

Optik Sinir Rejenerasyonu

Optic nerve regeneration

AĞAHAN ÜNLÜ, GÜLŞAH BADEMCİ, ZAFER AYDIN, BERMANS İSKANDAR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı, (AÜ, GB, ZA),
Wisconsin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı, (BI)

Geliş Tarihi: 01.11.2000 ⇔ Kabul Tarihi: 19.02.2001

Özet: Optik sinir rejenerasyonu Santral Sinir Sistemi rejenerasyon çalışmaları içerisinde, santral nöronların rejeneratif kapasitelerinin araştırılması amacı ile kullanılmaktadır. Nöron gövdesinin kolayca ulaşılabilir şekilde göz küresinde bulunması, etkilenebilir olması kullanım nedenlerindedir. Rejenere olan aksonun çevre özellikleri de bu deneylerde kolayca incelenebilir durumdadır. Rejenerasyon yeteneğine etki eden, nöron ya da aksonun çevresel yapılardan etkilenmeleri ve bu çevre yapıların değiştirilebilir olması da avantajdır. Buradan elde edilecek sonuçlar Santral Sinir Sisteminin diğer yerlerindeki rejenerasyon çalışmalarına ışık tutacaktır. Bu amaçla 12 sıçanda optik sinir kesilerek aksonal hasar oluşturulmuş ve siyatik sinir anastomozu yapılarak rejenere olması sağlanmıştır. Hücrelerin %1.02'sinde rejenerasyon görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Santral Sinir Sistemi, Rejenerasyon, Optik sinir

Abstract: Optic nerve regeneration model has been used for exploring the regenerative capacity of central type neurons. The accessibility and affectability of the neuron body which is situated in eye globe are reasons for selections in regeneration experiments. The environment which influence the regenerative capacity of the neuron is also easily investigated in optic nerve model. The environment has been changed in order to search the effects of different factors. The results collected would promote the future experiments in other parts of Central Nervous System. In 12 rats, axonal injury has been done by cutting the optic nerve and regeneration has been induced by grafting sciatic nerve. Regeneration has been detected in 1.02% of cells.

Key words: Central Nervous System, Regeneration, Optic nerve

GİRİŞ

Santral Sinir Sisteminin rejenerasyon yeteneğinin araştırılması amacı ile uzun süredir çalışmalar yapılmaktadır(5,7,14,15). Periferik Sinir Sisteminden tamamen farklı olarak rejenerasyon yeteneğinin oldukça sınırlı olması akıllarda bir çok soru yaratmıştır. Ayrıca bir çok insanın travma, inme ve santral sinir sisteminin dejeneratif hastalıklarının

ortaya çıkardığı sosyal ve ekonomik sorunlar bu konudaki çalışmaları hızlandırmıştır.

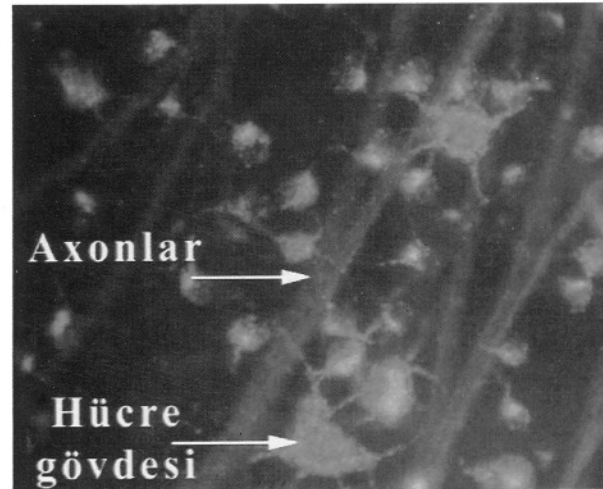
Optik sinir rejenerasyonu, Santral Sinir Sisteminin rejenerasyonu hakkındaki çalışmalarda bir örnek olarak kullanılmaktadır(6,16,17). Bu modelin kullanılmasının nedenlerinden biri, kolayca ulaşılabilir göz küresinde bulunan nöron gövdesinin rejenere olup olmadığının basit

yöntemlerle araştırılabilir olmasıdır. Ayrıca rejenerasyon olan aksonun yada aksonu çevreleyen glial dokunun kolayca incelenebilir yerlerde olması da diğer seçim nedenlerindedir. Bu nöronal gövdenin dış ortamdan ulaşılabilir olması da değişik maddelerin optik sinir rejenerasyonuna etkisinin araştırılmasına yardım eder.

Bu amaçla, optik sinirleri kesilmiş sıçanlarda siyatik sinir greftleri sonrasında rejenerasyon olup olmadığı araştırılmıştır. Optik sinirde rejenerasyonun olması hem Santral Sinir Sisteminin rejenerasyon yeteneği hakkında bilgi verecek hemde ileride yapılacak deneyler için yol gösterici olabilecek temele katkıda bulunacaktır.

MATERYAL VE METOD

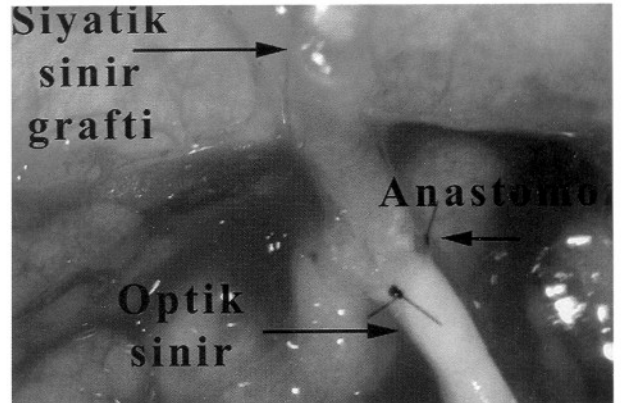
Bu çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 12 adet dişi Sprague Dawley sıçan (Harlan Sprague Dawley, Indiana) Wisconsin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım Ünitesi ile yapılan protokole göre kullanılmıştır. Hayvanlar Ketamin-HCl ve Xylazin karışımı ile uyutulduktan sonra burun kökünden geri parietal bölgeye kadar uzanan orta hat kesisi ile girilmiştir. Periorbita ortaya konmuş, adale ve yağ dokuları ekartmanı sonucunda optik sinir kılıfı ile birlikte diseke edilmiştir. Kılıf orta hattan açılmış, sinir kılıftan ayrıldıktan sonra göz küresine 2-3 mm. uzaklıktan kesilmiştir. Kesilme işlemi sırasında kılıf içinde bulunan arteriyel dolaşımın bozulmaması sağlanmıştır. Hayvanlar iki gruba ayrılmıştır.



Şekil 1: Optik sinirin göz küresi arkasından kesilmesinden sonra floresan boya (TR) ile boyanmış retinal gangliyon hücreleri. Hücre gövdesi ve retinanın sinir lifi tabakasındaki akson demetleri ok ile işaretlemiştir.X400

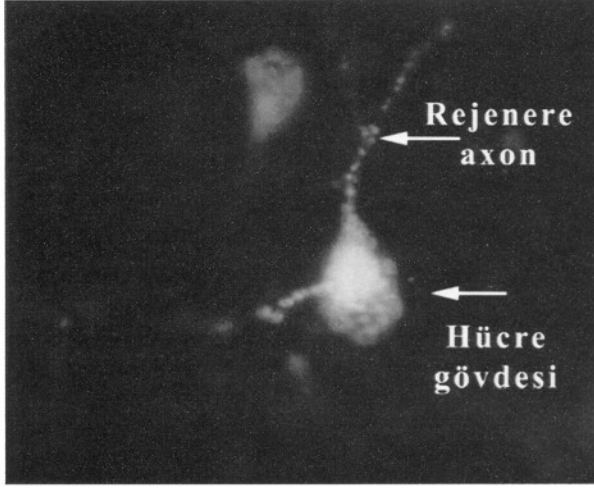
Birinci gruptaki 5 adet sıçanda, optik sinir kesilmesinin hemen ardından kesik uca 10 ml floresan boya Texas kırmızısı (TR) (Absorbansiyon/Emisyon Max.:595/615) (D-1863, Molecular Probes, Eugene,OG) uygulanmıştır. Operasyon sonunda cilt kapatılmış ve 3 gün sonrasında hayvanlar yüksek doz sedatifler ile uyutulmuş ve 60 cc soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) , 250 cc %4 paraformaldehit (PFA) ile perfüze edilmiştir. Göz küreleri çıkartılıp 6 saat %30 Sükröz içinde, 10 saat %4 paraformaldehit (PFA) içinde inkube edilmiştir. Cerrahi mikroskop altında optik küreler limbus seviyesinden kesilmiş ve retinaları diseke edilmiştir. Bu retinalar daha sonra lam üzerine yayılmış, lamel ile kapatıldıktan sonra uygun floresan filtreler kullanılarak floresan mikroskop (Axioskop, Zeiss, Almanya) altında incelenmiştir. Optik sinirde kesilmiş aksonlar aracılığı ile retrograd olarak işaretlenen retinal gangliyon hücreleri (Şekil 1) bir skala (alan=625mm²) yardımı ile retina üzerindeki dört kadranda ve retinal yarı çapın üçe ayrılması ile elde edilmiş üç değişik çaptaki toplam 12 alanda sayılmıştır. Gene aynı skala yardımı ile retinal alan da hesaplanmıştır.

İkinci gruptaki 7 hayvanda kesik optik sinir ucuna floresan boya uygulanmamış ancak sol siyatik sinirden alınan uygun çaptaki 15 mm uzunluğundaki dalı optik sinire 2 adet, 10/0 monofilaman naylon sutür ile uç-uç anastomoz yapılmıştır (Şekil 2). Graft distal ucu, daha sonra bulunmasını kolaylaştırmak amacı ile frontal periosteuma tespit edilmiştir. İnsizyonlar kapandıktan sonra 2 ay beklenilmiştir. Sıçanlar tekrar uyutulmuş, insizyonları açılmış ve greft ucu bulunmuştur. Uçtan 1mm. lik bir parça çıkarılmasından sonra graft ucuna 10ml floresan boya (TR) uygulanmış ve insizyon kapatılmıştır. Üç



Şekil 2: Optik sinir kesildikten sonra siyatik sinir anastomozu. 10/0 naylon ile dikilmiş anastomoz hattı görülmektedir.

günün sonunda diğer gruptaki gibi perfüzyon, fiksasyon ve yayma aşamaları tamamlanmıştır. Bu retinaların tüm alanı aynı skala yardımı ile gözden geçirilmiş ve floresan hücreler sayılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3: Rejenere olmuş retinal gangliyon hücresi, gövde ve akson ok ile işaretlenmiştir.X400

Sonuçlar Sigma Stat (SPSS), programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerler ortalama±SD olarak verilmiştir.

SONUÇLAR

Greft yapılmadan önce floresan boya ile boyanan hücrelerin sayılması ile elde edilen total retinal gangliyon hücre sayısı 103922.4 ± 7176.4 olarak bulunmuştur. En yüksek sayı 111456 ve en düşük sayı 94540 olarak bulunmuştur. Bu örneklerde ölçülen retina alanı $65.8 \pm 8 \text{ mm}^2$ olarak bulunmuştur.

Greft yapıldıktan sonra rejenere olan retinal gangliyon hücreleri sayıldığında 1060.6 ± 86 hücre saptanmıştır. Bu grupta en yüksek değer 1219 ve en düşük değer ise 972 hücredir.

Her iki grup göz önüne alındığında retinal gangliyon hücrelerinin %1.02'sinin optik sinir kesilmesinden sonra rejenere olarak greft içerisinde 15mm kadar ilerlediği gösterilmiştir. Sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Santral Sinir Sisteminin rejenerasyonu üzerindeki araştırmalar özellikle son yıllarda, genetik dalındaki gelişmelere paralel olarak artmış ve umut vermeye başlamıştır. Burada amaç kayıpların

giderilmesi, yada en azından fonksiyonların geri döndürülmesidir.

Rejenerasyonun oluşabilmesi için gerekli şartlardan biri hücrenin yaşamını sürdürmesidir. Hücre hasarından sonra, hücrede bir çok değişiklikler oluşmaktadır(2). Hücrenin rejenere olup olmayacağını, ya da ölümünü bu değişiklikler belirler. Bu değişikliklerde bir sekonder mesajcı sistem elemanı olan kalsiyumun etkileri oldukça fazladır(10). Kalsiyum hücrenin ölümüne neden olabileceği gibi, gen yapımı, bazı yapısal elemanların yapımı ya da aktivasyonu gibi bir çok olaya da katılarak hücrenin rejenerasyonuna da etki eder. Başlangıçta yanıt ölüm ve rejenerasyon içinde aynıdır. Daha sonraki seyir ek faktörlerce belirlenir. Bir kısım hücrelerde bu değişiklikler ortaya çıkmaz ve hücreler ölür. Yapılan çalışmalarda göz küresinin hemen arkasından yapılan aksotomi ile ilk bir ayda hücrelerin yaklaşık %90'ının öldüğü gösterilmiştir(18). Hücre ölümü ilk 2 haftada oldukça belirgin iken izleyen haftalarda azalsa da devam etmektedir(4). Bizim çalışmamızda hücrelerin yaklaşık %12'si yaşamlarını sürdürmüştür (Yayınlanmamış bulgular); bu oranda yapılan greftin de etkisi vardır. Bazı yazılarda bu tip greftlerin(3) ve Schwann hücrelerinin(12) hücre yaşayabilirliğini artırdığı gösterilmiştir.

Hücrenin rejenere olabilmesi için bazı hücrenel faktörler de gereklidir. Aksotomi ile uyarılmış intranöronal mesajcılar, hücreyi bazı ek çevresel faktörlerle birlikte düzenlenecek şekilde ölüme ya da rejenerasyona götürürler. Hücrenin çevresel faktörlere yanıtını düzenleyen transkripsiyonel faktörler bu devrede gene kalsiyumun rol aldığı bazı olaylardan sonra oluşturulur ve etkinleştirilir(11). Gen oluşumu, yapısal faktör sentezi, reseptörlerin organizasyonu gibi fenotipik ve genotipik değişiklikler hücre içi destekleyici faktör olarak sayılabilecekler özelliklerdir(8).

Tablo 1: Retinada bulunan gangliyon hücre ve rejenere olan gangliyon hücrelerinin sayıları.

Hücre sayıları	
Total retinal gangliyon hücre sayısı	103922.400 ± 7176.385
Rejenere olan retinal gangliyon hücre sayısı	1060.571 ± 85.998

Değerler ortalama±SD olarak verilmiştir.

Her ne kadar hücrenin bu rejenerasyon yeteneği bir kısım rejenerasyon oluştursa da rejenerasyonun devam edebilmesi için bazı dış faktörler de önemlidir. Hücrenin ya da rejenere olacak aksonun içinde bulunduğu ortam bunlardan biridir. Ortamın inhibitör özellikleri, rejenere olabilecek hücre ya da aksonun rejenerasyon özelliğini ortadan kaldıracaktır(13). Bu özellik en belirgin olarak santral sinir sisteminde görülmektedir, periferik sinir sistemi destekleyici ortamı rejenerasyonu destekleyecek şekilde iken santral sinir sisteminin glial destek ortamı rejenerasyona izin vermez(1). Ortamın rejenerasyona etkisi santral sinir sisteminin içinde bile farklılıklar gösterir, beyaz cevher inhibitör özellikte iken gri cevherde inhibiyon yoktur(9). Hücre çevresindeki astrositlerin dizilimi yada hasardan etkilenmeleri de nöronun rejenerasyonuna engelleyici şekilde etki eder. Hücrenin çevresindeki ekstrasellüler matriksin yapısı da rejenerasyonu engelleyici olabilir(9).

Yapılan deneyde aksonun rejenere olacağı ortam bir periferik sinir olan siyatik sinir anastomozu ile değiştirilmiş ve aksonun rejenerasyonunun bu ortam içerisinde olması sağlanmıştır. Periferik sinir greftleri hem içerdikleri bazı destekleyici elemanlar nedeni ile hem de ortamın engelleyici durumunu ortadan kaldırmaları nedeni ile daha önce de kullanılmışlardır(6).

Yapılan çalışmada retinal gangliyon hücrelerinde yaklaşık %1 oranında da olsa rejenerasyon olduğu gösterilmiştir. Bu aksonlar rejenere olup siyatik sinir grefti içerisinde yaklaşık 15 mm kadar ilerlemişlerdir. Eğer 2 ay sonunda yaşayabilmiş hücrelerin tüm retinal gangliyon hücrelerinin %12'si olduğu düşünülürse bu oranın bile oldukça önemli olduğu söylenebilir. Her ne kadar rejenere olabilen hücre sayısı küçük bir oran oluştursa da bu oranın artırılması için yapılacak çalışmaları cesaretlendirmektedir.

İleri dönemlerde değişik kimyasalların kullanılması ile bu oranın artırılmaya çalışılması uygun olacaktır. Bu hücrelerin bir diğer önemi de rejenere olabilen hücrelerin genetik yapılarını içermesidir. Bu genetik yapının ortaya çıkarılması da ileride yapılacak çalışmalara ayrıca ışık tutabilecektir.

Yazışma Adresi: Dr. Ağahan Ünlü
Tel: 312 223 6042
Tusso Blokları N-1 Blok No:14
E-mail: agahan@hotmail.com
10. Cadde Emek / Ankara 06510

KAYNAKLAR

1. Aguayo AJ, David S, Bray GM : Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 95: 231-240, 1981
2. Ambron RT, Zhang XP, Gunstream JD, Povelones M, Walters ET: Intrinsic injury signals enhance growth, survival, and excitability of Aplysia neurons. *J Neurosci* 16(23): 7469-7477, 1996
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. Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ: Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 14(7): 4368-4374, 1994
5. Bray GM, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ: Regeneration of axons from the central nervous system of adult rats. *Prog Brain Res* 71: 373-379, 1987
6. Bray GM, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Carter DA, Aguayo AJ: Neuronal and nonneuronal influences on retinal ganglion cell survival, axonal regrowth, and connectivity after axotomy. *Ann N Y Acad Sci* 633: 214-228, 1991
7. Clark RG: Central nervous system regeneration. Can scientists implement functional regrowth? *J Clin Neuroophthalmol* 2(4): 261-270, 1982
8. 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
9. Fawcett JW: Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res* 290(2): 371-377, 1997
10. Ghosh A, Greenberg ME: Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268(5208): 239-247, 1995
11. Herdegen T, Skene P, Bahr M: The c-Jun transcription factor—bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci* 20(5): 227-231, 1997
12. Maffei L, Carmignoto G, Perry VH, Candeo P, Ferrari G: Schwann cells promote the survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve section. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1855-1859, 1990
13. Schwab ME : Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *Trends Neurosci* 13(11): 452-456, 1990
14. 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
15. Schwaiger FW, Hager G, Raivich G, Kreutzberg GW : Cellular activation in neuroregeneration. *Prog Brain Res* 117: 197-210, 1998
16. So KF, Yip HK : Regenerative capacity of retinal ganglion cells in mammals. *Vision Res* 38(10): 1525-1535, 1998
17. Thanos S, von Boxberg Y: Factors influencing regeneration of retinal ganglion cell axons in adult mammals. *Metab Brain Dis* 4(1): 67-72, 1989
18. Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ : Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 24(1): 23-36, 1993