleştirilmesi ile başlatılan yeni skarlaşma olayını kontrol edebileceği için faydalı olabilir. Köprünün tüm yüzey alanı belirli sayıda aksonun gelişimine izin vermesi için yeterli olmalıdır. "on-ramp" parçalanmış aksonların kolay girişine izin veren lezyona hemen proksimal ya da hasarsız kordun en distal kısmında olan yerlere lokalize olması gerekir. Köprünün en ortasındaki kısmın omuriliğin dışında olmasına izin verilmeli veya meningeal yüzey altında omuriliğe implante edilmelidir. Her şeye rağmen köprünün çok iyi vaskülarize olmasını temin etmek ve akson gelişimini inhibe etmesi olası skar oluşturan fibroblastlar ve meningeal hücrelerle doldurulmaması gerekli olacaktır. Delikli hidrojel materyallerden yapılan köprülerin bu özelliklerin bir kısmına sahip olduğu görülmektedir (460). Bir köprü aracılığıyla ilerleyen aksonların fonksiyon görmesi için etraftaki iyonik çevrenin SSS'de olduğu gibi sıkı bir şekilde kontrol edilmesini gerekli kılmaktadır. Bu nedenle meninksler altında ve astrosit ihtiva eden doku içinde temasta implantasyon avantaj sağlamak açısından önemlidir. "off-ramp"ın lezyona

distal endojen fiber traktusa yakın komşulukta lokalize olması gereklidir. Sonuç olarak kortikospinal nöronların rejenerasyon gereksinimleri duyu nöronların rejenerasyonunkinden hafif farklı olabilir ki bu durum her birinin kendi köprüleriyle kolaylaştırılabileceğini destekliyor.

Aksonlar lezyona distal hasarsız SSS alanda olursa aksonlar büyümeye ve bir takım fonksiyonel innervasyonlar sağlamaya devam edecektir. Burada soru hangi derecede innervasyonun fonksiyonel iyileşmeyi teşvik etmek için gerekli olacaktır. Mütevazi sayıda aksonun inhibitör CSPG'ları sindiren myelinin inhibitör etkilerini azaltan tedavileri takiben veya Rho GTPase'ı inhibe etmek suretiyle bir lezyonu geçmeye teşvik edildiğine dair raporlar vardır (461-465). Lezyonu geçen aksonlar güncel tedavilerle daha fazla büyümeyebilir ne de aksonların sayısı fazladır. Her şeye rağmen 1-4cm büyüyen mütevazi sayıda akson bile belirli fonksiyonel iyileşmeyi teşvik etmek için yeterlidir.

Lokomasyonla ilişkili birkaç stereotipik davranış paterni omurilik içerisinde santral patern jeneratörleriyle yaratılır (466). Omurilik transeksiyonlu insanların treadmilldeki lokomotor eğitimi bir takım motor davranışları restore edebilir (467). Bir spinal segmente ait olan innervasyonun bir porsiyonunun bile restorasyonu fonksiyonu artıracaktır. Dengenin koordinasyonu ve lokomasyonu için kortikospinal ve retikülospinal traktların ve çıkan projeksiyonların rejenerasyonuna bağlı olacaktır. Böylece geriye kalan problem fonksiyonel lokomasyon sağlayan bu patern jeneratörleri senkronize etmek için rejenere liflerin nasıl başarılı bir şekilde geliştirileceği olacaktır. Motor davranışlar yaşamın geç döneminde öğrenilebilir bu omuriliğin belirli bir miktar plastisitesinin ifadesidir (468). Reinnervasyon sonrası omuriliğin yeniden çalıştırılması hastaların rejenere bağlantıların avantajını almasına izin verir.

Bir veya iki seviye fonksiyonun restorasyonu bile omurilik yaralanmalı hastalara önemli nörolojik fonksiyonları geri getirecektir ve hastalarda mütevazi miktarlarda akson rejenerasyonunu teşvik etmeye kalkışmak çok değerlidir. Bu köprünün uçlarının ötesindeki hasarsız bölgede aksonal büyümeyi teşvik eden tedaviler köprüye ve onun "off-ramp"ine yardımcı olacağını gösterir. Daha da ötesi başarılı şekilde rejenere olan aksonların fonksiyonu restore etmek için yeterli bir hıza sahip olan myelinli yapılar olması gereklidir. Bu remyelinasyonu teşvik etmek için daha sonra tedavilerin tekrar verilmesini gerektirebilir (örneğin: oligodendrosit precursorleri vermek gibi). Bu faktörleri sağlamak için düzenlenmiş mekanizmalar aksonlar başarılı şekilde köprüyü geçtiğinde geliştirilebilir (469).

2.4.3.1. Hücresel olmayan köprüler

SSS'nin rejenerasyon yeteneğini geliştireceğine inanılan ve son zamanlarda oldukça büyük ilgi çeken alanlardan birisi olan doku mühendisliğinin omurilik yaralanmalarında gerçekleştirmeye çalıştığı hedefler; yeniden büyüyen aksonlar için rehberlik edecek fiziksel olarak düşük dirençli yolların glial-konnektif doku skarı içerisinde geliştirilmesi, hasarlı SSS dokusu içinde glial ve vasküler reorganizasyon için destek çerçevelerin geliştirilmesi, travma sonrası omurilik içerisinde karşılaşılan çevrenin olumsuz özelliklerinin giderilmesi, kaybolan dokunun yerinin doldurulması, ikincil hasardan nöronun korunması, aksonal yeniden gelişimin ve sinaptik plastisitenin kolaylaştırılması ve astrositozisin inhibisyonudur. Özellikle Schwann hücreler veya nöral kök hücre greftleri gibi hücresel tedavi stratejileri ile kombine olarak hücresel olmayan köprülerin ya da yapı taşlarının kullanımının hasarlı omuriliğin onarımını teşvik edeceği yönünde bir umudu ortaya koyması bu düşüncelerin doğruluğunu daha da artırmıştır. Ancak bu stratejilerin gelişiminde periferik sinir sisteminin onarımında kullanılan benzer stratejilerin desteğinin önemi hiçbir zaman unutulmamalıdır.

Bu alanda kollajen, hidrojel, nitrosellüloz membranlar, karbon filamentler, cam filamentler, gelfoam ve farklı polimerlerden oluşan rehber tüpler gibi değişik matriksler kullanılmıştır. Ancak değişik düzeylerde başarısızlık ve yetersizliklerle karşılaşmıştır (37, 84, 85). Bu kanalların bir kısmının akson gelişimini sınırlandırdığı ve aksonların asla alıcı SSS dokusu içerisine yeniden girmeyi başaramadığı belirtildi. Kollajen matriks köprüye laminin gibi nöroaktif maddelerin eklenmesi aksonal içeri büyümei kolaylaştırdı. Ancak aksonların köprüyü geçmesi ve distal omurilik güdüğüne girmesi oldukça sınırlıydı (86). Her ne kadar bu yapay köprüler aksonlara belirgin bir şekilde iyi ortam ve yeni bir yol sağlayabilse de aksonal yeniden büyüme greft-distal güdük arasındaki yüzeyde yer alan olumsuz özellikler nedeniyle engellenmektedir.

Diğer yandan hücresel olmayan köprüler sayısız çalışmada büyümei teşvik eden glial hücrelerin ve büyüme faktörlerinin pozitif yönde bir uygulayıcısı olarak kullanıldı. Böyle matriks/glial hücre veya matriks/NTF kombinasyonların kullanımının implantasyon yerinde hücrelerin belirli düzeyde bir araya gelmesini sağladığı, iyi bir çevre oluşturduğu ve nöroaktif maddelerin kontrollü ve yavaş salınımına sağladığı gösterildi (72, 87, 88).

2.4.3.1.1. Biyobozulabilir Biyomateryaller

Kollajen: İnsan vücudu toplam proteininin %25–30'unu oluşturan 19 farklı kollajenden en sıklıkla tip I kollajen kemirgenlerde omurilik yaralanma sonrası aksonal rejenerasyonu teşvik

etmek için yapı iskelelerinin temel yapı taşı olarak kullanılmıştır. Transekte omurilikte köprü oluşturması dışında BDNF ve NT-3'le kombinasyonunda kortikospinal aksonal rejenerasyonu uyardığı ve fonksiyonel iyileşmeye yol açtığı ve Schwann hücreler ile birlikteliğinde aksonal rejenerasyona katkıda bulunduğu gösterildi (293-296). Transeksiyon modellerinde transplantasyon sonrası 12. haftaya kadar olan hayvan ölüm oranlarının yüksek olması kollajen liflerle ilgili sitotoksikite olasılığını ortaya koydu (297). Bu durum omurilik hasarının onarımında kollajenin rolü ile ilgili bir belirsizlik yarattı. Daha sonra bu olayın kullanılan kollajen formuna bağlı ya da kombine edildiği madde ile ilişkili olabileceği belirtildi. Siyatik sinir transeksiyon modelinde her 2 uçtaki güdükleri köprüleme açısından kollajen fonksiyonel bir iyileşme sağlamadı (298). Kollajen jellerin konsantrasyonun rejenere aksonlar için bir bariyer olabileceği belirtildi (299). Ayrıca kollajen jeller omurilik yaralanmalarından sonra endojen stem/progenitor hücreler ve büyüme faktörleri ile birlikte kullanılmıştır (300).

Fibronektin: Doku onarımı, embriyogenezis, kanın pıhtılaşması ve hücre migrasyon ve adezyonunda karşılaşılan bir ekstrasellüler matriks glikoproteindir. Deneysel çalışmalarda hasarlı periferik sinir ve omurilik onarımında çatı olarak kullanılmıştır (301). Fibronektin önemli bir ekstrasellüler matriks protein olmasına rağmen periferik sinirde elde edilen iyi sonuçlar omurilik yaralanmalarında nörotrofik faktör ve anti-TGF β 2 ile kombine edilmesine rağmen elde edilemedi (302, 303).

Alginate/agarose: Biyouyumluluğu ve hidrofilik özelliği dışında aljinatın düşük toksisiteye sahip olması hasarlı omurilikte kavileri doldurmada kullanılmasına yol açmıştır (304). Aynı zamanda astrositozisi azalttığı ve aksonlar için bir rehber gibi hareket ettiği gösterildi (304). 3 boyutlu bir çatı olarak hipokampus kaynaklı nörosferlerle birlikte hasarlı omurilik içerisine implantasyonunun yararlı olduğu gösterildi (305). Aljinat içerisinde bulunan BDNF üreten fibroblastlar herhangi bir immünsüpresyon yapılmaksızın hasarlı omurilik içerisinde yaşadı ve fonksiyonel iyileşme sağladı (306). Ancak aljinatın saflığının bozulması durumunda mitojenik ve sitotoksik problemler ortaya çıkabilir (307). Bunların transplantasyon öncesi üst düzeyde yeniden saflaştırılması gereklidir.

Denizdeki otlardan ekstrakte edilen ve lineer bir polisakkarit olan agarozun NGF ile birlikte kullanımının aksonal rejenerasyon üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu ve agarozun in vitro hücre adezyon ve nörit gelişimi için yol gösterici olduğu tanımlandı (308, 309).

Hyaluronic acid: Doku onarımında önemli bir rolü olduğu ve daha fazla araştırılmasının gerektiği düşünülen hyaluronik asitin hyaluronan temelli kanallarının in vivo ve in vitro olarak biyoindirgenebilir, non-sitotoksik ve biyouyumlu olduğu gösterildi (310). Omurilik

transeksiyonu sonrası ortaya çıkan açıklığa hyaluronik asit içinde gömülü embriyonik omurilik dokusunun transplantasyonu hafif düzeyde bir fonksiyonel iyilik kazandırdı (311).

Chitosan: Bugüne kadar bir takım biyomateriyaller omurilik ve periferik sinirin transeksiyon tip yaralanmalarında skar oluşumunu engelleyici bir bariyer veya periferik sinirin ya da omuriliğin içerisinden geçtiği köprüler ya da kanallar olarak kullanıldı. İyi yönde rejenerasyon sonuçlarına rağmen bu biyomateriyallerin klinik kullanımda zayıf mekanik özellikler göstermesi ve biyouyumluluklarının alt düzeyde olması chitosan gibi yeni bir tüp geliştirilmesi ihtiyacını doğurdu.

İnsan vücudunda ekstrasellüler matriks makromolekülerinin major bileşeni olan N-acetyl-D-glucosamine ünitelerinin birlikte olduğu bir polimer olan chitin, yeryüzünde 2. en bol oranda bulunan bir polisakkarittir (312). Chitin aynı zamanda kabuklu hayvanların ve böceklerin sert kısımlarının ve kabuklarının hatta bakteri ve mantarların hücre duvarlarının başlıca bileşenidir. Biyouyumluluğu, biyoparçalanabilirliği ve glukozaminlere yapısal benzerliği nedeniyle chitin, biyomedikal uygulamalar için tercih edilen bir polimerdir (312). Yara örtücü materyal olarak kronik gastroduodenit, ülser ve endodontide kullanılır. Ortopedik yaralanma, travma ve derin yanıklarda chitin membranlar tedavi amaçlı klinikte kullanımdadır (313). Klinikte kullanılmasına rağmen chitin kolay çözünabilir ya da işlenebilir olmaması chitin beklemeye bir biyomateriyal olmasına yol açmıştır (314). Chitosan ise kimyasal olarak bir bitki lifi olan sellüloza benzer yapıda doğal olarak bulunan bir maddedir (313). N-deasetilasyon ile chitinden hazırlanan chitosanın çözünabilirliği oldukça kolaydır ve birçok medikal uygulamada araştırma konusu olan bir biyomateriyaldir. Chitin, chitosandan çok daha hızlı olarak içeriği bozulabilir olmasına rağmen kanla daha uyumlu ve daha az makrofajı aktive eder (315-319) .

Bu tür polimerlerin periferik sinir yaralanmasında klavuz kanal olarak kullanımını sınırlayan neden daha düşük mekanik dirence sahip olmasıydı. Ancak bir takım bileşenlerin eklenmesi mekanik dirençlerini ve sinir kılavuzu olarak kullanımlarını artırdı. (320-325). Aynı şekilde değişik yöntemlerle sinir kılavuzu olarak kullanılan tüplerin istenilen düzeyde mekanik özelliklere sahip olmaları sağlandı (312).

Biyouyumlu ve biyobozulabilir özelliğe sahip olması dışında toksik olmayan chitosan kemirgenlerin ve köpeklerin siyatik sinir yaralanmasında onarım için yapay köprü olarak kullanıldı (326, 327). Ek olarak chitosandan elde edilen boru şeklindeki çatılar üzerinde Schwann hücre transplantasyonunun periferik sinir yaralanmasında faydalı olduğu gösterildi (328). Ancak SSS hasarının onarımı ile ilgili olarak chitosan kullanımı hakkında fazla bir

yayın olmamasına rağmen Dr. Tator ve Dr. Schoichet'in laboratuvarında çalışmalar bu yönde devam etmektedir.

Poly- β -hydroxybutirate: Doğadaki mikroorganizmalardan sentez edilen yüksek molekül ağırlıklı, biyobozulabilir ve biyouyumlu polimerlerdir. Kedilerin ve kemirgenlerin transeksiyon modelinde kanal içerisinde Schwann hücrelerin güdükler arasındaki açıklığa transplantasyonu aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdı (329, 330). Omurilik yaralanmasının tedavisinde aljinat hidrojel, fibronektin ve neonatal Schwann hücreler ihtiva eden poli β -hidroksi butirat liflerin implantasyonu red nükleus içerisindeki nöronları sekonder nöronal atrofiden korudu ve rat servikal omurilik hemiseksiyonu sonrası implant içerisine aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdı (331).

PGA/PLA: Sentetik biyobozulabilir polyesterlerden oluşan PGA ve PLA doku mühendisliğinde geçici ekstrasellüler matriks olarak kullanıldı (332). Örneğin plastik ve rekonstruktif cerrahide cilt defektlerinin onarımında yapay cilt grefti olarak ve periferik sinir yaralanmasında aksonal yeniden bağlantının sağlanmasında yol gösterici kanallar olarak kullanıldı (332, 333). Laminin kaplı kollajen materyalle dolu modifiye PGA tüpleri tüp kollapsı olmaksızın periferik sinirin elongasyonuna yol gösterici olurken PLLA transekte periferik siniri yeniden bağlamada kullanıldı (334, 335). %10 PLLA ile karıştırılmış Schwann hücrelerinin yüksek molekül ağırlıklı PLLA'den yapılmış tüp içerisinde implantasyonu omurilik yaralanması sonrasında aşırı vaskülarizasyonun eşlik ettiği aşırı aksonal büyümeye yol açtı ancak 4 ay sonra tüpün minimal kollabe olduğu gözlemlendi (335). Bir diğer çalışmada PDLA tüpler omurilik içerisine greftleme sonrası 2 ayda tamamen kollabe oldu (287). BDNF ile doldurulan PDLA çatı greftlerin rat omurilik transeksiyon modelinde aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdığı tespit edildi (336). PLLA ile uygulamalarda dezavantajlardan birisi çabuk bozulabilir olmasıdır. Bu degradasyonun hızını kontrol etmek için PLGA, PCL ve PLGA+PCL karışımı değişik sentetik polimerler kullanıldı (337, 338). Kemirgen nöral stem hücrelerin ekildiği PLGA çatının rat omurilik hemiseksiyon alanına implantasyonu sonrası belirgin şekilde fonksiyonel iyileşme gözlemlendi (253). Herşeye rağmen degradasyon hızını kontrol etmenin oldukça güç olduğu görülmektedir. Örneğin greftlenen PLGA silindirler rat omurilik transeksiyonunun 3. haftasında yok oldu (285).

Polycarbonate: Hidrofobik ve adeziv olmayan 3 boyutlu polikarbonat tüpler SSS onarımında kullanıldı (286, 339). Schwann hücreleri veya embriyonik astrositlerle dolu poly-L-lysine ile kaplı rulo halindeki polikarbonat membranlar rat beyinine implante edildikten 6 ay sonra daha fazla sayıda rejenere akson tüp içerisindeydi (339). İlginç olarak ratlarda hemiseksiyon

tip yaralanma sonrası hasarlı alana polikarbonat tüp implantasyonu bu çalışmadakine benzer şekilde aksonal büyüme derecesini artırdı (286).

Polyethylene glycol: SSS travmasını takiben nöroprotektif özellikler gösteren PEG oksidatif stresi azaltır ve hasarlı hücre membranlarını kapar. Düşük protein ve hücre adezyon özelliklerine sahiptir (340). Omurilik yaralanması sonrası PEG solusyonunun uygulanması hasarlı omurilikte kavite hacmini azalttı ve fonksiyonel iyileşme sağladı (341).

2.4.3.1.2. Biyobozulabilir olmayan biyomateryaller

PHEMA ve PHEMA-MMA

Omurilik yaralanmalarının onarımında bu tür biyomateryallerin kullanımının tercih edilme sebebi yapısal olarak stabil olmalarıdır. Aynı zamanda yoksik olmaması ve biyouyumlu olması gereklidir. Özellikle omuriliğin mekanik özelliklerine benzer şekilde düzenlenmiş mükemmel gözenekli tüpler geliştirilmiştir (342). Siyatik sinir transeksiyonu sonrası FGF-1 ile dolu PHEMA-MMA hidrojel kanalların kanallar içerisindeki aksonal rejenerasyonu artırdığı gözlemlendi (299). Ratlarda kontüzyon tipi omurilik yaralanmasından sonra omurilik içerisinde gelişen kavite içerisine PHEMA süngerinin veya transeksiyon sonrası güdükler arasına boş PHEMA-MMA kanalların implantasyonu aksonal yeniden büyümeyi kolaylaştırmasına rağmen implantasyon sonrası 8 haftada kollabe oldukları tespit edildi (343-346). Bu problemi ortadan kaldırmak için koil ile yeniden güçlendirilmiş PHEMA-MMA/PHEMA kanallar komplet omurilik transeksiyonu sonrası yeni bir spinal fiksasyon yöntemi ile birlikte kullanıldı (347). Farklı nörotrofin kombinasyonları (NT3 ve FGF1) ve matriksleri (fibrin, kollajen ve metilsellüloz) barındıran bu güçlendirilmiş kanalların spesifik supraspinal ve lokal aksonal rejenerasyonunu iyileştirdiği gözlemlendi (348).

PHPMA: İlaç verilme ve gen tedavi uygulamalarında gelişim aşamasındaki PHPMA omurilik onarımında faydalıdır (349, 284). Kronik omurilik yaralanma modelinde PHPMA hidrojinin kavite hacmini azalttığı, kan damarlarının proliferasyonunu artırdığı ve fonksiyonel iyileşme için greftler içerisine aksonal büyümeyi uyardığı gözlemlendi (350). Transekte omuriliğin güdüklerini köprülemek için kullanılan PHPMA aksonal myelinasyonu uyardı ve hasarlı alanda astrositoziste azalmaya yol açtı (351). İlave olarak BDNF ve CNTF üreten fibroblastlar ve PHPMA hidrojel greftler ratlarda beyin yaralanması sonrası belirgin aksonal yeniden büyümeyi teşvik etti (352). Rat korteksi içerisine PHPMA hidrojel implantasyonu PHEMA'nın yaptığından daha fazla miktarda konnektif doku gelişimine yol açtı (353).

PAN ve PVC: İn vivo kullanımda stabil ve zararsız olan PAN/PVC in vitro kullanımda nöral hücre adezyonu kolaylaştırmak için Matrijel ile kaplanmasını gerektirir (354, 355). Periferik sinir yaralanmasında PAN/PVC veya PAN ya da PVC tek başına yol gösterici kanal olarak kemirgenlerde sinir rejenerasyonunu kolaylaştırırken SSS yaralanmasında aksonal büyümeyi uyandıramadı (356-358). Yüksek biyouyumlulukları nedeniyle omurilik yaralanmasında PAN/PVC çatılar sıklıkla kültüre rat/insan Schwann hücreleri veya olfaktor ensheathing glia ve BDNF, NT-3 veya GDNF gibi nörotrofik faktörlerle ile kombine edildi ve myelinli aksonların rejenerasyonunu kolaylaştırdı (359-361). PAN/PVC umut gösteren bir biyomateryal olmasına rağmen tüp şeklinde üretilirken organik solventler gerektirmesi klinik uygulanmasını güçleştirmektedir.

Karbon filamentler: Mekanik gücü iyi ve biyouyumlu olan karbon ortopedik cerrahi ve bir takım biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Rat omuriliğinin transeksiyonu modelinde karbon filament implantasyonu fonksiyonel iyileşme olmaksızın aksonal büyüme sağlarken kontuzyon modelinde kaviteye implantasyon aksonların yeniden büyümesine yol açtı (362, 363). Daha da ötesi fetal omurilik dokusunun karbon filament ile kombinasyonu hasarlı erişkin omuriliğinin onarımına yardım etti (364). Ayrıca in vitro olarak karbon nanofiberler astrosit etkileşimlerini minimal düzeye indirdi (365). Biyoaktif molekül 4-hidroksinonenal ile kaplı karbon nanotüpler nöronal büyümeyi kolaylaştırdı (366).

Silikon: Polimerin karışım ve uzunluğa bağlı olarak sıvı, jel, köpük, reçine veya lastik formunda elde edilen ve sıklıkla kozmetik tıpta kullanılan silikonun bir takım komplikasyonları vardır. Tüp şeklinde silikon çatılar periferik sinir onarımında kullanıldıysa da uzun süreli kullanımda kronik sinir basısına yol açabilecekleri gözlemlendi. (367, 368). Domuz omuriliğinin hemiseksiyon modelinde sabit elektrik akımlı stimülatörle kombine silikon tüp implantasyonunun aksonal yeniden büyümeyi sağladığı tespit edilse de implantasyon sonrası boş silikon tüp içerisinde birkaç rejenere akson vardı (369). Silikon implantasyonunun sağlam rat beyinde oldukça yoğun astrositozise yol açtığı unutulmamalıdır (370). Yine silikon tüpler biyouyumlu olsalar bile travma sonrası hasarın onarımı için gelecekte kullanılacak materyaller gibi düşünülmemektedir.

2.4.3.2. Hücresel köprüler

2.4.3.2.1. Fetal SSS dokusu

Hasarlı SSS bölgelerinin yeniden yapılandırılmasını sağlayan en merak uyandırıcı yaklaşımlardan biri de fetal doku greftlerinin implantasyonudur. Son birkaç yıl içerisinde

yapılan bazı deneyler fetal SSS dokusu transplantasyonunun rejenerasyon çalışmalarında önemli bir yaklaşım olarak hizmet ettiğini göstermiştir. En heyecan verici yaklaşımlardan biri olan fetal greftler ile elde edilecek başarılar 2 mekanizma ile açıklanabilir. İlkinde hasarlı ya da kaybolmuş erişkin nöronların fetal olanlarla yer değiştirmesi ile rejenerasyon potansiyelinin düzeltilmesidir. Bu transplantların yeni çevrede gelişme, alıcı doku ile uyum, alıcı hücrelerle sinapslar oluşturma ve alıcı nöronlardan sinapslar alma konusunda belirgin bir kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir (89, 90). Nörodejeneratif hastalıklı birkaç hastada deneysel klinik çalışmalarda kullanılmış ve sonuçlar umut vericidir (91). İkinci ve hatta aksonal rejenerasyon için daha önemli olan fetal greftlerin aksonal uzamanın lezyon alanını geçmesini kolaylaştıran bir doku köprüsü veya bir düzenleyici-dağıtıcı bir istasyon olarak hizmet etmesidir (92). Daha da ötesi fetal transplantlar skar matriksini değiştirir ve immatür glial hücreleri hasar alanına sundukları için aksonal büyümede önemli tropik ve trofik faktörlerinin bir kaynağı haline gelir. Bu rejenerasyon sistemleri için potansiyel yararlı etkiler intraspinal greftleme çalışmalarında gözden geçirilmiştir (93). Daha yeni olarak embriyonik nöronların daha uzak hedeflere erişme, büyümeyi kolaylaştırma, fetal omurilik greftinin her iki ucunun alıcı doku ile bağlantı kurma ve komplet omurilik lezyonunu geçme yeteneği deneysel olarak gösterilmeye çalışıldı (4). Diğer taraftan fetal greftlerin erişkin omurilikte köprüler oluşturmaları yönünde çalışmalar hızla devam etmektedir.

2.4.3.2.2. Periferik sinir/Schwann hücreleri

Omurilikte transeksiyon sonrası oluşan açıklığın periferik sinirle köprülenmesi fikri omurilik yaralanmaları ile ilgili araştırmalar üzerinde oldukça etkin olmuştur. Özellikle yeterli rejenerasyonun oluşmadığı bir ortam içerisine aksonal rejenerasyonu desteklediği bilinen bir çevrenin yani periferik siniri yerleştirilmesi ile santral aksonların yeniden gelişebildiği ve büyüyebildiğinin gösterilmesi omurilik yaralanması ile ilgili araştırmalara bir hız kazandırdı. SSS içerisine PNS'in implantasyonu ile ilgili öncü çalışmaları yapan Tello siyatik sinirin dejenere olmamış greftlerini memeli beynine implante ederek santral liflerin 2 hafta sonra greft içerisine aşırı büyüdüğüne dikkat çekti (28). Daha sonra Ramón y Cajal tarafından çevre şartları uygun olduğu takdirde aksonların rejenere olabileceği belirtildiyse de bu durum süreç içerisinde göz ardı edildi (357). Daha sonraki süreçte omurilik içerisine periferik sinir transplantasyonu ile uğraşan Aguayo grup tarafından kullanılan izleme teknikleri ile rejenerasyon gösteren liflerin gerçek kaynağının ortaya konulması ile büyük bir gelişme sağlandı ve periferik sinir sistemi greftlerinin hem aksonal rejenerasyon için yeterli bir uyaran

olduğu hem de tam olarak matür SSS aksonlarının rejenere olma kapasitesine sahip olduğu onaylandı (25, 94, 95, 485). Aynı şekilde komplet transeksiyon modelinde elde edilen 5-10mm açıklığın periferik sinirle doldurulduğu bir çalışmada aksonların her 2 günden greft içerisine rejenere olduğu gözlemlendi. Ancak kortikospinal liflerin bu greftlere girmediği ve bu grefte girenlerinde diğer uçtan çıkamadığı gözlemlendi (485). Bir diğer çalışmada ise hasarlı erişkin memeli retinal aksonlarının bir kısmının en az 2cm periferik sinir otogreftleri içerisine rejenere olduğu, implantın distal ucundan dışarı uzandığı ve tektal nöronlarla uzun etkili ve fonksiyonel olarak efektif sinapslar oluşturduğu tespit edildi (2, 96). Ayrıca komplet transeksiyon modelinde beyaz cevherden gri cevhere uzanan periferik sinir lifleri, FGF1 ile karışık fibrin glue ve bir stabilizasyon tekniği ile bir arada kullanıldı. Bu modifikasyonda izlenen sıra düzenli olduğu taktirde kortikospinal traktus ve beyin sapından bir takım nöronların periferik sinir içerisine uzandığı ve fonksiyonel iyileşmenin olduğu gösterildi (97). Bu çalışma hasarlı SSS içerisinde aksonal rejenerasyonu etkili bir şekilde restore etme amacı doğrultusunda önemli bir aşamadır. Yukarıda ifade edilmiş çalışmalarda periferik sinir greftleri dejenere akson segmentlerine yakın komşulukta direk lezyon alanına yerleştirilirken son çalışmada parçalanmış hücre gövdesi komşuluğunda yerleştirilmiş periferik sinir greftlerinin etkisi değerlendirildi. Bir diğer çalışmada vitreus gövdesine yerleştirilen periferik sinir dokusunun ezilmiş optik sinir aksonlarının büyüme inhibitör moleküllerinin baskısı olmaksızın rejenerasyonunu teşvik ettiğini gösterdi (98). Her şeye rağmen periferik sinir implantasyon çalışmalarında sinirlerin yerleştirilmesinin fiziksel olarak yarattığı mekanik hasar ve sinirin alıcı doku ile anormal bağlantılar oluşturması bu yaklaşımda bir takım sınırlamalara neden oldu (97, 99).

Transplante edilen periferik sinirlerin büyümeyi teşvik edici etkilerinin sinir içerisinde yaşayabilen Schwann hücrelerinin varlığına bağlı olduğu düşünülür. PSS ve SSS’de aksonal yeniden büyümeyi kolaylaştırmada büyük bir potansiyele sahip olan Schwann hücreleri aksonal büyümeyi uyarıcı birkaç nörotrofik faktörü ve ECM molekülleri sentez eder. Hasarlı omuriliğin onarımında yüzey adezyon moleküllerini kullanır (100-102, 371). Lezyon tarafından yaratılan yoğun astrositozisi modifiye ederek aksonal rejenerasyonu teşvik eder (83, 103). Gerçekte Schwann hücresinden serbest periferik sinir greftleri SSS rejenerasyonunu desteklemeyi başaramaz. Birçok implantasyon çalışmasında Schwann hücrelerinin aksonal rejenerasyonu uyarıcı etkileri gösterildi (103-105). Büyümeyi teşvik eden etkilerinin yanı sıra Schwann hücreleri SSS rejenere olan aksonları miyelinleme kapasitesine sahiptir (83, 105).

Schwann hücrelerini omurilik yaralanmalı insanların periferik sinirinden elde etmenin en cezbedici tarafı kültür ortamında 10.000 – 100. 000 kat çoğaltılmalarıdır. Yapılan

çalışmalarda biyopsi ile elde edilen 1cm'lik insan periferik sinirinden 6 haftada 30m uzunluğunda 2.6mm çapında bir greft hazırlanabildiği ve aynı kişide bunun kullanılabileceği gösterildi (383).

Schwann hücrelerini yüksek konsantrasyonlarda hasarlı alana uygulamada geçirgen nitelikte jeller, sentetik polimerler ve bazal membran bileşenlerinden yapılan tüpler yol gösterici kanallar olarak kullanıldı (103-106). Schwann hücrelerden oluşturulan 4-5mm uzunluktaki köprülerin transekte omuriliğin uçlarındaki güdükleri bir araya getirdiği bilinmektedir (358). Periferik sinir transplantasyonda olduğu gibi santral lifler Schwann hücre greftleri içerine 2 uçtan girerler. Bu durum matrijel (bazal laminanın bir bileşenini ihtiya eder) içerisinde Schwann hücrelerinin bulunduğu bir PAN/PVC polimer kanalla yapılan çalışmada gösterildi (144). Kanal içerisinde hücre uygulamalarının fonksiyonel üstünlüğü yoktur ancak evre skar dokusundan koruyucu özellikleri vardır. Bir diğer çalışmada ise yol gösterici kanal ile kültüre rat veya insan Schwann hücrelerinin kombinasyonunun deneysel omurilik yaralanmasının onarımında minimal etkinliğe sahip olduğu gösterilse de Schwann hücrelerle ekili PAN/PVC tübüler çatının implantasyonu ile kombine BDNF veya NT3 gibi nörotrofik faktörlerin infüzyonu veya metilprednisolon verilmesinin omurilik yaralanması sonrası beyin sapı nükleusundan aksonal rejenerasyonu uyardığı tespit edildi (70, 87, 104, 357-359, 361). Bir transeksiyon modelinde omurilikten inen lifleri değerlendirmek için köprünün distal ucu kapatıldığında verilen BDNF ve NT3 ile greft içerisinde myelinli akson sayısında artma, rostral omurilikte retrograd olarak işaretili nöronlarda artma ve transeksiyon yerinden uzakta olan bir kısım nöronal popülasyonda rejenerasyon olduğu (beyin sapı cevabında artma) ve trofik faktörlerin bunu kolaylaştırdığı belirlendi (70). Ancak tüm nörotrofinlerin aynı etkiye sahip olmadığı da gösterildi. Komplet transeksiyon modelinde omurilik içerisine BDNF/cDNA üretmesi için retrovirüs aracılığıyla enfekte edilen Schwann hücreler verildiğinde bu hücrelerin transeksiyon yerine ve bu alandan distal omurilik içerisine 5mm uzandığı ve Schwann hücrelerinin enfekte edilmediği grupla karşılaştırıldığında daha fazla seratonerjik ve adrenerjik nöronlara sahip olduğu gösterildi (78).

Bir polimer içerisinde Schwann hücrelerin transplantasyonunda C3 ve S4 seviyeleri kadar uzak alandaki spinal nöronların çıkan ve inen liflerinin greft içerisine uzanımı kortikospinal traktus lifleri ile gösterilemedi (358). SSS travmasında rejenere aksonların greften ayrılmadaki zorluğunun greft distali ve komşu omurilik yüzeyinde ortaya çıkan CSPG'a bağlı olabileceği ileri sürüldü (441). Schwann hücrelerinin kullanıldığı bir komplet transeksiyon modelinde distal güdükte daha belirgin düzeyde proteoglikan bulunduysa da doku canlılığı, dejenere ve rejenere olan aksonların tipleri, kan beyin bariyeri yetmezliği, makrofaj ve

mikroglia sayısı ve kan sirkülasyonu ile bu zorluğun bağlantılı olup olmadığı tespit edilemedi (442).

Schwann hücre greftinden distal omurilik içerisine gelişimi sağlamada 3 farklı strateji tanımlanmıştır. Bunlardan birincisinde diğer türlerden hücreleri kabul eden nude ratlara insan Schwann hücreleri transplante edildiğinde rejeneratif cevapta belirgin düzelme tespit edildi. Beyin sapındaki sinir hücre gövdesine uzak olmalarına rağmen greft içinde seratonerjik ve noradrenerjik lifler, az sayıda propriospinal ve duyu lifler ve myelinli akson bulundu ancak bir kısım liflerin distal omurilik içerisine maksimum 2.6mm girdiği belirlendi (144). Distal omurilik içerisine büyümenin bir kapak ile engellendiği bir başka çalışmada açık uçlu modelin davranış skorlarında belirgin düzelme olduğu istatistiksel olarak ortaya kondu (489). Bu cevabın lokal nöronal devrelerin aracılık ettiği propriospinal yerleşimle ilgili olduğu belirtildi (144). Bir transeksiyon modelinde insan Schwann hücresi alan grubun treadmill testinde greftlemenin distal güdükte eksitabilitiyi artırmasındaki nedeninin lumbar-stepping pattern-generating nöronların aktivitesi olduğu ifade edildi (499). Rejenere liflerin Schwann hücresi greftinden dışarı gelişimindeki 2. stratejide transeksiyon sırasında metilprednizolon ile birlikte Schwann hücre transplante edildiğinde daha fazla myelinli akson ve spinal nöronun greft içerisine uzandığı ve beyin sapı nöronlarının cevap verdiği gözlemlendi (360). Daha önce periferik sinirlerle yapılan bu tür uygulamada elde edilemeyen başarının nedeni olan beyin sapı ve greft arasındaki mesafenin uzunluğu kavramı Schwann hücresi ve metilprednizolon ile aşıldı. Ancak grefte komşu alanda sekonder hasarın metilprednisolon ile azaltılmasının greftten dışarı çıkan lif sayısının artmasında etkin olduğu üzerinde duruldu. Bu komplet transekte omurilik yaralanma modelinde vestibulospinal traktusta ölümün metilprednizolon ile daha da azaldığı gösterildi (500). 3. yaklaşım ise bir omurilik transeksiyon modelinde güdükler arasına rat Schwann hücre transplantasyonu ve güdükler içerisine olfactory ensheathing glial hücrelerin enjeksiyonudur. Burada greftte yer alan rejenere liflerin distal güdük içerisine uzandığı gösterildi. Rejenere duyu nöritleri için bir bariyer olan dorsal kök giriş zonunun gerisine OEG hücreler verildiğinde gelişen ya da büyüyen aksonların omuriliğe girmesi sağlandı ve dorsal boynuz içerisinde uygun laminada sinapslar OEG'ler eşliğinde oluştu (124). Graft ve omurilik arasındaki yüzeyde aksonların geçişi ve gelişiminin OEG varlığında daha kolay olduğunu anlamak için OEG'ler köprünün her 2 tarafına enjekte edildiğinde greftin her 2 tarafından rejenere liflerin geçişinin olduğu özellikle çıkan liflerin 2.5cm'den daha fazla omurilik içerisine girdiği belirlendi (227). Bu çalışmayı takiben Schwann hücresi olmaksızın OEG'ler transeksiyonun her 2 tarafında yer alan güdüklere enjekte edildiğinde OEG'ler transplantasyon alanına göç etti (501). Fonksiyonel düzelmenin

sağlandığı bu çalışmada seratonerjik, noradrenerjik ve kortikospinal traktus lifleri lezyon yerini çaprazladı ve distal omuriliğe girdi. Ancak ilk 2 traktus liflerinin dışında kortikospinal traktus liflerinin pia mater altında ilerleyerek distal omuriliğe girdiği gözlemlendi.

Bu çalışmaların dışında Schwann hücreler bir takım biyomateryallerle birlikte kullanıldı. Bir transeksiyon modelinde kemik iliği stromal hücre kaynaklı Schwann hücreler biyobozulabilir olmayan tübüler çatı içerisinde implante edildiğinde aksonal yeniden büyümeyi kolaylaştırdı ve fonksiyonel iyileşme sağlandı (372). Gelecek için çok önemli olan Schwann hücrelerin implantasyon sonrası yaşayabilirliklerinin ölçülmesinin önemli olduğu belirtildi. Özellikle transeksiyon sonrası ortaya çıkan büyük mesafeleri kapatılmasında (köprü) ve distal ve proksimal güdüğün geometrisinin karmaşık olduğu durumlarda kullanılan bu tip protezlerin alıcı dokuda hasara yol açabileceği ve hacim ve pozisyonlamada sorun çıkarabileceği göz ardı edilmemelidir (107, 108). Bu sıkıntıları minimal düzeye getiren mikrotransplantasyon metodu ile erişkin rat beyni içerisine oldukça fazla sayıda Schwann hücre süspansiyonu transplante edildiğinde greftleme yerinde tümör oluşturmadığı, serbest şekilde belirgin uzaklıklara göç ettiği ve nöropil veya beyaz cevher içerisine integre oldukları gözlemlendi (38, 83). Aynı teknikle Schwann hücreleri transekte fornixe enjekte edildiğinde yeniden büyüyen liflerin daha önceki geçirgen olmayan lezyon yerini geçerek normal hedefe uzandığı ve orada yeniden sinaptik temaslar oluşturduğu belirlendi (109). Daha önceki çalışmalara zıt olarak postcommisural forniks liflerinin santral myelin tarafından yeniden myelinlendiği tespit edildi (110). Schwann hücrelerinin immünojenik olmayan bir greft kaynağı olması ve erişkin insan periferik sinirinden genişletilebileceğinin gösterilmesi bu tür yaklaşımlarda tercih sebebidir (111, 112).

2.4.3.2.3. Olfactory Ensheathing Glial Cells (OEGs):

Olfaktor bulbus, olfaktor aksonların rejeneratif kabiliyetinden sorumlu olduğu bilinen özel tip makroglia (ensheating glia) ihtiva eder. NGF sekrete eden bu hücreler nörit oluşum ve gelişiminde öncü değişik moleküller eksprese eder ve astrositlerin ve Schwann hücrelerinin olumlu özelliklerini bir araya toplar (123). Son dönemde OEG'lerle yapılan implantasyon çalışmalarında in vivo aksonal büyümenin artırıldığı ortaya kondu OEG'ler polimer tüp içerisinde dorsal kök giriş zonuna implante edildiğinde dorsal kök aksonların, kollajen matriks ile birlikte forniks transeksiyonu sonrası implante edildiğinde medial septal nükleusdan kolinerjik aksonların ve lezyon yerine enjekte edildiğinde kortikospinal aksonların rejenerasyonu destekledi (124-126). SSS'de hasarlı alana implantasyonda ümit verici olan

OEG'ler küçük çaplı sempatik aksonlarla temas halinde iken myelin sentezlememelerine rağmen hedef dokunun hacminin artması ile OEG'ler myelinli bir fenotip eksprese etmek için uyarılabilirler (373). OEG transplantasyonunun omurilik yaralanması sonrası aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel iyileşmede önemli bir rolü olduğu gösterildi (374). Bir kontüzyon modelinde geç dönemde OEG transplantasyonu ile beyin sapı motor nukleusundan olan aksonal yeniden büyüme gösterildi (375). Transekte omuriliğin güdükleri içerisine OEG transplantasyonu ile Schwann hücre dolu PAN/PVC tüp implantasyonunun uzun mesafe aksonal rejenerasyonu teşvik ettiği gösterildi (227). Parsiyel transeksiyon çalışmalarında OEG'lerin aksonal rejenerasyondaki etkinliği çok lokalize lezyonlarda gösterilmeye çalışıldı ancak fonksiyonel bir düzelme gözlenmese de aksonların Schwann benzeri myelinle myelinlendiği anlaşıldı. Bir diğer çalışmada Schwann hücrelerle dolu kanallar, omurilik güdükleri arasında bulunan OEG greftler ve glial skarı çözmek için sürekli chondroitinase abc ile birlikte kullanıldığında transeksiyon sonrası fonksiyonel iyileşme belirgin şekilde sağlandı (376).

2.4.3.2.4. Astroblastlar

SSS'ne yabancı hücrelerin implantasyonu ile ortaya çıkabilecek potansiyel engellerden sakınmak ve aksonal yeniden büyümeyi teşvik etmek için büyümeyi teşvik etme kapasitesine sahip astrositler bu tür çalışmalarda kullanıldı. Astrositlerin yaş ve farklılaşma durumunun rejenerasyonda önemli rol oynaması astroblast isimli immatür astrositlerin kullanımına yol açtı (50, 113). Yüksek konsantrasyonlarda astroblast kullanımı ile nörit gelişimini teşvik edici faktörlerin salınımı artar, skar oluşumu baskılanır ve farklı bir formda bir proteaz eksprese edilir (113-115). Değişik formlarda astroblast transplantasyonu ile aksonların kortikospinal lezyondan geçmesinin kolaylaştığı, dorsal kök ve optik sinir liflerinin rejenerasyonunun teşvik edildiği gösterildi (116-119). Transekte postcommisural fornixe astroblast transplantasyonundan sonra hasarlı aksonların migrasyon göstermediği ve aksonların astrositik implanta girmeksizin proksimal ve distal güdükteki sayısının arttığı gözlemlendi (120). İmplant edilen astroblastların büyümeyi uyarıcı etkilerinin olduğu belirlendiyse de skar azaltıcı etkisi tartışmalıdır (120).

Travmatik SSS lezyonlarında aksonal rejenerasyonu kolaylaştırmada astroblastların kullanımı düşünüldüğünde embriyonik birincil hücrelere gereksinimin varlığı ciddi etik ve teknik problemlere yol açmaktadır. Fetal dokuya alternatif olarak sürekli astrositik hücre dizilerinin kullanımı teklif edilmiştir. Bu nedenle SV40 large T antigen isimli genin retrovirüs aracılığıyla

transferi ile fibronektin, laminin, NCAM, TEN ve değişik proteoglikanlar astrositik hücre dizilimleri tarafından ekspresyon sağlandı (121, 122). Tümör oluşturma potansiyellerine rağmen akson gelişimini uyarmada astrosit serilerini kullanmak avantajlı olabilir.

2.4.3.2.5. Mikroglial hücreler

SSS'nin rejenerasyon sürecinde anahtar rol oynadığı düşünölen ve farklı fonksiyonel özelliklere sahip olan mikroglial hücrelerin immünitedeki rolleri dışında dejenerasyon alanından hücresel debrisin uzaklaştırılması ve NGF, thrombospondin ve laminin gibi büyüme faktörlerinin salınması gibi yararlı rolleri vardır. Nöronlarda hasara yol açabilen nörotoksik madde salınımına da sebep olabilir. Deneysel mikroglia tedavisinin sonuçları tartışmalıdır. Mikroglial metabolik aktivitenin baskılanması aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdığı SSS lezyonlarına mikroglia ve makrofaj eklenmesinin rejenerasyon yetersizliğinin üstesinden geldiği belirtilmektedir (127-129).

2.4.3.2.6. Genetik olarak yönlendirilmiş hücreler

Torasik dorsal hemiseksiyon modelinde gelişen kaviteler içine nörotrofik faktör (NGF) sağlamak amacıyla genetik olarak yönlendirilmiş fibroblastlar kollajen jel içerisinde verildiğinde duyu ve serulospinal aksonların greft içerisine geliştiği gözlemlendi (502). NT-3 için yönlendirilen fibroblastlar daha geniş bir lezyona verildiğinde belirgin sensorimotor düzelme kaydedildi. Hasar alanının distalinde ve yukarısında kortikospinal akson gelişiminin olduğu halde greft içerisinde kortikospinal traktus lifleri gözlenmedi ve bu liflerin sadece yaşayan ventral gri cevher içerisine rejenere olduğu gözlemlendi (186). NGF üretmesi için genetik olarak yönlendirilmiş Schwann hücreler travmasız omurilik içerisine verildiğinde 1 yıllık takipte en az 6 ay için etkisinin devam ettiği ve daha fazla sayıda aksone sahip olduğu ve dopaminerjik ve noradrenerjik aksonların 4 ayda belirginleştiği ancak seratonerjik ve kortikospinal trakt liflerinin greftte olmadığı belirtildi (503).

2.4.3.2.7. SSS kaynaklı stem/progenitor hücreler

Bu bölüm anlatılması planlanan hücreler aynı zamanda çalışmada kullanılan kök hücre tipleri olduğu için ilerleyen bölümlerde daha detaylı olarak anlatılacaktır (Bakınız sayfa 40).

2.4.4. Nörit büyümesinde engelleyici olan faktörlerin etkisizleştirilmesi

Akson gelişimini ya da nörit büyümesini engelleyici inhibitör sinyallere aracılık eden en özelleşmiş hücre grubu oligodendrositlerdir. Oligodendrositlerin ve myelinin büyümeyi engelleyici etkisinin hasara cevap esnasında ortaya çıktığı ve rejenerasyonu engellediği MAG'e ilave olarak NI-35 ve NI-250 gibi myelin moleküllerle yapılan bir seri deneyde gösterildi (35, 130, 131). Takiben bu proteinlerin azaltılması ve etkisiz hale getirilmesi için farklı girişimler başlatıldı. Myelinden yoksun genç ratlarda gerçekleştirilen deneylerde yeniden büyüyen kortikospinal ve beyin sapı inen liflerinde belirgin uzama olduğu gözlemlendi (132, 133). Bu çalışmalarda SSS dokusu için myelin proteinlerin en hoşgörüsüz bileşen olduğu ve rejeneratif nörit gelişimi üzerinde aynı zamanda inhibitör olduğu anlaşıldı. Daha sonra myelin proteinler NI-35 ve NI-250'nin büyümeyi inhibe edici hareketlerini etkisizleştirmek için geliştirilen antikorların sürekli uygulanması ile lezyon yerine distal belirgin mesafeler için bir kısım kortikospinal, optik sinir ve septohipokampal filizlerin uzaması sağlandı (36, 37). NT-3'ün birlikte verilmesinin bir takım motor fonksiyonlarda belirgin iyileşme ile uyumlu olarak hasarlı liflerin filizlenmesini kolaylaştırdığı gösterildi (54, 134). Rejenerasyon sürecinde myelinin büyümeyi inhibe edici rolü düşünüldüğünde greftli omurilik çalışmalarında rejenere olan liflerin sadece gri cevher boyunca uzandığı ve beyaz cevhere girmeye çekindiği belirtildi (69, 97). Oligodendrositlerin apoptotik ölümünü tetikleyen transglutaminazın tek enjeksiyonu transekte optik sinirde yapısal ve parsiyel fonksiyonel iyileşme gösterdi (135). NI-35 ve NI-250 karşı antikorla tedavi edilen hayvanlarda rejenere liflerin sayısının oldukça az ve bu liflerin asla lezyon skarını geçmeyi başaramadığı göz önünde tutulmalıdır. Böylece önemli myelin bileşenleri olduğu görülen NI-glikoproteinlerin aksonal projeksiyon alanlarının tanımlanması gereklidir. Herşeye rağmen bu inhibitör moleküller lezyon yerinde akson gelişimini engellemediği için bu moleküllerin nötralizasyonu lezyon yerinde akson rejenerasyonunu başlatan stratejiler için asıl hedef olmayabilir. Myelinin bir diğer bileşeni olan MAG çok fazla ilgi görmüş olsa da MAG geninden yoksun farelerde rejenerasyon başarısızlığından bahsedilse de MAG'ın fizyolojik olarak varlığı in vivo inhibisyon deneyleri için önemlidir (136).

2.4.5. Skarlaşmanın azaltılması

Travmanın yarattığı hasar vücudun diğer organlarında olduğu gibi SSS'de de skar oluşumuna eşlik eder. Normal matür skarlaşma, collagen IV ve lamininden oluşan 2 bağımsız şebeke tarafından oluşan bazal membranın depozisyonu, astrositozis ve fibroblast/makrofaj gibi

mezodermal bileşenlerin kalıcı varlığı ile karakterizedir. Memeli SSS'nin rejenere olma yetersizliği ve lezyon skarı arasındaki ilişkiler uzun ve oldukça tartışmalı hikâyelerden oluşmaktadır. Son zamanlara kadar bu glial-mezodermal sikatrisin hangi yüzünün bariyeri oluşturduğu açık olmadığı için değişik manüplasyonlar uygulanarak skar dokusu azaltılmaya çalışılmıştır. Girişimler lezyon skarının azaltılması ve eksizyonunu, hücresel ya da hücreyel olmayan greftlerle skarın köprülenmesi ve skarın hem gliotik hem de bazal membran bileşeninin değiştirilmesini ihtiva etmektedir. Tarihsel süreçte SSS skarını azaltan en büyük yaklaşım farmakolojik ajanların kullanılmasıdır. Bunlardan ilki omurilikte sikatris oluşumunun natürünü değiştirmek veya azaltmak için bakterial pirojen piromen ve skarın bazal membranının geçirgenliğini artırmak için kollajenaz, tripsin veya elastaz gibi enzimlerin kullanılmasıdır. Bunlar skar oluşumunu değiştirdi ve yeni aksonların filizlenmesini artırdı ise de lezyon çevresinde vasküler bazal membranların kaçınılmaz tekrarlı saldırılara maruz kalması nedeniyle çoğunlukla nörit gelişiminde başarı sağlanamadı. Skar oluşumunu azaltmak için daha yeni olan girişimler X-irradiationun kullanımı ve glukokortikoidler veya TGF- β için antikor uygulanmasıdır. Noninvazif bir yaklaşım olan X-irradiation hücre çoğalmasını engelleyerek skarın gliotik bileşenini azaltır ve lezyon yeri etrafında doku dejenerasyonunu engeller. Transekte omurilikte parçalanmış kortikospinal aksonların onarımı ve fonksiyonel iyileşme sağlandıysa da rejenere olan aksonlar doğru sinaptik bağlantıları oluşturmadı (137, 138). TGF- β 'ye karşı antikorlar veya glukokortikoid ile skarın fibroblastik bileşeninin etkilenmesine rağmen skarı geçen aksonal rejenerasyon gösterilemedi (139, 140). Çalışmaların büyük çoğunluğunda aksonların lezyon yerine kadar filizlendiğini ama lezyon yerinde aniden durduğu gözlenmiştir. Lezyon yerinde bazal membran tarafından bu aksonal tutuklamanın gerçekleştiğini anlamak için düzenlenen bir çalışmada bazal membran depozisyonu kollajen IV'e karşı bir antiserum ve prolilhidroksilazı inhibe etmek suretiyle kolajen fibrillerinin oluşumunu engelleyen bir demir şelatörü dipiridil verildi. Bazal membran oluşumunun azaldığı ve yeterli sayıda lifin lezyon yerini geçtiği, rejenere olan liflerin normal hedefi yeniden innerve ettiği ve yeniden myelinlendirdiği ve normal ileti özelliklerini kazandığı gösterildi (51).

2.4.6. Elektriksel alan uygulamaları

Hem in vivo hem de in vitro sinir sistemi dokusu elektriksel alan uygulamalarına cevap verir. Elektriksel alan uygulamaları in vitro kullanımda nörit filizlenmesinde, büyüme konisinin indüksiyonunda, büyüme konisinin filodopiasının dağılımının değiştirilmesinde, sinir gelişim oranlarını kolaylaştırmada, nörit dallanmasını yönlendirmede ve kolaylaştırmada rol alırken in

vivo nörit gelişimini ve oryantasyonunu, aksonların dallanma miktarında artışı ve aksonal diebackde azalmayı teşvik etmektedir. Her şeye rağmen bu belirgin etkilerin altında yatan hücrel mekanizmalar tamamıyla bilinmemektedir. Birçok çalışmada uygulanan elektriksel alan uygulamalarının nöronal rejenerasyonu teşvik ettiği ortaya konulmuştur. Erişkin ratlarda yapılan çalışmalar yarı kesili omurilik üzerine uygulanan elektrik alanının bir kısım fonksiyonel iyileşmeye yol açtığı gösterildi. Elektriksel alan ile tedavi edilen omurilikler transeksiyon planını geçen rejenere bir takım aksonların çoğunluğunun lezyon çevresinden geçtiği anlaşıldı (141-143).

2.4.7. Kombine stratejiler

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar tek başına gerçekleştirilen yaklaşımların hasarlı SSS traktuslarının fonksiyonel iyileşmesinde ve yapısal rejenerasyonunda yetersiz olduğunu ortaya koymuştur. Çok az skarlaşmanın sağlandığı ve kabul edilebilir bir büyüme çevresinin olduğu şartlar altında bile uzun traktusların bir kısmında gerekli büyümenin oluşmadığı gözlemlendi. Bu da omurilikte travma sonrası anatomik organizasyonun yeniden sağlanması için bir arada kullanılacak stratejilere ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.

Özellikle travma sonrası aksonal büyümenin kapasitesini artırmak için büyümeyi teşvik eden kaynak hücrelerle (Schwann hücreler veya periferik sinir) NTF'ler kombine edildiğinde elde edilen cevaplar nörotrofik faktörlerin tek başına verilmesinden daha iyiydi ve uzun inen yollarda rejeneratif gelişim gösterildi (70, 87, 97). BDNF eksprese etmesi için genetik olarak yönlendirilmiş Schwann hücrelerinin implantasyonu ile beyin sapı nöronlarının rejenerasyonunda belirgin kolaylaşma sağlandı (78).

Lezyon yerinin çevresini değiştirmek için büyümeyi engelleyici moleküllerin antikorları NTF ile birlikte kullanıldığında kortikospinal traktusun rejenerasyonu kolaylaştırıldıysa da omurilikte erişkin hasarlı SSS nöronları üzerinde nörotrofinlerin etkisinin aynı olmadığı ifade edildi (54, 69, 75). NTF'lerin ve büyüme faktörlerinin en uygun bileşimlerinin tanımlanması erişkin SSS'de aksonal rejenerasyonu düzeltmek için faydalı bir strateji olabileceği ifade edilmektedir.

Bir diğer kombine yaklaşım lezyon yerine büyümeyi engelleyen moleküllerin antikorlarını fetal greft ve Schwann hücre implantasyonu ile eş zamanlı uygulamaktır. Fetal greft ve IN1 kombinasyonu lezyon yerini geçen uzun aksonlara rehberlik etmesi için kullanıldıysa da yeniden büyüyen lifler kalan doku köprüleri aracılığıyla lezyon yerini daima geçmeyi başaramadı. Schwann hücre ve IN1 kombinasyonunda kortikospinal traktus rejenerasyonu desteklenmedi (54, 144).

3. Erişkin SSS kaynaklı kök hücreler ve rejenerasyon

Kök hücre tedavisi gibi yaklaşımları içeren rejenerasyonla ilgili çalışmalarda amaç, vücudumuzun tabiatında var olan hücreleri kullanarak hücre, doku ve organları onarmak ve yeniden yaratmak veya geliştirmektir. Günümüzde çok yoğun bir şekilde kök hücrelerin nörolojik hastalıklarda ve yaralanmalarda rejeneratif potansiyeli araştırılmaktadır. Akut travmatik beyin yaralanması, stroke, omurilik yaralanması ve Parkinson-Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar, kök hücre tedavisinin ileride fayda sağlaması muhtemel hastalıklar arasında yer almaktadır. Rejenerasyonun sağlanması ya da kolaylaştırılması yönündeki çalışmalar birçok insan için umut kapısı olmuştur.

Farklılaşmanın olmadığı devrede iken çoğalabilen, in vitro ve in vivo olarak nöron, astrosit ve oligodrositlere dönüşebilen (multipotent) ve kendilerini yenileyebilen nöral kaynaklı kök hücreler embriyonik veya adult beyin ve omurilik dokusundan izole edilebilirler (145, 146, 147). Aynı zamanda bu hücreler blastosist aşamasındaki kültürlerden izole edilerek daha primitif embriyonik kök hücreler olarak deneysel çalışmalarda kullanılabilir.

Hasarlı sinir sisteminin onarımında kullanılan kök hücreler için ideal kaynağın ne olduğuna bakıldığında iki farklı görüş oldukça büyük ilgi görmektedir. Bu görüşlerden ilkinde kök hücrelerin kullanıldıkları bölgeden gelen bir takım uyaranlara cevap olarak uygun fenotipte hücrelere farklılaştıkları diğerinde kök hücrelerin kendi kader ve davranış tarzını kullanacakları lokal çevreye kabul ettirdikleri belirtilmektedir (147). Nöral kaynaklı kök hücrelerin farklılaşmasında SSS'de kullanıldıkları bölgeden çıkan çevresel sinyaller önemlidir. Örneğin hipokampus içine transplante edilen erişkin nöral stem/progenitor hücreler nöronlara farklılaşırken omurilik içine transplante edilen aynı hücreler astrositik yönde farklılaşma gösterir (149). Bu tip kök hücrelerin transplante edildiği bölgeye uygun farklılaşma göstermesi ve alıcı doku içinde var olan devreyle bütünleşmesi bu tip çalışmalarda in vivo ideal çevre olarak tanımlanır. Transplantasyonda kök hücrelerin kaderini kontrol eden lokal çevreye ait uyaranlar kök hücrenin hayatta kalabilme, göç edebilme, yapışma ve kendini yenileyebilme özelliklerini de etkileyebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı transplantasyon çalışmalarında erişkin nöral kök hücrelerin kullanımı embriyonik veya fetal kök hücrelerden daha avantajlıdır. Erişkin nöral kök hücrelerin transplantasyonun tasarlandığı bölgenin hücre tipine daha yakın benzerlik göstermesi, embriyonik kök hücrelere oranla daha az onkojenik potansiyele sahip olması, embriyonik veya fetal kök hücrelerin kullanımı ile ilgili bir takım etik konulardan uzak durması en büyük avantajlarıdır.

Hasarlı beyin ve omuriliğin onarımında erişkin nöral kaynaklı kök hücreler iki şekilde kullanılır. Bunlar endojen stem/progenitor hücrelerin uyarılması ve eksojen transplantasyondur. Birinci uygulamada endojen stem/progenitor ekstrensek uyaranlar ile hücrelerin çoğalması ve farklılaşması sağlanır. SSS lezyonunun onarımında kullanılan eksojen transplantasyon çalışmalarına zıt olarak endojen nöral stem/progenitorlerin uyarılması ile ilgili çok az çalışma vardır. Çalışmaların çoğunluğu nörotrofik ve büyüme faktörlerinin kullanımı ile ilgilidir. Bu hücrelerin normal rolleri, farklılaşma kapasiteleri ve hücrel ve moleküler uyaranlara cevap vermeleri de değerlendirilmektedir. Endojen kök hücre cevabını artırmanın en büyük avantajı eksternal hücre kaynağına olan ihtiyacı azaltmaya çalışmasıdır. Herşeye rağmen travmaya endojen nöral kök hücre cevabı oldukça zayıf olabilir ve eksternal uyaranın artırılması durumunda bile hücre sayısı oldukça düşük olabilir. Ancak endojen nöral stem/progenitor hücrelerin farklılaşmasını sağlamak ve proliferasyonunu artırmak için gerekli moleküler sinyallerin sırasının belirlenmesi ve uygun bir sıra içerisinde verilmesi bu tedavi stratejilerinin artırılmasındaki en büyük engeldir (150).

Transplantasyon çalışmaları hasarın gerçekleştiği alıcı dokuda yeniden farklılaşma ve bütünleşme kapasitesine sahip yeni populasyon hücreleri sunmak suretiyle travmaya bağlı olarak kaybolan nöronal doku ve nörolojik fonksiyonu onarmayı hedefler. Farklılaşmış ya da yönlendirilmiş hücreler travma veya diğer hastalığın bulunduğu alandaki alıcı beyin ve omurilik dokusu ile yeniden bütünleşirler ve hem kaybolan nöronların yerini almak ve hem de yaşamda kalan veya rejenere olan hücreleri desteklemek suretiyle çevre doku ile uygun bağlantılar oluşturur. Transplante edilen kök hücreler alıcı dokunun nöronal yaşamda kalma ve rejenerasyonunu desteklemek için alıcı doku içine nörotrofik veya büyüme faktörlerinin salınmasını sağlar (151, 152). Ayrıca hasarlı alana yerleştirilen transplantların hasarlı nöral doku için kimyasal ve mekanik destek sağlayan bir köprü gibi hareket edecekleri düşünülmektedir. Buna en uygun örneklerden biri de komplet kronik omurilik yaralanmalı kişilerde hasarlı omurilikte ve distal güdükte var olan ve supraspinal merkezlerden bağımsız çalışan santral paternde bir jeneratörün transplante edilen hücrelerle supraspinal mesajların naklini sağlayan istasyon gibi hareket etmesini sağlamaya çalışmaktır. Ayrıca transplantlar yeni nöron, astrosit ve oligodendrosit gibi hücreler, yeni hedefler ve innervasyon kaynakları sağlamak suretiyle hasarlı dokuyu onarmaktadır. Eksojen nöral kaynaklı kök hücre transplantasyonunun dezavantajları sınırlı dokuya sahip olma, immunosupresyona gereksinim duyulması, hücrelerin yaşamda kalma özelliğinin bozulması, kök hücrelerin temin edilmesinde politik ve etik düşünceler ve tümör gelişme riskinin olmasıdır.

3.1. SSS'deki endojen stem/progenitor hücreler ve travmaya cevap

Kendilerini yenileyebilme ve multipotent olma gibi özelliklere sahip nöral kök hücreler embriyonik, fetal ve erişkin memeli beyin ve omurilikte bulunur (145, 146). Erişkin memeliler dışında primat ve insanlarda da bu tür kök hücre kaynağının varlığı gelişmiş canlılarda plastisite kavramını desteklemektedir. Erişkin beyinde lateral ventrikülün subependimal tabakası ve hipokampusun dentat girusu çoğalma ve nörojenik aktivite yeteneğini elinde tutmaktadır (153). Ön-beynin subependiması in vitro nöron ve glia yönünde in vivo rostral yönde olfaktor bulbusa göç eden ve orada nöronlara farklılaşan hızlı şekilde bölünme yeteneğine sahip precursor hücre popülasyonuna sahiptir (154). Erişkin memeli SSS trofik faktörlerle yönlendirilen ve kontrol edilen hem multipotent hem de soy kısıtlı kök hücrelere sahiptir (155-159). Bu potansiyel bir dereceye kadar daha az olmakla birlikte erişkin memeli omuriliğinde de vardır (160). Erişkin omuriliğinde in vitro ve in vivo olarak nestin eksprese eden precursor hücrelerin santral kanal çevresinde bulunduğu ve bu hücrelerin omurilik yaralanma alanına göç ettikleri ve çoğaldıkları ve aynı zamanda travma alanında glial skar dokusuna katkıda bulundukları gösterildi (161). Omurilik gelişimi sırasında nestin + hücreler santral kanalı çevreleyen ependimde bulunur ve doğumdan sonra sessiz bir sürece girer. Herşeye rağmen nestin, stem/progenitor hücreler için spesifik bir marker değildir ve aynı zamanda travma alanında bulunan reaktif astrositlerde de bulunur (157, 162-164). Son olarak omurilikte yer alan kök hücrelerin santral kanala yakın yerlerde bulundukları ve özellikle santral kanal bölgesine yakın yerden izole edildiklerinde multipotent ve kendilerini yenileme özelliklerinin daha belirgin olduğu gösterildi (165, 166). Ancak erişkin rat omurilik santral kanalının daha uzağından elde edilen hücrelerin multipotent ve kendini yenileme özellikleri ependimden elde edilenlere oranla daha zayıf olduğu ifade edildi (167).

Alt vertebralılarda omurilik ependimindeki hücreler çoğalma, göç etme ve farklılaşma özellikleri ile nöronal rejenerasyonda belirgin rollere sahiptir (168, 169). Tam omurilik kesisinde rejenerasyonu sağlamak için bu ependimal hücreler uzun çıkıntılarını kılavuzluk için rejenere santral aksonlara uzatırlar. Daha sonra çoğalan ependimal hücreler daha sonra BOS ile temasa geçerek nöronlara farklılaşır ve rejenere omuriliğe rostral aksonlarını gönderir (170). Canlıların büyük kısmında gelişimin embriyonik ve erken postnatal döneminde görülen yoğun ependimal hücre proliferasyonu postnatal süreçte giderek ve hızlı bir şekilde azalır. İmmatür ve erişkin memelilerde normal ve travmaya maruz kalmış omurilikte ependimal çoğalma ve aktivite vardır. Ancak bu hücrelerin alt vertebra grubundaki kadar rejenerasyonda

faydalı olup olmayacağı bilinmemekte ya da en azından yetersiz olduğu şimdilik kabul edilmelidir (171-174, 183).

Erişkin memeli beyinde lateral ventrikül subependimal hücre tabakası hızlı bir şekilde çoğalma, in vitro glia ve nöronlara farklılaşma ve in vivo rostral olarak olfaktor bulbusa göç etme (ki burada nöronlara farklılaşma eğilimindedir) yeteneğinde precursor hücreler barındırmaktadır. Çoğalma ve farklılaşma yetenekleri büyüme faktörlerinin denetiminde olan bu hücrelerin hasarlı nöronal dokunun yerini almak için yeni hücreler yaratma yeteneği söz konusudur (13, 153, 154, 156-159, 201).

Travmaya cevap olarak ependimal hücre proliferasyonu değişik tip deneysel omurilik travma modellerinde gösterildi (160, 172-174). Erişkin ratlarda multipotent ependimal hücrelerin omurilik yaralanmasının şiddetine göre bölünüp çoğaldığı gösterildi (175-178). Hatta beyin travması, nöbet, transeksiyon, iskemi ve demyelinizasyonda da çoğaldıkları ifade edildi. Travma sonrası bu hücrelerin göç etme ve farklılaşma kapasitesinin lezyonun tipine ve kaynaklandıkları aktif zona bağlı olduğu tanımlandı. Bir beyin travma modelinde subependimal zon ve hipokampus dentat girus subgranüler zonda endojen nöral stem/progenitor hücre proliferasyonunda artma dışında ektopik migrasyon ve multipotansiyel farklılaşma (öncelikle astrosit yönünde) yeteneği ortaya konuldu (175, 179).

Normalde sessiz durumda olan endojen nöral stem hücreler SSS'ne travma sonrası çoğalır ve genellikle ortaya çıkan hücre tipi glial kökenlidir (180, 181). Bu durum santral kanala yakın bir alanda gerçekleştirilen travma modelinde ependimal hücre proliferasyonu, migrasyon ve astrositik fenotipe farklılaşma gözlemlendi (182). Erişkin ratlarda klip kompresyon modelinde gri ve beyaz cevher içerisine ependimal hücrelerin aşırı çoğalması ve sentrifugal migrasyon gösterildi (183). EGF ve FGF2 gibi büyüme faktörlerinin normal ve travmaya maruz kalan ratlarda ependimal hücre proliferasyonunu artırdığı ortaya konuldu (184, 185). Ayrıca orta şiddette klip kompresyon modelinde EGF ve FGF2'in intratekal verimesi küçük ama belirgin nörolojik düzelmeye yol açtı (184).

Erişkin memeli beyin ve omurilikde stem/progenitor hücrelerin travma sonrası çoğalma, migrasyon ve farklılaşma gibi özelliklerinin olmasına rağmen SSS'nin normal hücresel mimarisini yeniden yapılandırma yeteneğinin olmadığı aşîkârdır. Bu sonuçlarla endojen nöral stem/progenitor hücrelerin, nörotrofinlerle veya diğer ajanlarla veya transplante nöral stem/progenitor hücrelerle desteklenmesinin özellikle omurilik ve beyin yaralanmalarının tedavisinde gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

3.2. SSS yaralanmasında kullanılan nörotrofik ve büyüme faktörleri

Hücrelerin yaşamda kalma, bölünme ve farklılaşmasını kontrol eden ve aksonal gelişimi sağlayan nörotrofinlerin büyük kısmını EGF ve FGF2 oluşturmaktadır (4, 186-188). Gelişim sırasında hedef kaynaklı nörotrofik faktörlerin varlığı alıcı nöronlarda apoptosisi engellemekte ve böylece uygun bağlantılar yapmış olan hücrelerin yaşam süresini artırmaktadır (188). Nörotrofik faktörler in vitro olarak axon gelişimi, sinaptik yeniden düzenlenme ve dendritik filizlenme ve nöronal precursorlerin çoğalma ve yaşamda kalmasını sağlar (189). İn vivo NGF, BDNF, NT-3, FGF1 ve FGF2 gibi nörotrofik faktörler erken dönemde sekonder hasar mekanizmalarını engelleyici nöroprotektif ajan olarak kullanılırken geç aşamada aksonal rejenerasyon ve myelinasyon sürecini sağlar (186, 190-193). Erişkin memelilerde omurilik yaralanması sonrası rejenerasyon yetersizliğinde nörotrofik faktörlerin eksikliği vurgulanmaktadır (194). İntratekal FGF2'nun ratlarda omurilik yaralanması sonrası iyileşmeyi artırdığı gösterildi (193). Travma sonrası gen ekspresyonunda artma büyüme faktörlerinin ekspresyonuna yol açabilir (187, 194-197).

Fetal ve erişkin rodent beyninden kaynaklanan stem/progenitor hücreler üzerinde büyüme faktörlerinin etkilerini inceleyen in vitro ve in vivo çalışmaların tersine omurilikte bu hücrelerle büyüme faktörlerinin ilişkisini ortaya koyan çalışmalarda eksiklik vardır (156, 198-200). Erişkin insan omuriliğinde stem/progenitor hücreler üzerinde nörotrofik faktörlerin etkisini inceleyen herhangi bir çalışma yoktur. Travmaya bağlı beyin yaralanmasında beyin subependimal hücrelerinin in vivo cevabı hakkında çok az şey bilinmesine rağmen erişkin subependimal hücrelerin hasarlı nöral dokunun yerini alan yeni hücreler yaratabileceği ve göç edebileceği gösterildi (153, 159). Embriyonik veya erişkin fare beyin striatumdan izole edilen hücrelerin in vitro EGF'e cevap olarak nöron ve gliaya farklılaştığı EGF + FGF2'nin erişkin fare omuriliğinden izole edilen kök hücrelerin in vitro nöron, astrosit ve oligodendrositlere farklılaştığı ve çoğaldığı rapor edildi (201, 202). Bunların tersine in vitro FGF2'nin tek başına erişkin rat omuriliğinde progenitorleri yaratmak için yeterli olduğu ifade edildi (199).

Omurilik yaralanmasında endojen stem/progenitor hücre cevabı artırma amacı ile nörotrofik faktörlerin in vivo kullanımı normal erişkin beyinde yer alan ependimal/subependimal hücrelerle test edildi (156, 184). Erişkin memeli omurilik ependimindeki hücrelerin omurilik travmasından sonra kök hücre gibi davrandıkları ve intratekal EGF ve FGF2'le bu hücrelerin çoğalma ve göçünün kolaylaştığı gözlemlendi. Erişkin fare 4. ventrikülü içerisine EGF ve FGF2 infüzyonunun aynı etkiyi gösterdiği rapor edildi (166). Erişkin normal ya da hasarlı omurilik içerisine transplante edilen pluripotent nöral kök hücrelerin farklılaşmasının esas olarak glial

kökenle sınırlı olduğu görünmektedir (203). Bu durum transplantasyon öncesi hücrelerin nöronal köken doğrultusunda in vitro yönlendirilmesini veya hasarlı omurilikde mevcut olan mikroçevrenin nöronal yönde farklılaşmasının gereğini ortaya koymaktadır.

Normal şartlar altında beyin içine büyüme faktörlerinin infüzyonu SVZ içerisindeki nöral kök hücrelerin proliferasyon, migrasyon ve farklılaşmasını artırmaktadır (156). Patolojik şartlar altında büyüme faktörü infüzyonu ile beyin içerisinde yer alan bu hücrelerin rejeneratif ve onarım mekanizmalarına katılımı sağlanmaktadır. Örneğin transplantasyon öncesi FGF'in tek enjeksiyonu ile SVZ'daki hücreler kullanıma hazır hale gelir ve myelin oluşturma yeteneğini artırır (204). Normal hipokampusta IGF-1 infüzyonunun nöral kök hücre proliferasyon ve nörogenezisini artırdığı patolojik şartlar altında ise IGF-1 ve glia kaynaklı nörotrofik faktörün proliferasyon ve yaşamda kalma kabiliyetini artırdığı gözlemlendi (205). Eritropoietinin fare önbeyninde nöral kök hücreler vasıtasıyla in vivo ve in vitro nöral progenitorlerin üretimini kontrol ettiği belirlendi (206). Nöral kök hücrelerde mitojeni in vitro kaldırmak ya da değişik nörotrofik faktörler eklemek suretiyle nöral kök hücreleri yönlendirmek mümkündür (208). CNTF'in astrosit, PDGF-AA, FGF2, IGF-1, CNTF ve NT-3'ün oligodendrosit ve IGF-1 ve BDNF'in nöronal yönde farklılaşmayı artırdığı gözlemlendi (207, 209-216).

3.3. Kök hücrelerin soyunun belirlenmesinde kontrol mekanizmaları

SSS kök hücrelerinin gelişimsel potansiyelinin ve nöronal soyun belirlenmesinde birkaç kontrol edici mekanizma vardır. Nöronal soya yönlendirmeye karşılık olarak glial progenitorleri yaratma kararı nöronal kök hücre farklılaşması esnasındaki kritik aşamadır ve nörotrofik faktörler bu işlemde önemli rol oynarlar (217). Her bir kök hücre kolonisinin farklılaşması ve çoğalması kültürde monitorize edilebildiği için bu durum bireysel soyun belirlenmesi üzerinde büyüme faktörlerinin uygulanması ile ilgili çalışmalara yol açmıştır. Daha yakın dönemde farklı gen ekspresyonu ile nörogenesis ve gliogenesisin kontrol edilmesine çalışılmıştır. Gen ekspresyonunda hücre içerisindeki değişiklikler ilave edilen nörojenik büyüme faktöründen bağımsız olarak SSS stem/progenitor hücrelerin kaderini etkileyebileceği gösterilmiştir.

Gelişimin farklı aşamalarından gelen nöral kök hücreler çok farklı bir şekilde ekstrasellüler faktörlere cevap verirler. Transmembran reseptör Notch pronöral gen ekspresyonunun inhibisyonu ile gliogenezisi başlatır ve nörogenezisi sonlandırır (218). Pronöral bHLH transkripsiyon faktörleri (Ngn2, Mash1, Math1 ve NeuroD) nörogenezisi kolaylaştırır ve gliogenezisi inhibe eder (219). Notch1 ekspresyonu omurilik yaralanması sonrası erişkin ratta

artar ve nörojenik bHLH faktörleri hasarlı dokuda bulunmayabilir (220). Bu HLH gen ailesi aynı zamanda astrosit proliferasyonuna karışan ve omurilik yaralanması sonrası nöral progenitor subpopulasyonu upregüle eden Id genlerini içermektedir (221). Hes1 ve Hes5 nöroenezisi baskımlarken oligodendrosit farklılaşmasını artırır (219). Nörotrofik faktörlerin değişik bHLH transkripsiyon faktörlerin ekspresyonunun dengesini değiştirmek suretiyle nöronal farklılaşmayı uyardıklarına dair deliller vardır (219). LIF ve Notch sinyal yolları embriyogenezisin başlangıç aşamalarında kök hücrelerin multipotansiyel olma özelliklerini devam ettirir. Buna zıt olarak bu benzer yolların indüksiyonu daha geç gelişimsel aşamalarda nöral kök hücrelerde gliogenesisi uyarır (217). Çelişkili deliller CNTF ve LIF'ın her ikisinin erişkin kök hücrelerde gliogenesisi ve kendini yenileyebilme özelliğini artırdığını göstermektedir (207, 208). Benzer şekilde BMP, SSS gelişiminin erken aşamalarında nöronal farklılaşmayı sağlarken geç aşamalarında astrositik farklılaşmayı kolaylaştırır (222). Daha da ötesi BMP'ler ve noggin erişkin SSS'de nöron ve astrositler arasındaki dengeyi kontrol eder (181). Troid hormon aynı zamanda nöral kök hücrelerin astrositik farklılaşmasını teşvik etmek kadar oligodendrositik fenotipe dönüşüm talimatı da verir (207). Shh erişkin nöral kök hücrelerin çoğalma ve olgunlaşmasını kolaylaştırdığı gösterilen bir diğer morfojendir. Shh agonistin oral uygulanmasının erişkin SVZ ve hipokampusda çoğalmayı sağladığını gösterdi ve bu işleme Gli1 sinyalin artırılması aracılık eder (223).

Bu çalışmalarda nörotrofik faktör, morfojen ve diğer faktörlerin hasarlı beyin ve omurilik içerisine belirli zamanlarda verilebileceği ve transplantasyon öncesi in vitro nöral stem/progenitor hücreleri hazırlamada kullanılabileceği belirtilmektedir. Böyle stratejiler rejenerasyon için gerekli uygun hücre tiplerine farklılaşmayı sağlar ve proliferasyon ve migrasyonu kolaylaştırır. Hem beyin hem de omurilik de farklılaşma öncesi veya sonrası transplante edilen stem/progenitor hücreler ile ilgili çalışmalarda son olarak travma sonrası hangi soyun iyileşmeyi artıracığına dair yayınlanmış çok az delil vardır. Daha da ötesi en uygun farklılaşma yoluna göre beyin ve omuriliğin spesifik bölgeleri içerisinde bölgesel bir spesifiteyi sağlamak mümkün olacaktır.

3.4. Kök hücrelerin kaderinde bölge spesifitesinin önemi

Transplantasyon çalışmalarında nöral kök hücrelerin alıcı dokudaki çevresel uyaranlara reaksiyon verdiği ve buna göre farklılaştığı gösterildi (149, 237). Bir çalışmada erişkin rat omuriliğinden klonal olarak genişletilmiş multipotent progenitorler dentat girusa transplantasyon sonrası nöronal farklılaşma gösterirken bu hücrelerin erişkin omuriliğe

transplantasyon sonrası nörojenik bir potansiyeli olmadığı anlaşıldı. (149). Benzer şekilde erişkin hipokampusundan kaynaklanan stem/progenitor hücreler erişkin ratın rostral migratuar akımına veya SVZ içerisine transplante edildiğinde nöronal farklılaşma göstermesi greftlenen hücrelerin kaderini birincil olarak lokal çevre belirler fikrini desteklemektedir (237). Embriyonik ve erişkin dokudan kaynaklanan nöral kök hücreler striatum ve omurilik gibi erişkin SSS'nin nörojenik olmayan bölgelerine hasarlı ya da normal hayvana transplante edildiklerinde birincil olarak gliaya farklılaşırlar (149, 192, 238, 271). Erişkin omurilik kaynaklı nöral kök hücreler rat servikal dorsal sütun rezeksiyon modelinde kullanıldığında hücrelerin yaşadıkları, astrosit ve oligodendrositlere farklılaştıkları ve hasarlı aksonal yollar boyunca omurilik içerisinde bütünleşme ortaya koydukları gösterildi (228). Bir kortikal lezyondan 6 gün sonra greftlenen embriyonik nöral kök hücreler asıl olarak astrosit ve oligodendrositlere farklılaştı (272). Omurilik kontüzyon yaralanmasından sonra transplante edilen in vitro genişletilmiş fetal nöral progenitor hücrelerin çoğunlukla astrosit olmak üzere çok az sayıda nörona farklılaşması gözlemlendi (239).

Dördüncü ventrikül içerisine injekte edilen embriyonik rat hipokampusu kaynaklı nörosferlerin omurilikte pial yüzeye yapıştığı ve kontüzyon yaralanmalı ratlarda ise bu hücrelerin sadece alıcı omurilik dokusunu ve sinir köklerini işgal ettiği gözlemlendi. Ancak transplante edilen hücrelerde nöronal farklılaşma olmaksızın astrositik farklılaşma gözlemlendi (242). Buna zıt olarak omurilik kontüzyon yaralanmasından birgün sonra intravenöz olarak verilen embriyonik hipokampal nöral kök hücrelerin lezyon yerine göç ettiği ve nöron, astrosit ve oligodendrosite farklılaştığı gösterildi (243). Bu çalışmalar transplante edilen hücrelerin verilme şeklinin aynı zamanda hücrelerin kaderini etkileyebileceğini ortaya koydu.

Kortikal yerleşimli bir beyin travması modelinde korteks ve hipokampus arasındaki yüzeye nöral kök hücre clone C17.2 transplantasyonunda greftlenen hücreler hem nöronlara hem de gliaya farklılaştı ve travmatik beyin yaralanması sonrası motor disfonksiyonu azalttı (268). Nöral kök hücreler aynı zamanda genetik olarak çok özel proteinleri üretmek için in vitro modifiye edildi. Nöral kök hücre C17.2 yapısal olarak NT-3 sekrete etmek için transfekte edildikten sonra servikal omurilik içerisindeki kistik dorsal sütun lezyonlarına greftlendiğinde alıcı doku aksonlarının aşırı büyüme ve intrinsik büyüme faktörü üretiminin arttığı gözlemlendi (273). Nöral kök hücrelerin gen modifikasyonu ile kaderini module etmek için BMP inhibitörü noggin eksprese eden fetal nöral precursor hücreler, lezyonlu omurilik içerisine transplante edildi. Astrositik soya yönelen BMP'nin noggin ekspresyonu ile inhibe olması sonucu transplante edilen hücreler sadece astrositlere değil nöron ve oligodendrositlere farklılaştı (274).

Travmatik SSS'ne transplantasyon ile eşlik eden ve daha öte çalışmalar gerektiren birkaç değişken vardır. Örneğin SSS'de bölge spesifik hücreler (epandimal bölge stem/progenitor hücreler gibi) bölge spesifik olmayan hücrelerle (beyin kaynaklı SVZ hücreler gibi) karşılaştırıldığında daha iyi fonksiyonel sonuç yaratıp yaratmayacağı bilinmemektedir. Ancak bölgesel hücrelerin soy kısıtlı olduklarını ve bölge spesifik hücrelere daha iyi cevap verebileceğini destekleyen bilgiler vardır (275-277). Bu konuda araştırılması gereken bir diğer konu hücrelerin yaşamda kalma süresi, fonksiyonel iyileşme ve travma sonrası interval arasındaki ilişkinin ortaya konulmasıdır. Travmayı takiben kısa bir sonra transplante edilen nöral kök hücrelerin yaşam süreleri ve farklılaşma durumları travma sonrası ortaya çıkan çevrenin akut inflamatuvar cevabı nedeniyle olumsuzdur (278). Ancak çok az sayıda çalışmadan elde edilen bilgi ile travma sonrası kronik dönemde lezyon çevresinde oluşan glial skarın akson rejenerasyonunu engellediği gösterilse de transplante edilen hücrelerin yaşam süresinin subakut ve kronik transplantasyon sonrası arttığı bilinmektedir (279, 280).

3.5. Omurilik ve Beyin Travmasında Nöral Kök Hücreler

SSS travmasının hücre ile replasman tedavisinde nöral kök hücreler aday olarak niçin tercih edildiklerinin pek çok nedeni vardır. İstenilen miktarlarda kültür ortamında üretilmeleri, nöron ya da glia yönünde farklılaşma eğilimleri, değişik nörotrofik faktör üretmeleri, SSS aracılığıyla göç etme ve transplantasyon sonrası çevre hücrelerin fenotipine uyum gösterme yetenekleri, tedavi edici genler ile bu hücrelerin hasarlı alana göçünün sağlanması ve istenilen yönde bu tip kök hücrelerin yönlendirilmesi ve gen ürününün hasarlı alana bırakılabilmesi en önemli avantajlarıdır.

3.6. Nöral kök hücreleri işaretleme ve tanıma

Transplantasyon çalışmalarında transplante edilen hücrelerin kesin olarak tanınması dışında alıcı dokuya uyum sağladıklarının ve orada yaşadıklarının gösterilmesi gereklidir. Transplantasyon sonrası nöral kök hücrelerin in vivo tanınabilmesi onları işaretleyen değişik yöntemler kullanmak suretiyle gerçekleşir. Hücreler transplantasyon öncesi in vitro olarak hücre kompartmanına özel marker ya da reporter genlerle işaretlendikten sonra in vivo kolaylıkla tanınır ya da reporter gen eksprese eden transjenik hayvandan kaynaklanan hücreler transplantasyon sonrası alıcı doku içerisinde kolaylıkla bulunabilir. Kök hücreleri işaretleyen en uygun yaklaşımın tanımlanmasında hücrelerin in vivo olarak işareti eksprese etmesi gerekecek zaman uzunluğu, işareti bulmada kullanılan protokolün diğer analizlerle uyumlu

olup olmadığı, işaretin endojen hücreye transfer olma potansiyeline sahip olup olmadığı ve hücre içerisine sabit bir biçimde katılıp katılmadığı önemlidir (224-226).

3.6.1. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi

Çekirdek, stoplazma ve membran işaretleri veya reporter genlerle kök hücrelerin farklı hücresel kompartmanları in vitro işaretlenebilir. Örneğin çekirdek işaretlemede bisbenzimide (Hoechst) UV floresan ile direk gözlenebilen floresan nükleofilik boyadır. Transplantasyon öncesi hücreleri işaretlemede sıklıkla kullanılan Hoechst ile ilgili en büyük problem boyanın zaman içerisinde alıcı dokudaki hücrelere doğru sızma eğiliminde olmasıdır (227). Kronik greftlemede çekirdeğin boyanması için en iyi seçenek greftlerde uzun süre stabil kalan trityumla işaretlenmiş [^3H]-thymidine ve BrdU kullanımıdır (200, 228). [^3H]-thymidine veya BrdU bölünen hücrelerin DNA'sı içerisine stabil bir biçimde girer ve bütünleşir. Çift olarak immünolojik işaretleme işaretli hücrelerin fenotipini belirlemekte kullanılabilir. Herşeye rağmen greftlenen hücre in vivo bölünmeye devam ederse işaret devam eden proliferasyonla dilüe olacaktır. Aynı zamanda bu tür nükleus işaretlemelemlerinin en büyük dezavantajı hücre morfolojisini gözlemlemede başarısızlıktır.

3.6.2. Stoplazmik işaretler

Stoplazma veya membrana yönelik işaretler kullanıldığında greftlenen hücrelerin morfolojisi ilave immunoboya olmaksızın in vivo olarak tespit edilebilir. Floresan mikrosferler veya boncuklar, floresan boyalar, floro-gold ve altın partiküller ve demir oksit nanopartiküllerden oluşan stoplazmik işaretlerin çoğu endostozis aracılığıyla internalize olur. İnternalizasyon sonrası zaman içerisinde işaretlerin görülebilirliği azalabilir hatta kaybolabilir (226). Latex mikrosferler ve boncuklar, floresan ve rhodamin gibi floresan boyalarla kaplanır ve dissosiyasyon hücreler tarafından kabul edilirler. Floresan mikrosferler ve boncuklar çok kısa süreli çalışmalar için uygundur. Hücre içine girişte belirgin değişkenlik göstermesi dışında boncukların nöral hücre soyuna toksik olması ve debris, ölü hücrelerinde işareti bağlaması ve işaretin alıcının fagositik hücrelerine transfer olması dezavantajlarıdır (224). Kök hücreleri işaretlemede stoplazmik floresan boyalar fast-blue, RDA, carboxyfluorescein ester ve thiol reaktif hücre izleyici probelar kullanılmaktadır. Genel olarak bu boyaların floresan sinyalinin zaman içerisinde azalması veya bozulması nedeniyle kısa dönemli çalışmalarda kullanışlı olduğu bilinmektedir. Fast Blue'nun alıcı hücrelere sızdığı bilinmekte ve in vitro hücresel debrisle bağlantı yaptığı gözlenmektedir (224, 225). Buna zıt olarak RDA, carboxyfluorescein ester ve hücre izleyici probe'lar kültür ortamında yaşayan hücreleri işaretlerler. Cell tracker

probe'lar ve carboxyfluorescein esterlerin türevleri birçok bölünmeden sonra kültür edilmiş hücrelerde alıkonmakta ve boya komşu hücrelere sızmamaktadır. Çünkü boya internalize olur olmaz membranı geçemeyen reaksiyon ürünü yaratmak için modifiye edilmiştir. Ancak CFDA-SE'in aynı zamanda ölü ya da ölmekte olan hücreler tarafından alıkonduğu gözlemlendi. Bu floresan boyalar yüksek konsantrasyonlarda hücrelere toksik olabilirler ve optimal işaretleme parametreleri her tip hücre için tanımlanılmayı gerekli kılmaktadır. Fluoro-Gold nöroanatomi çalışmalarda retrograde tracer olarak sıklıkla kullanılmaktadır ve aynı zamanda transplantasyonda hücreleri işaretlemeye kullanılmıştır. Ancak greftlenen hücrelerde floresan işaretin kaybı ve host hücrelere sızdıkları rapor edilmiştir (229).

Altın partikülleri ile işaretlenmiş dissosiyasyon hücreleri hem ışık hem de EM ile tanımlanma şansına sahiptir. Bu partiküllerin alıcı makrofajlarına transferi söz konusudur (226). Transplante edilen hücreleri uzun dönem takip etmede süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri kullanılmıştır. Bu işaretlemenin en önemli avantajı transplante edilen hücreleri histoloji ve EM'a ilave olarak MRI ile in vivo takip edebilmektir. Herşeye rağmen ölü hücrelerde demir oksit nanopartiküllerinin retansiyonu ile ilgili potansiyel endişe ve fagositik alıcı hücrelere transferi henüz açıklığa kavuşturulmamıştır (230).

3.6.3. Membran İşaretleri

Dil ve PKH26 gibi membran işaretleri oldukça fazla floresan olmaları ve hücre yapılarının görünmesine izin vermeleri gibi nedenlerle kök hücre işaretlemesinde kullanılmaktadır. Dil plazma membranının dış yaprağına geri dönüşümsüz biçimde birleşen ve lateral olarak membran boyunca yayılan carbocyanine lipofilik boyadır. İşaretli hücrenin membranı fiziksel olarak parçalanmadıkça Dil işaretli hücreden işaretli olmayan hücreye transfer edilemez (231). Floresan Dil ışık ve EM ile görüntülenebilir. Dil kısa süreli çalışmalarda greftlenen hücreleri işaretlemeye başarılı bir şekilde kullanılmıştır (224). PKH26 transplantasyon öncesi ve en azından kısa süreli çalışmalarda fetal SVZ hücrelerini işaretlemeye kullanılan Dil'e benzer lipofilik bir kromofordur. Alıcı hücrelere PKH26'nın transferi gözlenilmemiştir. Herşeye rağmen membran işaretleri uzun dönem çalışmalarda membranlar hızlı bir şekilde altüst olduğu için uygun değildir (231). Bu işaretler yüksek konsantrasyonlarda hücrelere toksik olabilir. İn vitro ve in vivo işaretin stabilitesini sağlamak ve farklılaşmış hücrelerde potansiyel toksisiteyi ortaya koymak temeldir. İlave olarak bu işaretler endojen hücrelere transfer edilme potansiyeline sahip oldukları için lizise giden ve ölü transplant kontroller gibi uygun kontroller önemlidir (224). Hem stoplazmik hem de membran işaretleri kullanıldığı zaman alıcıda herhangi bir uygun olmayan işaretin transfer olmasını engellemek için

transplantasyon hücrelerini tamamıyla yıkamak temeldir. Aynı zamanda hücreler kültür ortamında bölündükleri için çekirdek, stoplazma ve membranların işaretleri (reporter genler hariç) giderek dilüe olacaktır ve böylece sinyalin gücünü artırmak için transplantasyon zamanına yakın hücreleri işaretlemek önemlidir.

3.6.4. Reporter Genler

Reporter genlerin kullanımında en büyük avantajlar kök hücre genomu içerisine sabit bir biçimde integre olmaları, endogen hücrelere transfer edilmemeleri, hücre çoğalmasının sonucu dilüsyona gitmemeleri ve sürekli ekspresyon nedeniyle uzun dönem transplantasyon çalışmaları için uygun olmalarıdır. (232). Transplante edilen hücreler en sıklıkla kullanılan lacZ ve EGFP gibi değişik reporter genler tarafından işaretlenebilir. E. Coli enzim β -galactosidase (β -gal)'ı şifreleyen lacZ reporter genler, histokimyasal X-gal reaksiyonu (hem ışık ve hem de EM'de görülebilir) ve immünhistokimyasal anti- β -gal antikoları ile bulunma şansına sahiptir. Memeli SSS'i endojen β -gal aktivitesine sahip olduğu için bir dezavantaja sahiptir. Histokimyasal olarak endojen host hücrelerin boyanmasını engellemek gereklidir (233). Aynı zamanda nonspesifik bir boyanmayı ayırt etmek için uygun kontrollerin kullanılması gereklidir. EGFP kullanımının avantajları kullanılan floresanın kolaylıkla bulunması, immünhistokimyasal olarak sinyal gücün artırılabilmesi ve hem kültür ve hem de fikse olduğu hücrelerde bulunabilmesidir. GFP eksprese eden hücreler floresan ile aktif hücre ayırma yöntemi kullanan diğer işaretlerle ayırt edilebilir veya zenginleştirilebilir.

Reporter genler daha sıklıkla kök hücre içerisine viral vektörle infeksiyon aracılığıyla verilebilir. Replikasyondan yoksun retroviral vektörler çok sıklıkla kullanılsa da sadece kök hücre ile ilgili bir sorun yaratmayacak şekilde bölünen hücreleri enfekte eder. Aksi taktirde adenoviral ve lentiviral vektörler postmitotik hücreleri enfekte eder. Reporter gen ile ilgili ürünün bulunması transplante edilen hücrelerde transjenin sürekli ve stabil salınımı ile ilgilidir. Transplante edilen hücrelerde reporter gen ekspresyonunun major dezavantajı zaman içerisinde belirgin bir şekilde azalmasıdır (224, 228). Bu durum özellikle LacZ ile yapılan çalışmalarda daha belirgindir. EGFP eksprese eden erişkin ratların omuriliğinden yaratılan stem/progenitor hücrelerin normal ve travmaya maruz kalan hayvanlara transplantasyonu sonrası hücrelerin birkaç hafta floresanslarını devam ettirdikleri gözlemlendi ve hücrelerin farklılaşmasını ve göç etmesini göstermede EGFP'nin kullanışlı olduğu belirtildi (150).

Transplante edilen hücre transjenik hayvandan elde edildiği zaman reporter gen ürünü kolaylıkla bulunabilir ve in vivo greftlenen hücreler içerisinde transjenin sürekli salınımına izin verir. EGFP eksprese eden transjenik hayvanlar ve yapıcı hücreye özel ve indüklenebilir

promoterların kontrolü altındaki diğer reporter genler gelişmeye devam eder. Transplante edilen hücrelerin intrinsik işaretleri aynı zamanda allogreft, ksenogreft ve cinsiyete özel greftlerin kullanıldığı durumlarda kolaylıkla alıcı dokuda bulunurlar (234, 235). Özet olarak transplantasyon öncesi nöral stem/progenitor hücreleri işaretlemeye en uygun yaklaşımı tanımlamak birçok faktöre bağlıdır ancak işaretleme in vivo greftlenen hücrelerin izlenmesi ve kesin tanımı için temeldir. Yukarıda belirttiğimiz gibi işaretlerle ilgili bir takım sınırlamaların olması nedeniyle, çalışmalarda işaretin bulunmasını en üst düzeyde sağlayan bir işaretleme yöntemini kullanmaya hatta bir başkası ile onu tekrar kontrol etme yolunu seçmeliyiz.

3.7. SSS'ne nöral kök hücrelerin transplantasyonu

Hasarlı omurilik ve beyin dokusu içerisine nöral kaynaklı kök hücre transplantasyonunun etkinliği, transplante edilen hücrelerin yaşam süresini en yüksek düzeyde tutacak ve travma sonrası gelişen lezyon alanını en çok daraltacak greftleme metoduna bağlıdır. Ancak SSS'ne yapılacak greftlemenin mekanik olarak transplante edilen hücrelerin yaşam süresini kısaltabileceği ve lezyon yerindeki mevcut durumu daha da kötüleştirebileceği unutulmamalıdır. Bu greftleme işlemini optimum hale getirmek için birçok konunun düşünülmesi gerekir (150).

3.7.1. Nöral Kök Hücrenin Yaşama Kabiliyeti

İlk olarak transplantasyon öncesi kök hücrelerin mükemmel bir yaşama kabiliyetine sahip olmalarını temin etmek gereklidir. Yaşama kabiliyeti rutin olarak trypan blue'nun dışarıda bırakılması veya propidium iodide ile tayin edilir. Tek hücre süspansiyonları bir hücre sayımı almak için hemositometrede sayılır ve trypan blue boyası kullanarak yaşama kabiliyetine bakılır. Yaşayan hücreler boyayı dışarıda bırakır ve parlak fazda görülürken ölü hücreler boyayı alır ve koyu mavi görünür. Yaşama kabiliyeti aynı zamanda tek hücre süspansiyonlarına eklenen ve membranları tehlikede olan hücreler tarafından alınan floresan propidium iodide ile tanımlanabilir. Bu nedenle yaşayan hücreler boyayı tutmaz ve işaretsiz kalırken ölü hücreler boyayı tutar ve rhodamine filtre altında kırmızı floresan ortaya koyar (150).

3.7.2. Verilme yolları

Nöral stem/progenitor hücrelerle transplantasyon çalışmalarının büyük çoğunluğu SSS içerisine intraparaknimal ya da direk enjeksiyon ile yapılmaktadır (236, 237). Birkaç travma modelinde hücrelerin faydalı olma potansiyelini daha da artırmak ve hasar alanına komşu bir yerde olmalarını sağlamak için bu hücreler lezyon kavitesi içerisine direk olarak, lezyona komşu veya lezyona yakın greftlenir (192, 238, 239). İlave olarak nöral kök hücrelerin diğer kök hücrelere benzer şekilde alıcı beyin ve omurilik komşu hasarlı bölgesine göç edebildikleri gösterilmektedir (237, 240). Örneğin, kemik iliği stroma kaynaklı hücreler sistemik uygulama sonrası beyin ve omurilik içerisindeki hasarlı alana göç etmektedir ancak enjekte edilen hücrelerin küçük bir kısmı hasarlı hedef zona ulaşmaktadır (230, 240, 241). Kök hücreler aynı zamanda intraventriküler, intratekal ve intravenöz olarak verilebilir. Fetal GFP ratın hipokampusundan kaynaklanan nöral stem/progenitor hücreler 4. ventrikül içerisine enjekte edilerek omuriliğin subaraknoid mesafesine taşındı ve hücre kümeleri halinde omuriliğin hasarlı yüzeyine bağlandılar (242). Vasküler sistem aracılığıyla kök hücrelerin verilmesi kullanılan metoda bağlı olarak tüm organlara veya sınırlı hedeflere hücrelerin potansiyel girişine izin verir. Karotid arter veya femoral, juguler ve kuyruk venleri kök hücreleri vasküler sistem içerisine vermek için tüm olası potansiyel yerlerdir. En uygun ve en az invazif olan kuyruk veninin kullanımıdır. Kemik iliği stromal kök hücreler ve embriyonik kök hücreler gibi kök hücreler (özellikle nöral kök hücrelerle) sistemik olarak verildiklerinde SSS içerisinde hasarlı alana göç etme potansiyeline sahiptirler (230, 240, 241). Transjenik ratın embriyonik hipokampusundan kaynaklanan nöral progenitor hücreler kontüzyon travmasından 1 gün sonra intravenöz olarak transplante edildi ve lezyon yerine migrasyon gösterdikleri, orada yaşadıkları ve hücrelerin farklılaştıkları gösterildi (243). Parsiyel servikal hemiseksiyon yaralanması ile ilgili son çalışmada intravenöz, intraventriküler ve lomber ponksiyon aralığıyla intratekal uygulamalarla embriyonik rat dokusundan kaynaklanan soy kısıtlamalı nöral precursor hücreler ve kemik iliği stromal kök hücreler omurilikteki hasarlı alana göç ettiği gösterildi (240). Kök hücrelerin verilmesinde intratekal lomber ponksiyon ve intraventriküler yolların kullanımının intravenöz yoldan daha etkili bir biçimde hasarlı omurilik içerisine bırakıldığı gösterildi (240).

3.7.3. Greftleme parametreleri

Beyin ve omurilik içerisine transplantasyon sırasında hayvan stereotaksik çerçeve içerisinde emniyetli bir şekilde pozisyona alınmalıdır. Hücreler enjekte edileceği zaman greftlemenin yaratacağı lezyonun boyutu minimal düzeyde tutmalıdır. Küçük çaplı mikropipet veya küçük numaralı iğne kullanımı host dokulara hasarın boyutunu azaltacaktır. Herşeye rağmen bu

durum aynı zamanda ayrıştırılmış hücre süspansiyonları ve sağlam nörosferlerin transplante edilip edilmediğine bağlıdır. Hücreler verildiklerinde iğnenin tıkanmasını engellemek önemlidir. Ayrıca greftlenen kök hücrenin hacmi ve enjekte edilen nörosferin ortalama hacminin tanımlanması gerekmektedir. Doku içerisine daha iyi penetrasyon için mikropipet uçlarına işlemler yapılabilir. İğneler benzer amaçlar için isteğe bağlı olarak eğilebilir ya da şekillendirilebilir. Genel olarak hücreleri ve nörosferleri enjekte etmenin en iyi yolu, sabit bir hacimde sabit bir oranda belirli bir zaman sürecinde yavaşça vermektir. Bunu sağlamanın veya başarmanın en iyi yollarından birisi motorize enjektör pompalarını kullanmaktır. Eğer hücreler hızlı bir şekilde transplante edilirse mikropipet ve iğne trasesi boyunca dışarı sızabilir. Transplante edilen hücrelerin hacmi transplant yerinin hacmine bağlıdır. Yine de hem beyin hem de omurilik içerisine olası en küçük hacmi enjekte etmek en yararlısıdır. Ortalama 0,5–5 µl hacimler sıklıkla kullanılır. Hücre yoğunluğu ve transplante edilen toplam hücre sayısı greftleme için yeterli olacak hücre sayısı ve en iyi yaşam süresinin temin edilmesini gerektirmektedir. Hücreler enjekte edildikten sonra mikropipet ve iğne uçları geri çekilmeden önce (herhangi bir geri kaçışı önlemek için) en az 2 dakika aynı pozisyonda bekletilmeyi gerektirmektedir. Siklosporin gibi bağışıklığı baskılayıcı ajanlar hücrelerin yaşamda kalma şansı üzerinde greft rejeksiyonunun boyutunun bilinmediği sinjenik transplantasyon durumlarında bile sıklıkla kullanılmaktadır. Allogreft ve ksenogreft transplantasyonda alıcı dokunun bağışıklık sisteminin baskılanması greftlenen hücrenin tipine bağlı olarak tartışmalı olsa bile genellikle gereklidir (244, 245).

3.8. Nöral kök hücrelerle ilgili deneysel ve klinik çalışmalar

Nöral stem/progenitor hücreler travma sonucu kaybedilen SSS fonksiyonunun yeniden oluşturulmasında tedavi edici potansiyele sahiptir. Nöral kök hücreler multipotent olma özelliklerini kaybetmeksizin kültür ortamında çoğaltılabilirler. SSS'ne geri transplante edildikleri zaman göç etme, alıcı dokuya uyum gösterme ve farklılaşma için lokal çevreye uygun cevap verme kapasitesine sahiptir. Omurilik ve beyin yaralanması ile ilgili hayvan modellerinde transplantasyonda kullanılacak nöral kök hücrelerin kültüre edilmesi ile ilgili daha etkili metodların geliştirilmesinde belirgin bir ilerleme sağlanmıştır.

Embriyonik SSS doku transplantları erişkin memeli beyin ve omuriliğine uyum sağlar (200, 242, 246-249) ve travmatik veya dejeneratif lezyonlar sonrası fonksiyonel iyileşmeyi kolaylaştırır (239, 250-252). Omurilik travması sonrası erişkin memeli omuriliği içerisine erişkin memeli omurilik kaynaklı kök hücrelerin transplantasyonu sadece birkaç kez

uygulanmıştır. Erişkin rat omuriliğinden klonal olarak genişletilmiş multipotent progenitorlerin normal erişkin omurilik ve hipokampusuna greftlenmesini takiben bu hücrelerin bölgeye özel farklılaşmaya gittikleri belirtildi (149). Nöral kök hücreler ile dolu ve normal omurilik yapısına benzetilen iskelet ile oluşturulmuş yapının implantasyonu sonrası ratta omurilik yaralanması sonrası fonksiyonel iyileşmenin varlığı gösterildi (253). Bir diğer çalışmada ise bu hücrelerin omurilik içindeki hasarlı aksonal yollar boyunca yaşadıkları, farklılaştıkları ve omurilikle bütünleştikleri gözlemlendi (228).

İnsanlarda beyin ve omurilikte tanımlanmış kök hücreler diğer türlerdeki gibi mitojenik uyarılmaya cevap verir (254-256). Erişkin insan subkortikal progenitorleri rat beynindeki deymyeline lezyonlara transplante edildiğinde oligodendrositlere farklılaşırlar ve yaşarlar (257, 258). Erişkin insan beyni kaynaklı klonal nöral precursor hücreler erişkin omurilik deymeline alanlarına (x-radyasyon ve ethidium bromide ile yaratılan) transplantasyonunda ise periferik myelin ile birlikte aşırı remyelinasyon gösterildi (259). Son olarak insan embriyonik karsinoma hücre diziliminden kaynaklanan kültüre insan nöronal hücreleri immeli hastaların beynine transplante edildi (260, 261). Her ne kadar transplante edilen hücrelerin uzun dönem yaşam süresi rapor edilmişse de klinik düzelme ile ilgili bir delil ortaya konulmamıştır.

İnsan omurilik yaralanması ile ilgili olarak omurilik yaralanmalı ve diğer myelopatili hastalarda hasarlı omurilik içerisine direk olarak hücre ve doku transplantasyonu ile ilgili birkaç Faz 1 çalışma vardır. Fetal insan omurilik dokusu posttravmatik siringomyeli az sayıda hastaya transplante edilmiştir (262). Herşeye rağmen hücrelerin uzun dönem yaşam süreleri ve hastalar üzerinde olumlu etkileri hakkında belirgin deliller yoktur. İnsan omurilik travmasında SSS kaynaklı nöral kök hücre ile ilgili tek kök hücre çalışması az sayıda hastanın omuriliğinin içerisine verilen domuz kaynaklı kök hücrelerin heterotransplantasyonudur. Ancak uzun dönem klinik sonuç ve yararı ve hücrelerin yaşam süresini gösteren bir rapor şu ana kadar yoktur (150). En az iki ülke omurilik travmalı insanlara otolog OEG hücrelerle transplantasyonlar yapmaya devam etmektedir ancak bilindiği gibi bunlar stem/progenitor hücre değildir (263). Fetal insan beyni kaynaklı nöral kök hücreler travmatik beyin ve omurilik yaralanmalı ratların omurilik ve beyinine transplante edildi ve kolinerjik nöronal fenotipe sahip olmak suretiyle bölge spesifik tarzda farklılaştılar (264). Erişkin insan omurilik kök hücreleri laboratuvar hayvanlarına ve insanlara şimdiye kadar transplante edilmedi (150). Ancak Tator laboratuvarında erişkin insan kaynaklı kök hücreler kültüre edilmesi ve çoğaltılması yönünde bir çalışmaya ilaveye olarak rat omurilik travmasında olası yararlı etkilerini ortaya koyan çalışmalar devam etmektedir.

3.9. SSS kaynaklı olmayan kök hücrelerle ilgili klinik çalışmalar

Nörotravmada nöral kaynaklı olmayan stem/progenitor hücrelerin insanlarda kullanımı ile ilgili çalışmalar oldukça fazladır. Bu çalışmaların büyük kısmı beyin ya da omurilik kaynaklı kök hücre olarak düşünülmeyen OEG'ler ile gerçekleştirilmiştir. Olfaktor epitelyum olfaktor his nöronlarının rejenerasyonu için daha önceden hazır durumda hücreler ihtiva eder. Olfaktor bulbusun glial yapısı hem Schwann hem de oligodendroglia benzeri hücreleri yaratma potansiyeline sahiptir ve in vitro çoğaltılabilmektedir. Son zamanlarda Çin, Portekiz ve Avustralya'da otolog OEG hücreler ile ilgili transplantasyonlar gerçekleştirilmekte ise de bu hücrelerle ilgili deneyimlerini aktaran bilimsel bir yayın yoktur. Otolog kemik iliği kaynaklı kök hücreler özellikle Çek cumhuriyetinde omurilik travmalı ve ALS'li hastaların omuriliğine intravenöz yolla verildi (265). İsveç ve Amerika'da çok az sayıda siringomyelili hastaya transplante edilen fetal omurilik segmentleri ile ilgili sonuçlar kök hücrelerin yaşam süresi ve yaşamda kalma yeteneği ve olası olumlu etkileri hakkında yeterli bilgi vermiyordu (262, 266). Ayrıca omurilik ve beyin travmalı ve inmeli hastalara veya hayvanlara insan kaynaklı hücre gruplarına benzeyen değişik progenitorlerin transplantasyonu ile ilgili birtakım çalışmalar vardır. Örneğin insan teratokarsinomlarından elde edilen nöronlar omurilik ya da beyin travmalı ratlara ve inmeli hastaların beyinine direk olarak verildi (267-269). İnsan umbilikal kord kanından yaratılan kök hücreler omurilik yaralanmalı ratlara verildi (270). Fetal domuz omuriliğinden kaynaklanan kök hücreler Amerika'da omurilik yaralanmalı hastalara verildiyse de bilimsel literatürde bu yönde bir rapor henüz yoktur. Fetal insan serebral korteksi kaynaklı kök hücrelerle yoğun bir şekilde gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda omurilik ve beyin dokusu içerisine implantasyon sonrası etkileyici yaşam süresi ve farklılaşma ortaya kondu ise de bilgilerimize göre şu ana kadar omurilik ve beyin travmalı insanlara transplante edilen hücre yoktur (264).

3.10. Nöral kök hücrelerin implantasyonunda biyomateriyallerin yeri

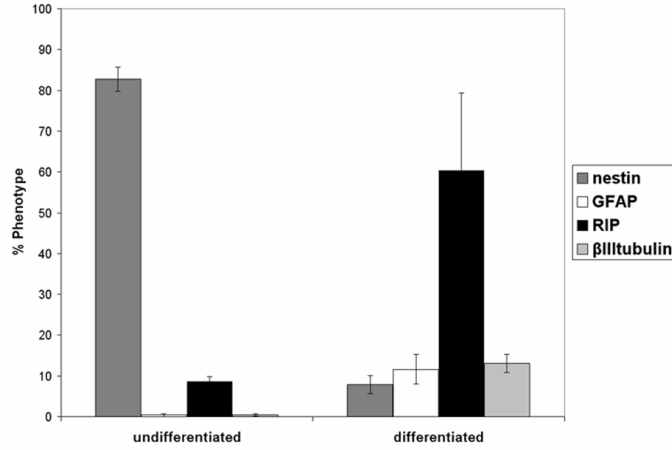
Son zamanlarda doku mühendisliği teknikleri SSS travması sonrası hasarlı nöral doku içerisine nöral stem/progenitor hücreleri transplante etmek için kullanılmıştır. Biyomateriyaller alanında en ilginç stratejilerden birisi hasarlı SSS içerisine nöral stem/progenitor hücrelerle ekili sentetik 3 boyutlu biyobozulabilir çatıların yerleştirilmesidir. Hasarlı SSS'nin onarılmasında kullanılan nöral stem/progenitor hücrelerle ekili yapay 3 boyutlu çatılar, lezyon yerinde aksonal yeniden büyüme, köprü oluşturulmasını ve böylece büyük nöral defektleri kapatma yeteneğinde hücreler için bir platform oluşturulmasını sağlamaktadır (281-284).

Yapay çatıların kullanımı aynı zamanda nöral doku implantasyonu ile aksonal rejenerasyonu kolaylaştıran tedavi edici stratejilerin kombinasyonuna izin verdiği için yararlıdır (285-288). Aynı zamanda bu çatılar nöral stem/progenitor hücrelerin diferansiye olmalarını teşvik edebilir. Örneğin kollajen jelin nöral stem/progenitor hücreler için etkin bir ekstrasellüler matriks olduğu anlaşıldı (377). Hasarlı omurilik içine transplantasyon sonrası aljinat süngerin rat hipokampus kaynaklı nörosferlerin diferansiyasyonuna ve yaşamda kalma süresine katkıda bulunduğu gösterildi (305). PGA, PLA ve bunların kopolimerleri gibi yapay biyotoksik olmayan biyobozulabilir polimerlerden yapılan yapay çatıların nöral stem/progenitor hücre transplantasyonunda bir arada kullanılma potansiyeline sahip olduğu gösterildi (289). Fare nöral stem/progenitor hücrelerle ekili bir PLGA çatının rat omurilik hemiseksiyon alanına implantasyonu sonrası fonksiyonel iyileşme dışında transplante edilen yerde alıcı dokunun aksonlarında yeniden büyümenin teşvik edildiği, astrogliozis ve travma sonrası gelişen kistik yapının engellenebileceği gösterildi (253). SSS içerisine transplante edilen nöral stem/progenitor hücrelerin birkaç nörotrofik faktörü sekrete etmek suretiyle alıcı dokuda aksonal yeniden büyümenin teşvik edildiği (273) ve insan embriyonik kök hücrelerinin 3 boyutlu PLGA çatılarda farklılaşabilecekleri gösterildi (292). İlave olarak hipoksik beyin yaralanması sonrası gelişen masif doku defekti içerisine fare nöral stem/progenitor hücrelerle ekili PGA temelli çatıların implantasyonunun belirgin şekilde parankimal kaybı azalttığı ve alıcı ve verici kaynaklı nöronlar arasında nöronal ağın oluşmasında kolaylık sağladığı gösterildi (290). Aynı zamanda fibröz PLLA'nın in vitro nöral stem/progenitor hücre taşıyıcı potansiyeli olduğu anlaşıldı (291). Yapay bir nanofiber çatının fare nöral stem/progenitor hücreleri nöronlara farklılaştırabileceği ve astrosit gelişimini önleyebileceği rapor edildi (291, 378). Nörotrofik faktörlerle kombine edilen çatılar nöral stem/progenitor hücrelerin farklılaşmasına neden olmaktadır (292). Ancak erişkin nöral stem/progenitor hücrelerin ekildiği sert ama bozulabilir çatı implantasyonu ile ilgili bir rapor yoktur. Nöral stem/progenitor hücreler gelecek için büyük ümit taşıırken onlar için belirlenen risk ise arzu edilmeyen hücre ve doku kitlelerinin çoğalmasına eşlik edebilen proliferasyon ve multipotansiyelite yetenekleridir. Biyomateryallerin differansiyasyonu teşvik etmeleri için kullanımı heyecan vericidir.

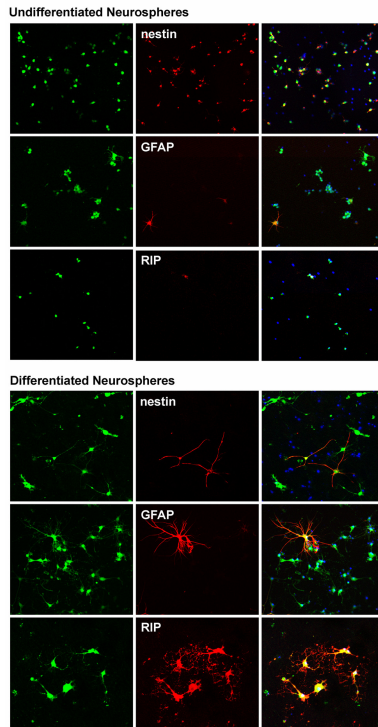
4. Gereç ve Yöntem

4.1. Erişkin omurilik kaynaklı nöral stem/progenitor hücrelerin hazırlanması ve nörosferlerin karakterizasyonu

Omurilik kaynaklı erişkin nöral stem/progenitor hücreler, eGFP eksprese eden erişkin erkek Wistar ratların (tür; Wistar-TgN (CAG-GFP)184ys, Dr. A. Keating laboratuvarında geliştirilen, Toronto, Kanada, 280-340g) omuriliğinin ependimal bölgesinden elde edildi. Transjenik ratlar orijinal olarak Japonya, Tochigi, Utsunomiya, YS Institute Incoorporationdan temin edildi. Omurilikler rattan çıkarıldıktan sonra %30 glukoz desteklenmiş Dulbecco'nun phosphate-buffered saline (DPBS) solusyonunda yıkandı. Daha sonra doku segmentleri Martens ve arkadaşları (166) tarafından ortaya konulan metod modifiye edilerek omurilik santral kanalının hemen çevresindeki birbiriyle çok yakın ilişkide bulunan ve ependimal ve subependimal bölgeyi ihtiva eden servikal omurilikden izole edildi. Bu doku segmentlerinin üzerinde uzanan kan damarları ve meninksler eksize edildi. EGF ve FGF2 ihtiva eden vasata inkübasyonu takiben enzimatik ve mekanik ayırma gerçekleştirildi. Hücreler kimyasal olarak tanımlanmış serum serbest vasat içerisinde yeniden bekletildi. Sferler 80–300 nörosfer/μl konsantrasyonlarda bekletildikten sonra her μl'de nörosfer sayısı hemasitometrede belirlendi ve yaşayabilirlikleri trypan blue ile tahmin edildi. Her nörosferde yaşayan hücrelerin ortalama sayısının pasaj numarası ve in vitro gün sayısı ile değiştiği gözlemlendi. Kullandığımız hücrelerin tamamı pasaj 2–4 ve in vitro 5–7 günlerde transplante edildi. Her sferde 348 ± 303 yaşayan hücre vardı. Bir kısım hücreler bu işlem sırasında öldü ve bu nedenle ortalama hücrenin yaşamda kalma süresi her bir pasaj ve in vitro günde ($\% 6,5 \pm 4,9$) sağlam nörosferlerin ortalama olarak propidium iodide boyası ile boyanma yüzdesi kullanılmak suretiyle tanımlandı. Enjekte edilen yaşayan hücre sayısı, bir örnekteki nörosferlerin sayısını hesaplamak suretiyle tanımlandı ve in vitro şu pasaj ve günde her bir nörosferde yaşayan ortalama hücre sayısı ile daha önce elde edilen nörosfer sayısının çarpılması ile elde edildi. Hücrenin yaşamda kalma süresi semikantitatif bir metod ile gerçekleştirildi. Enjekte edilen yaşayan hücre sayısı her nörosferde yaşayan hücre sayısının daha önceki ölçümünü (nörosferlerin PI boyanma ortalamalarını ve birkaç pasajda ve in vitro günde her nörosferde ortalama hücre sayısını) kullanmak suretiyle tahmin edildi. İn vitro ayırma ve immunofenotiplendirme sonrası bir nörosferden kaynaklanan ortalama hücre sayısı undiferansiye durumda nestin için $\% 83$, GFAP için $\% 1$, RIP için $\% 9$, β III tubulin için $\% 1$ iken differansiye durumda nestin için $\% 8$, GFAP için $\% 10$, RIP için $\% 59$, β III tubulin için $\% 12$ immünopozitif olarak hesaplanıldı (Şekil 1, Şekil 2).



Şekil 1. GFP+ transjenik ratlardan elde edilen erişkin omurilik kaynaklı nöral nörosferlerin [stem/progenitor (kök) hücre] in vivo aşamada kullanılmadan önce bir seri in vitro süreçten geçtikten sonraki astrosit, oligodendrosit ve nöron yönünde farklılaşmış ya da farklılaşmamış durumdaki yüzdelarını göstermektedir.



Şekil 2. GFP+ transjenik ratlardan elde edilen erişkin omurilik kaynaklı nöral nörosferlerin in vitro aşamada konfokal mikroskop ile elde edilen resimlerini göstermektedir.

4.2. Chitosan tüplerin hazırlanması

Chitosan tüpler literatürde daha önce tanımlandığı gibi küçük değişikliklerle hazırlandı (312). Kısaca tanımlamak gerekirse; 5g chitosan chloride (Protosan UP CL213, NovaMatrix,

Brakeroya, Drammen, Norway) 500 ml distile suda çözüldükten sonra 40 ml %4'lük NaOH ile çöktürüldü. Çöken chitosan parçalar filtre edildi ve nötrleşene kadar distile su ile birkaç kez durulandı. Freeze drying sonrası chitosan solüsyonu %2'lik asetik asit içinde %3'lük solüsyonuna dönüştürüldü. Daha sonra bu solüsyondan 2,5 ml etanol ile karıştırıldı ve 4°C'de depolandı. Tüpler 15cm uzunlukta silindirik cam moldlarda hazırlandı (daha geniş bir tüp içerisine (iç çap=5mm) daha küçük boyutta (2mm) cam rodlar yerleştirmek suretiyle). Chitin tüplerini oluşturmak için 67µl asetik anhidrid 4ml chitosan solüsyonuna eklendi, vortex edildi, hava balonlarını çıkarmak için vakumlandı ve daha sonra dış çapı 2mm olan 27cm uzunlukta bir paslanmaz çelik rod ile içinden delik açılmış iç çapı 5mm olan 15cm uzunlukta büyük cam mold içerisine enjekte edildi. Inner rodun her 2 ucu rubber scepta ile fiks edildi. Enjeksiyon sonrası cam moldun chitosanın chitin hidrojeline dönüşümüne izin vermek için 24 saat tutulduktan sonra jel olan chitin tüpler core's molddan çıkarıldı ve ürünün üzerindeki fazla asetik asiti çıkarmak için sonraki 24 saat için distile suda yıkandı. Chitin tüpler daha sonra 2mm cam tüplerden çıkarıldı. 1.6mm cam tüplere yerleştirilerek chitini tekrar chitosana dönüştürmek için %28,6 NaOH ile deasetile edildi. Deasetilasyon için tüpler 110°C'de her biri 2 saat olmak üzere 3 kez ısıtıldı ve deasetilasyonun her bir siklusu arasında distile su ile yıkandı. Chitosan tüplerin deasetilasyon derecesinin %89 olduğu ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy ile gösterildi (504). Chitosan tüpler pH=7 olana kadar distile su ile yıkandı ve 1.6mm molddan çıkarıldı ve yeniden boyutlandırmak için 1.45mm mold içerisine yerleştirildi. Tüpler yaklaşık 1 saat havada kurutuldu ve daha sonra molddan çıkarmadan önce tekrar rehidrate edildi ve steel core'dan çıkarılarak 6mm uzunluklarda kesildi ve kurutuldu. Tüplerin yaklaşık olarak dış çapı 1.8mm ve duvar kalınlığı 0.2mm idi. Tüpler implantasyon öncesi etilen oksid ile gazda ile steril edildi.

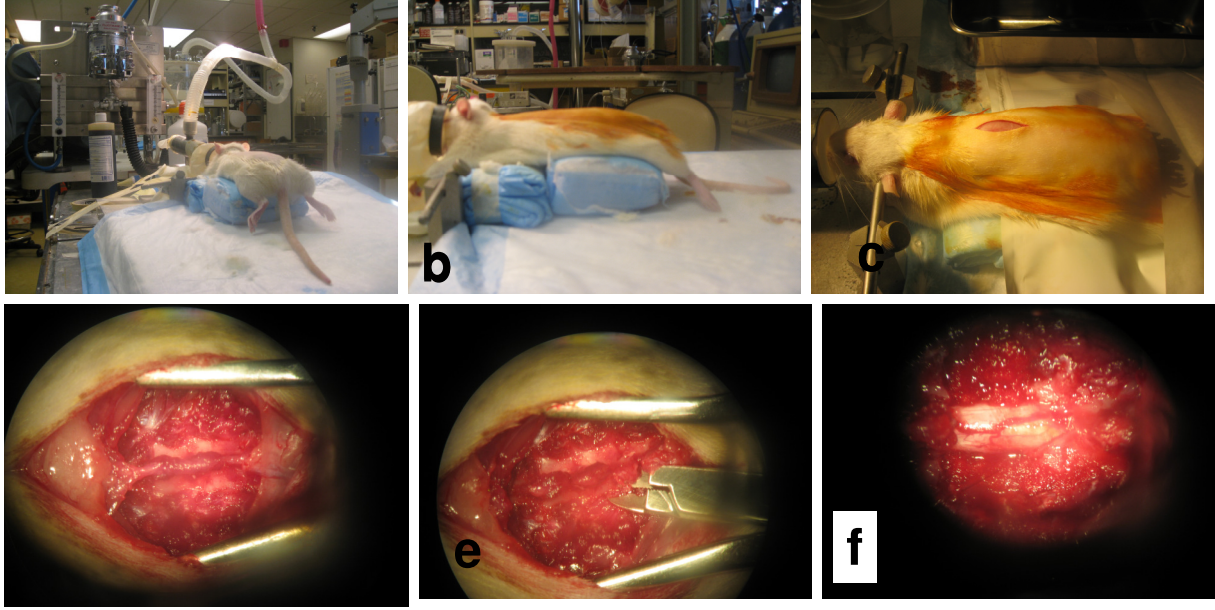
4.3. Hayvan Grupları

Bu deneyde 27 vahşi tipte erişkin dişi Sprague Dawley (SD) rat (Charles River, St. Constant, Quebec, Canada, 250-300g) ve Dr. A. Keating, Toronto, Canada, laboratuvarında beslenen 2 erişkin GFP transjenik Wistar rat (strain; Wistar-Tgn (CAG-GFP)184ys, (297±61)) kullanıldı. Transjenik ratlar orijinal olarak YS Institute, Inc, Utsunomiya, Tochigi, Japonya'dan getirildi. Deneyel hayvanların kullanımı ve hayvan bakımına ilişkin olarak bu deneyin tüm protokolleri, Canadian Council tarafından hazırlanmış bir rehberdeki politikalara göre University Network ve Toronto Western Hospital'da Araştırma Enstitüsünün Hayvan Bakım Komitesi tarafından kabul edildi.

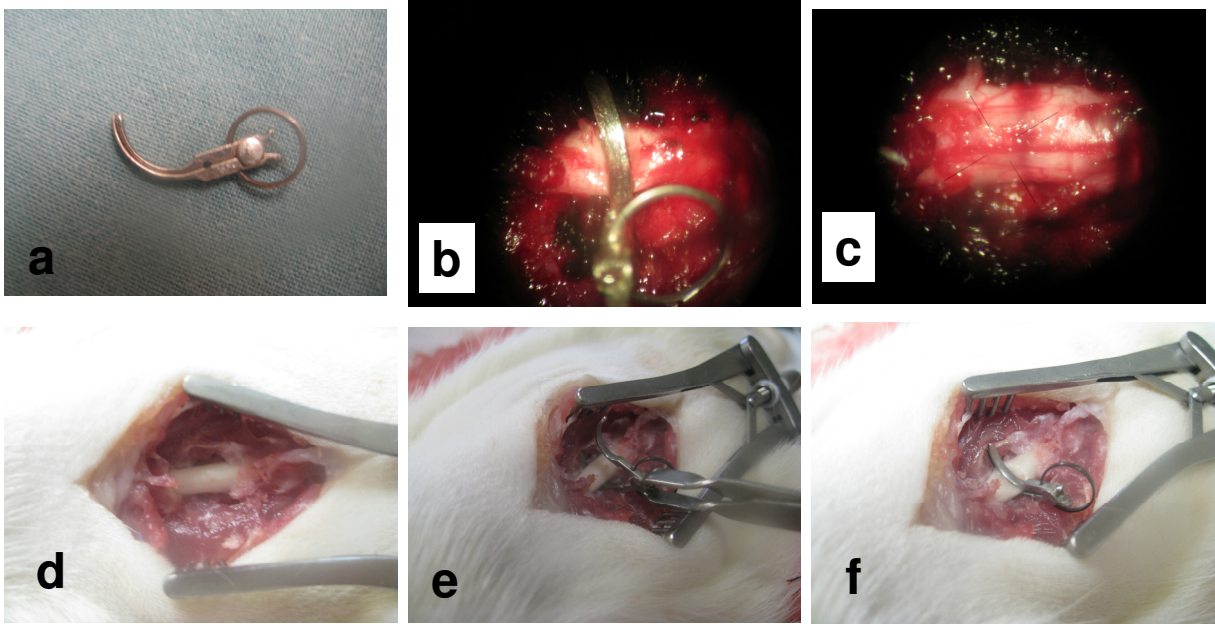
Bu çalışmada SD ratlara NSPCs'ler omurilik üzerinde gerçekleştirilen klip-kompresyon travma modelinden 3 hafta sonra yani kronik dönemde olan hasarlı omurilik ya da omurilik içerisinde gelişen kavite içerisine direk injeksiyon (n=9) ya da chitosan tüp (n=9) aracılığıyla implante edildi. Kontrol grubu olarak sadece travma grup (n=9) oluşturuldu. Daha önce laboratuvarımızda yapılan bir diğer çalışmada NSPCs'leri içermeyen boş chitosan tüp hasarlı omurilik içerisine implante edildiği için bu grup çalışmaya katılmadı. Ancak sonuçlar aşamasında bu sonuçlar bildirilecektir.

4.4. Omurilik travması ve transplantasyon

27 SD rat ½ nitrous oxide-oxygen içeren %2 halotan ile derin bir şekilde uyutuldu ve anestezi öncesi (indüksiyonda hipotansiyon gelişme riski) her bir rat subkütan 5ml serum fizyolojik aldı. İnhalasyon anestezisinin sürekliliği ratın burnuna yerleştirilen huni şeklinde özel bir maske ile sağlandı (Şekil 3a ve 3b). Ratların prone pozisyonda ameliyat masasına yatmaları özel hazırlanmış yastıklarla sağlandı (Şekil 3a, 3b ve 3c). Mesafe tayinini takiben cerrahi alan traş edildi ve lokal antiseptiklerle (batticon ve hidrojen peroksit) yıkandı. Steril örtülmeyi takiben cilt insizyonu ve paravertebral adale disseksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 3c ve 3d). Daha sonra ameliyat mikroskopu eşliğinde T7, T8, T9 total laminektomi yapıldı (Şekil 3e ve 3f). Daha önce orijinali Rivlin ve Tator tarafından tanımlanmış klip kompresyon travma modeline uygun olarak T8 düzeyinde 35g gücünde orta-ağır şiddetteki bir klip 1 dakika ekstradural olarak omurilik üzerine yerleştirildi (474). Klibin çıkarılmasını takiben omurilik dorsal yüzü üzerinde oluşan şerit tarzındaki kontüzyon alanı üzeri daha sonraki ekstradural skar oluşumunu ve fibröz doku invazyonunu engellemek için bir synthetic expanded polytetrafluoroethylene membrane (Preclude Goretex Dura Substitute, Gore, Gift from Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ) ile örtüldü. Daha sonra paravertebral adale 3–0 Vicryl sütür (Johnson and Johnson, Peterborough, ON) ve cilt Michel kliplerle (Fine Science tools, North Vancouver, BC) kapatıldı.



Şekil 3a ve 3b. Ratların cerrahisinden önce ameliyat masasında gerçekleştirilen anestezi süreci ve pozisyonu göstermektedir. Şekil 3c ve 3d cilt insizyonu ve paravertebral adale disseksiyonunu göstermektedir. Şekil 3e ve 3f, T7, T8 ve T9 düzeyinde gerçekleştirilen laminektomileri göstermektedir.



Şekil 4a. Rivlin ve Tator tarafından geliştirilen klip kompresyon modelinde kullanılan 35g gücündeki klip görülmektedir. Şekil 4b. Laminektomi sonrası extradural olarak 1 dakika kadar omuriliğe uygulanan 35 gr klipin ameliyat sırasında görüntüsü izlenmektedir. Şekil 4c. Klip kompresyon travmasından sonra omurilik üzerinde klip tarafından yaratılmış hasarın izi görülmektedir. Şekil 4d, 4e ve 4f postmortem klip kompresyonunu göstermektedir.