

Verapamil ile Uyarılmış Dorsal Kök Ganglion Hücresi Rejenerasyonu

Verapamil Induced Dorsal Root Ganglion Cell Regeneration

AĞAHAN ÜNLÜ, GÖKALP SİLAV, AYŞE KARATAŞ, BERMANS İSKANDAR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilimdalı (AÜ, GS, AK), Ankara
Wisconsin Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilimdalı (BI), Madison, Wisconsin, ABD

Geliş Tarihi: 01.11.2000 ⇔ Kabul Tarihi: 11.12.2000

Özet: Günümüzde travma, inme, dejeneratif hastalıklar nedeniyle oluşan nöronal kayıpların azaltılması yada yeniden kazanılmasını amaçlayan bir çok çalışma yapılmaktadır. Hücrede bir çok olayın düzenlenmesinde yer alan ikincil mesajcı sistemi içinde yer alan kalsiyumun etkileride bu araştırmalara konu olmuştur. Bu amaçla, bir kalsiyum kanal engelleyicisi olan Verapamil'in Santral Sinir Sistemi rejenerasyonu'na olan etkileri araştırılmıştır. Dorsal kolonları hasarlandırılmış ve siyatik sinirleri kesildikten sonra C2 seviyesinde dorsal kolonu üzerine eklenmiş olan sıçanlarda periton içine verilen 0.1 mg/kg dozundaki Verapamil'in etkileri, plasebo kullanılan ve sham grupları ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta, bu dozda verilen Verapamil ile 75 ± 16 hücrede rejenerasyon olduğu saptanmış ve plasebo (33.5 ± 9.7) ve sham (33 ± 4.2) grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur (t-testi, $p=0.004$ ve $p=0.002$). Elde edilen bir diğer sonuç ise siyatik siniri kesilen taraftaki dorsal kök hücre rejenerasyonunun kesilmeyen karşı taraftaki rejenerasyon oranından fazla olduğudur. Sham grubunda 19.3 ± 5.4 , Plasebo grubunda 15.5 ± 2.1 hücre rejenerasyonu olmuştur. Verapamil grubunda 20 ± 11.1 hücre sayılabilmiştir. Bu bulgular ışığında bir kalsiyum kanal blokörü olan Verapamilin santral nöronların rejenerasyonunu artırdığı bulunmuştur.

Abstract: So far, lot of studies have been done to improve or regain the neuronal disfunction and loss, caused by neurodegenerative diseases, stroke and trauma. Calcium which is a member of seconder messenger system involved in regulation of cellular events, has been the subject of some experiments. For this purpose, the effects of Verapamil-HCl, which is a voltage gated calcium channel blocker, on Central Nerve System regeneration was studied. The effects of 0.1 mg/kg dose on rats, whose dorsal column injured and grafted with a sciatic nerve graft at C2 level, was compared with placebo and sham surgery groups. As a result, there was regeneration in 75 ± 16 cells and statistical analyse revealed significant difference between placebo (33.5 ± 9.7 , $p=0,004$) and sham surgery (33 ± 4.2 , $p=0,002$) groups. The regeneration at sciatic nerve lesion side is greater than the other side which the sciatic nerve was not cut. In Sham surgery group 19.3 ± 5.4 , in plasebo group 15.5 ± 2.1 , and in Verapamil group 20 ± 11.1 cells were regenerated. It was suggested that Verapamil improves the regeneration of nerves.

Anahtar Kelimeler: Dorsal kök gangliyonu, kalsiyum kanal antagonisti, sinir rejenerasyonu

Key Words: calcium channel blocker, dorsal root ganglion, nerve regeneration

GİRİŞ

Her yıl milyonlarca insan travma, dejeneratif hastalıklar ya da stroke gibi nedenlerden dolayı yaşamını ya da nöronal fonksiyonlarından bir kısmını kaybetmektedir. Bu kayıpların azaltılabilmesi için bir çok çalışmalar yapılmaktadır(1,2,4,12-14,17,18). Nöronların bu gibi durumlardan sonra oluşan birincil ve ikincil hasarlardan korunması ilk plandaki amaç olarak düşünülmüştür. Bu amaçla bir çok deneysel ya da klinik çalışma yapılmıştır. Nöronların oluşacak yeni hasarlardan korunması ile ilgili bazı olumlu gelişmeler olsa da hasar sonrası kaybolan nöronların yerlerine yenilerinin konulması ile ilgili çok başarılı sonuçlar alınmamıştır. Her ne kadar ümit verici gelişmeler olsa da henüz yetersiz durumdadır.

Nöronal rejenerasyon çalışmalarında değişik modeller kullanılmaktadır. Sempatik gangliyon hücreleri, dorsal kök ganglion hücreleri, retinal gangliyon hücreleri ulaşılabilir örnekler olarak oldukça önem kazanmıştır. Santral özellikli hücre gövdesinin santral sinir sistemi dışında bulunması deneysel çalışmalar için oldukça yararlı olmuştur. Memelilerde sınırlı olan rejenerasyon özelliklerinin daha alt canlılarda kaybolmamış olması bu canlılarda yapılan çalışmalarda rejenerasyon yeteneği ile ilgili direkt bilgiler de sağlanmıştır.

Kalsiyumun santral sinir sistemi nöronları üzerindeki etkileri hem rejenerasyon çalışmalarında hem de hücre hasarı ya da ölümü çalışmalarında araştırılmaktadır.

Normal durumlarda kalsiyumun hücreye girişi kanal reseptörleri aracılığı ile olmaktadır. Bunlar arasında voltaj duyarlı kalsiyum kanal reseptörleri (VSCCR), N-metil D-aspartat reseptörleri (NMDAR), nöronal acetylcholine reseptörü (n AchR), tip 3 serotonin reseptörleri (5 HT₃R) kalsiyum geçirgen AMPA and kainate glutamate reseptörleri sayılabilir. VSCCR leride kendi içinde L,N,P,Q ve T alt tipleri içerir(7,10,11).

Hücre içindeki kalsiyum konsantrasyonu, hücre içine alımını kontrol eden kanal reseptörlerine ek olarak, bazı depolama (Endoplazmik retikulum ER) ve tamponlama-taşıma sistemleri ile de gerekli düzeylerde tutulur(9).

Kalsiyumun hücreye giriş yolu ve intraselluler konsantrasyonu hücreyi değişik şekillerde etkileyebilir. Kalsiyum hücre yaşam oranını

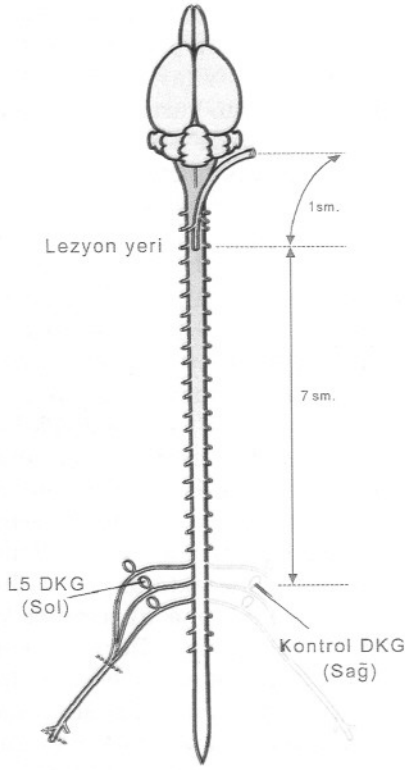
artırabildiği gibi hücre ölümüne de neden olabilir. Kalsiyumun hücre içindeki dağılımı da hücrede değişik yanıtlara neden olabilir. Ayrıca VSCCR leride hücre ölümü, nörit büyümesi, sinaps formasyonu, fenotipik farklılaşma gibi etkileri kontrol ederler(8).

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 12 adet dişi Sprague Dawley sıçan (Harlan Sprague Dawley, Indiana) Wisconsin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım Ünitesi ile yapılan protokole göre kullanılmıştır. Hayvanlar Ketamin-HCl ve Xylazin Firma adı-ülke karışımı ile uyutulduktan sonra sol siyatik sinir hem hazırlayıcı lezyon yapmak hemde gref olarak kullanmak amacı ile eksize edilmiştir. Bu insizyon kapatıldıktan sonra üst servikal bölgede yapılan orta hat insizyonu ile, C2 total laminektomi yapılmış, dura açıldıktan sonra orta hattın her iki yanında 1mm uzaklıkta ve 1mm derinlikte bilateral dorsal kolon hasarı oluşturulmuştur (Şekil 1). Daha sonra siyatik sinir grefti bu lezyonların üzerine gelecek şekilde piaya 10/0 monofilaman naylon suturele dikilmiştir. Greftin distal ucu oksipital kemik periostuna tespit edilip insizyon kapatılmıştır. Sham grubuna herhangi bir ilaç ya da ilaç taşıyıcısı verilmemiştir. Plasebo grubuna ise Verapamil-HCl nin içinde çözüldüğü Fosfat tamponlu salin (PBS) içinde 1/1000 EtOH 0.5 ml verilmiştir. Deney sonunda, 2. günde, 4. günde ve 6. günde 0.1 mg/kg dozunda Verapamil-HCl çözeltisi 0.5 ml intraperitoneal olarak 4 kez verilmiştir. 12. günde servikal insizyon açılıp graft ucu bulunmuş ve 3 ml Fluorogold (FG)(16) (Fluorochrome, Denver,CO) (Excitation 350-395 nM / Emission 530-600 nM) ile işaretlenmiştir. 2 gün sonra hayvanlar yüksek doz Ketamin/Xylazin karışımı ile uyutulup intrakardiyak olarak 60 ml, 0.1 M PBS ve 300 ml. %4 Paraformaldehid ile perfüze edilmiştir. Sol taraf ve sağ taraftan L5 Dorsal kök gangliyonları (DKG) çıkarılmış, %4 Paraformaldehid ve %20 Sukroz ile muamele edilmiştir. Bu DKG ler, daha sonra sıvı nitrojen ile OCT (Histoprep, Fisher Scientific) içinde dondurulmuş ve cryostat ile 14 mm. kalınlığında kesilmiştir. Bu örnekler floresans mikroskop (Axioscope, Zeiss, Almanya) altında incelenmiş ve fluorogold ile işaretli hücreler sayılmıştır (Şekil 2). Sonuçlar t-testi, normalite, equal variance, ve Mann-Whitney Rank Sum Testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler ± SD olarak verilmiştir.

SONUÇLAR

Sham grubunda siyatik sinirin kesildiği tarafta



Şekil 1: Cerrahi uygulamanın şematik gösterimi. Lezyon yeri, deneysel DKG tarafında siyatik sinir kesilmiş ve karşı tarafındaki (Kontrol) DKG gösterilmektedir.

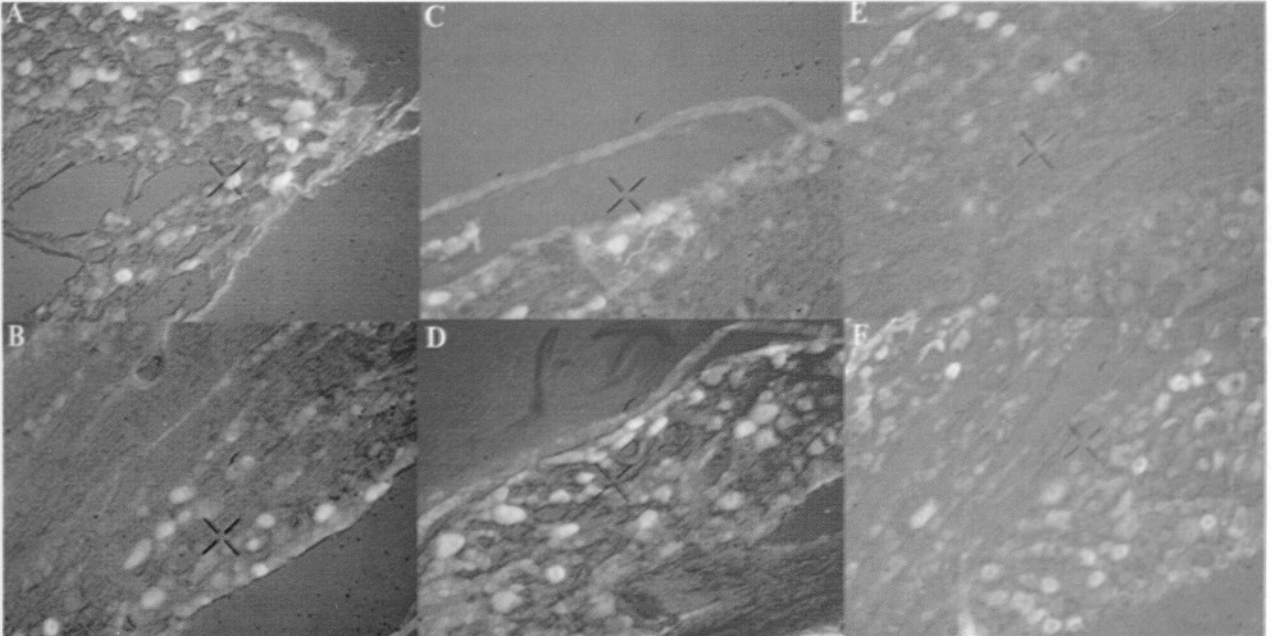
rejeneren olan hücre sayısı 33 ± 4.2 olarak bulunmuştur. Plasebo grubunda 33.5 ± 9.7 hücre rejeneren olmuştur. Verapamil verilen grupta 75 ± 16.0 işaretlenen hücre sayılmıştır. Gruplar karşılaştırıldığında plasebo grubu ve sham grubu arasında istatistiksel bir anlam yok iken ($p=0.928$), verapamil ile aralarında belirgin fark saptanmıştır. ($p=0.002$ ve $p=0.004$)

Siyatik sinirin kesilmediği, kontrol karşı tarafta sham grubunda 19.3 ± 5.4 hücre saptanmıştır. Plasebo grubunda 15.5 ± 2.1 hücre rejeneren olmuştur. Verapamil grubunda 20 ± 11.1 hücre sayılabilmektedir. Bu grup değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. (Şekil 3)

Siyatik sinir kesilen taraf ile kesilmeyen taraf değerleri karşılaştırıldığında tüm gruplarda istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır (sham, $p=0.011$, plasebo, $p=0.007$, verapamil, $p=0.001$).

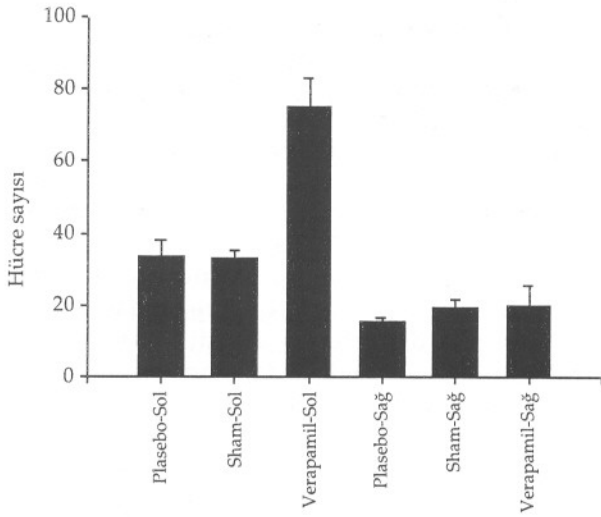
TARTIŞMA

Aslında hücre hasarı ve hücrenin hasara yanıtları ile ilgili mekanizmalar çok karmaşık olsa da rejenerasyon öncesinde ortaya çıkan değişikliklerde rejenerasyonun seyrini değiştirecek durumdadır. Bu mekanizmaların büyük bir kısmında kalsiyuma bağlı aktivasyonlar ve bunun sonunda ortaya çıkan olaylar rol oynar. Axotomi sonrasında,



Şekil 2: Fluorogold ile işaretlenmiş rejeneren olan DKG hücreleri. (A) Sham grubunda kontrol taraftan alınan örnek, (B) Sham grubunda siyatik sinirin kesilmiş olduğu taraftan alınan örnek. (C) Plasebo grubunda kontrol taraf, (D) Plasebo grubunda sinir kesilen taraf, (E) Verapamil verilen grupta kontrol taraf, (F) Verapamil grubunda sinir kesilen taraf. X200

Verapamil ile uyarılmış hücre rejenerasyonu



Şekil 3: Sonuçların grafik gösterimi. (Sol: Sinir kesilen taraf), (Sağ: Sinirin kesilmediği karşı taraf)

hasar yerinden kalsiyum akışı ile hücre içinde belirgin konsantrasyon değişikliği oluşur. Hasarlanmış axon ucunda konsantrasyon 1mm'den daha azdır. Axonal hasar yerinin membran ile kapatılması sonucunda serbest kalsiyum konsantrasyonu normal değerlere iner. Büyük yapısal değişikliklerin olduğu bölge ile aksoplazmanın değişmediği sınırdaki intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu 300-500 mM arasındadır(21). Burası yapısal değişiklikler ile normal axoplazmanın sınırındadır. Hasarlanmamış nöronlarda da benzer şekilde konsantrasyonların oluşturulması ile aynı yapısal değişiklikler uyarılabilmiştir. Yapısal olarak keskin sınırların bulunduğu bu yerde kalsiyum konsantrasyon farkları bu kadar keskin değildir(21). Bu kalsiyum seviye değişiklikleri ultrastruktural değişikliklere neden olabildiği gibi hücre ölümüne de neden olabilir.

Axotomi sonrasında axonal retraksiyon, membran oluşumu ile kesik ucun kapatılması(20), komşu axonal segmentin düzleşmesi, hasarlanmış axonal segmentten lamellipod uzanımı, axon ucundaki konsantrasyonun 1.5 mm seviyesini aşması sonucunda mikrotubullerin kaybolması, elektron dense deposit birikimi, ve bu bölgeye hemen komşu bölgede mikrotubullerin kısalması ve paralel dizilimlerin kaybolması gibi olaylar olmaktadır(21). Bu olaylar rejenerasyon için gerekli ilk aşamalardır. Bundan sonraki aşamalarda yeni büyüme konisi

oluşumu, rejenerasyonun yolunu bulması ve uygun sinaps oluşumu vardır. Hücrenin ilk aşamaları geçip geçemeyeceği hücrenin ilk travmayı atlama yeteneğine bağlıdır. Yani hücrenin öldürücü kalsiyum seviyelerinden kurtulabilmesi gereklidir. Bu amaçla deneyimizde bir L tipi VSCCR olan Verapamil kullanılarak hücre içine aşırı kalsiyum girmesi engellenmeye ve dolayısı ile sonraki rejenerasyon aşamalarına geçmesi sağlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda hücre ölümünün ilk haftada oldukça hızlı olduğu ve tubulin gibi hücre iskelet elemanlarının taşınmasının yavaşladığı ve gen ekspresyonu farklılaşmasının azaldığı devreye uyduğu bildirilmiştir. Bu nedenle ilk haftada 0., 2., 4., ve 6. günlerde Verapamil verilmiş ve bu devrede hücre kalsiyum konsantrasyonu öldürücü yüksek değerlerin altında tutulmaya çalışılmıştır. Gene bir kalsiyum kanal blokörü olan Flunarizin, DKG lerde sinir büyüme faktörünün (NGF) etkisinin axotomi sonucunda soma üzerinden kalkması sonucu ortaya çıkan sinyalleri düzenleyerek, kromatin kondansasyonunu engellediği dolayısı ile apoptozisi engellediği gösterilmiştir. Apoptozise giden yolda önemli olan PI3-kinaz enziminin engellenmesinin buna neden olduğu sanılmaktadır(19). Verapamilin de benzer şekilde hücre sinyal iletim yollarına etki ederek, hücre ölümünü engellediği, yaşayabilirliği artırdığı ve dolayısı ile rejenerasyona neden olduğu düşünülmüştür(19).

Bu deneyde kullanılan siyatik sinir greftlerin içerdikleri destekleyici faktörlerden yararlanmak, büyüme için engelleyici olan santral sinir sistemi glial ortamının rejenerasyonu destekleyen periferik sinir schwann hücre ortamına değiştirilmesi amacı ile kullanılmış ve yararlı olduğu gösterilmiştir(3,5). Bu metod DKG rejenerasyon deneylerinde sıkça ve geçerli bir yöntem olarak kullanılmıştır.(15) Siyatik sinirin kesilmesinin aynı taraf DKG santral axonlarının rejenerasyonuna etki ettiği gösterilmiş ve bu tip lezyonlar "hazırlayıcı lezyonlar" olarak tanımlanmıştır(6). Burada amaç distal axonun kesilmesi ile ortaya çıkan somatik değişikliklerden santral axonun yararlandırılmasıdır. Periferik axonun kesilmesi ile ortaya çıkan kromatolizis, bazı yapısal proteinlerin yapım ve taşınma hızı artışı gibi hücresel değişiklikler DKG hücresinin santral axonunun kesilmesi ile elde edilememiştir. Periferik sinirlerin axotomi sonrasındaki ortaya çıkan rejenerasyon, santral axonlarda yeterli olmamasının nedenleri arasında bu farklılıkların olması ile açıklanmaya çalışılmıştır.

Deney sonuçlarımızda hazırlayıcı lezyon içermeyen tarafta rejenerasyonun içeren taraf göre daha az olduğu saptanmıştır. Bu sonuçta rejenerasyonu hazırlayıcı lezyonların artırdığı şeklindeki bulgularla uyumlu olmuştur.

SONUÇ

Santral sinir sistemi hücrelerinin rejenerasyonu üzerine bir çok çalışma yapılmaktadır. Burada amaç bu yeteneği kısıtlı olan SSS hücrelerinin rejenerasyonu sonucunda, travma, iskemi dejeneratif hastalıklar sonucunda ortaya çıkan fonksiyon kayıplarının yeniden kazanılmasıdır. Günümüzde bu çalışmalar her ne kadar tam olarak yüz güldürücü olmasa da, günün birinde kayıp nöronal fonksiyonların tam olarak geri döndürülmesi mümkün olacaktır.

Yazışma Adresi: Dr. Ağahan Ünlü
Tusso Blokları N-1/ 14
Emek-Ankara 06510
agahan@ixir.com
Tel: 312-310 3333 / 2629
Fax: 312- 309 4340

KAYNAKLAR

1. Aguayo AJ, Muller KJ, Views on regeneration in the nervous system. Journal of Neurobiol Vol 23, New York: Wiley, 1992, 467-604
2. Aguayo AJ, Nicholls JG, Development and regeneration of the nervous system : a discussion. Philosophical transactions: Biological sciences. Vol. 331, London; Royal Society, 1991, 253-350
3. Bahr M, Eschweiler GW, Wolburg H : Precrushed sciatic nerve grafts enhance the survival and axonal regrowth of retinal ganglion cells in adult rats. Exp Neurol 116(1): 13-22, 1992
4. Borgens RB, Blight AR, Murphy DJ : Axonal regeneration in spinal cord injury: a perspective and new technique. J Comp Neurol 250(2): 157-167, 1986
5. Campbell G, Lieberman AR, Anderson PN, Turmaine M : Regeneration of adult rat CNS axons into peripheral nerve autografts: ultrastructural studies of the early stages of axonal sprouting and regenerative axonal growth. J Neurocytol 21(11): 755-787, 1992
6. Dahlin LB, Kanje M : Conditioning effect induced by chronic nerve compression. An experimental study of

- the sciatic and tibial nerves of rats. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 26(1): 37-41, 1992
7. Desmadryl G, Hilaire C, Vignes S, Diochot S, Valmier J : Developmental regulation of T-, N- and L-type calcium currents in mouse embryonic sensory neurones. European Journal of Neuroscience 10(2): 545-552, 1998
8. Franklin JL, Johnson EM, Jr.: Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. Trends Neurosci 15(12): 501-508, 1992
9. Ghosh A, Ginty DD, Bading H, Greenberg ME : Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. J Neurobiol 25(3): 294-303, 1994
10. Ghosh A, Greenberg ME : Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. Science 268(5208): 239-247, 1995
11. Greenberg DA : Calcium channels and calcium channel antagonists. Ann Neurol 21(4): 317-330, 1987
12. Inoue T, Kawaguchi S, Kurisu K : Spontaneous regeneration of the pyramidal tract after transection in young rats. Neuroscience Letters 247(2-3): 151-154, 1998
13. Olson L : Regeneration in the adult central nervous system: experimental repair strategies. Nature Medicine 3(12): 1329-1335, 1997
14. Ramon y Cajal S, May RM, Degeneration & regeneration of the nervous system, London; New York: Hafner Pub. Co., 1968,2 v. (769)
15. Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ : Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. Nature 284(5753): 264-265, 1980
16. Schmued LC, Fallon JH : Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. Brain Res 377(1): 147-154, 1986
17. Schwab ME, Brosamle C : Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat spinal cord under experimental conditions. Spinal Cord 35(7): 469-473, 1997
18. Seil FJ, Neural regeneration. Progress in brain research; v. 103, Amsterdam ; New York: Elsevier, 1994,xvi, 413
19. Tong JX, Rich KM : Diphenylpiperazines enhance regeneration after facial nerve injury. J Neurocytol 26(5): 339-347, 1997
20. Xie XY, Barrett JN : Membrane resealing in cultured rat septal neurons after neurite transection: evidence for enhancement by Ca(2+)-triggered protease activity and cytoskeletal disassembly. J Neurosci 11(10): 3257-3267, 1991
21. Ziv NE, Spira ME : Spatiotemporal distribution of Ca2+ following axotomy and throughout the recovery process of cultured Aplysia neurons. Eur J Neurosci 5(6): 657-668, 1993