

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OMURİLİK TRANSEKSİYON MODELİNDE
ERİŞKİN İNSAN MEZENŞİM KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN
CİTOSAN TÜPLER İÇERİSİNDE İMPLANTASYONUNUN
ETKİSİ VE SONUÇLARI

Dr. Ahmet BAŞAK

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2013

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OMURİLİK TRANSEKSİYON MODELİNDE
ERİŞKİN İNSAN MEZENŞİM KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN
CİTOSAN TÜPLER İÇERİSİNDE İMPLANTASYONUNUN
ETKİSİ VE SONUÇLARI**

Dr. Ahmet BAŞAK

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Gökhan BOZKURT

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2013

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım olarak çalışmanın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında sonsuz desteği ve emeği olan Sayın Doç. Dr. Gökhan Bozkurt'a teşekkür sunarım.

Hacettepe Üniversitesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'nda görevli değerli öğretim üyelerim Sayın Prof. Dr. Servet İnci, Sayın Prof. Dr. Kemal Benli, Sayın Prof. Dr. Osman Ekin Özcan, Sayın Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu, Sayın Prof. Dr. Nejat Akalan, Sayın Prof. Dr. İbrahim Ziyal, Sayın Prof. Dr. Hakan Oruçkaptan, Sayın Prof. Dr. Mustafa Berker, Sayın Doç. Dr. Atilla Akbay, Sayın Doç. Dr. Melike Mut Aşkun, Sayın Doç. Dr. Burçak Bilginer, Sayın Uzman Dr. Ahmet İlkey Işıkey ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma, bölümde geçirdiğim yıllar içerisinde eğitimim için gösterdikleri özen, özveri ve dostlukları için teşekkürlerimi sunarım.

Histolojik çalışmaların tamamlanması için gösterdiği yoğun emek, özveri ve destek için Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Petek Korkusuz'a sonsuz teşekkür ederim. Çalışmada kullanılan greft materyalinin temini ve kullanıma hazırlanması için emek veren Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a ve Biyolog Damla Türkay'a, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden Sayın Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya, Sayın Biyolog Sevil Arslan ve Sayın Biyolog İrem Akar Soycan'a teşekkür ederim. Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Nuhan Puralı'ya değerli görüş ve önerilerini benimle paylaştığı ve yol gösterici olduğu için teşekkür ederim. Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Sayın Dr. Eda Öztürk'e çalışmanın istatistiksel aşamasında verdiği destekten dolayı teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince hekimlik anlayışı, becerisi, bilgisi ve derin hoşgörüsü ile bana ilham kaynağı olmuş Sayın Prof. Dr. Tunçalp Özgen'e saygı ve sevgilerimi sunarım.

Destek ve sevgilerini uzakları aşarak bana ulaştıran annem, babam ve kardeşime; tanıdığım günden beri hayatımın en önemli parçası olan “Anlamım” sevgili eşim Nazlı Çakıcı Başak’a sonsuz teşekkür ediyorum.

ÖZET

Başak, A. T. Deneysel omurilik transeksiyon modelinde erişkin insan mezenşim kaynaklı kök hücrelerin citosan tüpler içerisinde implantasyonunun etkisi ve sonuçları. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji uzmanlık tezi, Ankara, 2012. Erişkin mezenkimal dokulardan izole edilen mezenşim kaynaklı kök hücreler değişik derecelerde aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel iyileşme ile sonuçlanan deneysel hayvan modellerinde hasarlı omuriliğe transplante edilmiştir. Herşeye rağmen mezenşimal kök hücrelerin transplantasyon sonrası yaşamda kalma özelliklerinin iyi olmaması omurilik yaralanmalarının onarımında hücre tedavilerinin geliştirilmesinde büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Hasarlı omurilik içerisinde oluşan yaralanma alanını 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 transeksiyona maruz bırakılan omuriliğe ekstramedüller chitosan tüplerde verilen mezenşimal kök hücrelerin yaşamda kalma ve farklılaşma özellikleri değerlendirildi. Direk transeksiyona maruz kalamayan enjeksiyon ile verilen mezenşimal kaynaklı kök hücrelerin yaşamda kalma ve farklılaşma özellikleri ile karşılaştırıldı. Erişkin insan mezenkimal dokularından elde edilen mezenşimal kök hücreleri ihtiva eden chitosan tüplerin ekstramedüller implantasyonu omurilik T8 düzeyine yapılan transeksiyondan hemen sonra gerçekleştirildi. Bu grupta elde edilen sonuçlar direk kök hücre enjeksiyonu yapılan, sadece ekstramedüller chitosan tüp yerleştirilen ve sadece transeksiyon yapılan 3 farklı grupta karşılaştırıldı. Mezenşimal kök hücrelerin yaşamda kalma ve farklılaşma özellikleri immünohistokimyasal ve histopatolojik incelemelerle değerlendirildi. Aksonal filizlenme ve rejenerasyon konfokal mikroskop ile değerlendirildi. Fonksiyonel iyileşme travma sonrası 4 haftalık süreçte BBB skorlaması ile tayin edildi.

Bu çalışmada akut omurilik yaralanma modelinde ekstramedüller chitosan tüp içerisinde verilen mezenşimal kök hücrelerin yaşamda kalma yeteneğine sahip olduğu gösterildi. Ancak her 4 grubun fonksiyonel iyileşmesinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Chitosan tüp, erişkin mezenşim kaynaklı kök hücreler, ekstramedüller implantasyon, aksonal rejenerasyon, omurilik transeksiyonu.

ABSTRACT

Başak, A. T. Effect and results of implantation of adult human mesenchyme originated stem cells in chitosan tubes in the experimental spinal cord transection model. Hacettepe University, Medical School, Neurosurgery specialization thesis, Ankara, 2012.

Mesenchyme originated stem cells that are isolated from adult mesenchymal tissues were transplanted to damaged spinal cords in experimental animal models with various levels of axonal regeneration and functional recovery results. The fact that the survival feature of mesenchymal stem cells after transplantation in spite of everything constitutes an important obstacle in the development of cell treatments in the correction of spinal cord injuries. Chitosan tubes have been used to reconstruct or rebridge the injured area in the damaged spinal cord, to support axonal redevelopment and germination and to provide a protective environment for regeneration.

This study evaluates properties of survival and differentiation for the mesenchymal stem cells given to the spinal cord that has been subjected to transection inside extramedullary chitosan tubes. This was compared with properties of survival and differentiation for mesenchymal originated stem cells that were injected directly to the area that was subject to transection. The extramedullary implantation of chitosan tubes that contain mesenchymal stem cells, obtained from adult human mesenchymal tissues was done right after the T8 level transection. The results obtain with this group was compared with 3 different groups that had direct stem cell injection, only planted with extramedullary chitosan tube and only had transection. Survival and differentiation properties of mesenchymal stem cells were evaluated using immunohistochemical and histopathological analyses. Axonal germination and regeneration was evaluated using confocal microscope. Functional recovery was determined by BBB scoring within the 4-week period after the trauma.

The study showed that the mesenchymal stem cells given inside extramedullary chitosan tube in an acute spinal cord injury could survive. However, a significant differentiation between the functional recoveries of 4 groups was not observed.

Keywords: Chitosan tube, adult mesenchyme originated stems cells, extramedullary implantation, axonal regeneration, spinal cord transection.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1. Omurilik Transeksiyonu Sonrası Hücresel Düzeyde Meydana Gelen Değişiklikler	3
2.2. Aksonal Dejenerasyon ve Rejenerasyon	4
2.3. Santral Sinir Sisteminde Travmaya Cevap	7
2.4. Erişkin Mezenşimal Kaynaklı Kök Hücreler ve Rejenerasyon Yetenekleri	8
2.5. Mezenşim Kaynaklı Kök Hücrelerin İşaretlenmesi ve Transplantasyonu	13
2.6. Mezenşim Kaynaklı Kök Hücrelerin İmplantasyonunda Biyomateryallerin Yeri	15
2.7. Doku Mühendisliği, Nanoteknoloji ve Nanotıp	16
2.8. Chitosan	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Mezenşim Kaynaklı Kök Hücrelerin Hazırlanması	20
3.2. Chitosan Tüplerin Hazırlanması	22
3.3. Hayvan Grupları	26
3.4. Anestezi	27

3.5. Omurilik Transeksiyonu Oluşturulması ve Transplantasyon	27
3.6. Yara Kapatılması ve Postoperatif Erken Bakım	34
3.7. Rejenerasyon Takibi	36
3.7.1. Fonksiyonel Değerlendirme	38
3.7.2. Histolojik Değerlendirme	41
3.8. İstatiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. Gözlemler	43
4.2. Fonksiyonel Değerlendirme	43
4.3. Histolojik Değerlendirme	62
4.4. Konfokal Mikroskopik Değerlendirme	74
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ	83
7. KAYNAKÇA	84

KISALTMALAR

BBB	Basso, Beattie, Bresnahan
BDNF	Brain- derived neurotrophic factor
BMSC	Bone marrow stromal cell
CSPG	Kondroitin sülfat proteoglikan
BOS	Beyin Omirilik Sıvısı
DMEM	Dulbeco's modified Eagle Medium
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
hMSC	Human derived Mesenchymal Stem Cell
HSPG	Heparan sülfat proteoglikan
IBMX	İsobutilmetilksantin
KSPG	Keratan sülfat proteoglikan
MAG	Myelin associated glycoprotein
MHC	Major histocompatibility complex antigen
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MKH	Mezenkimal kök hücre
NCAM	Nöral hücre adezyon molekülü
NGF	Sinir büyüme faktörü
NI 35/250	Nörit gelişimi inhibitörü

IBMX	Ísobutilmetilksantin
PAN/ PVC	Poly acrylonitrile- co- vinylchloride
PEG	Polyethylene glycol
PGA	Poly- glycolic acid
PHEMA	Poly 2- hydroxyethyl methacrylate
PHEMA- MMA	Poly 2- hydroxyethyl methacrylate- co- methylmetacrylate
PLA	Poly- lactic acid
PMT	Photomultipliertube
SSS	Santral sinir sistemi
TEM	Transmitted elektron mikroskop
TEN-C	Tenascin C
TGF	Transforming Growth Faktör
TMLDM	Transmitted Light Detection Mod

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin doku hasarında olası yarar mekanizmaları ... 11
- Şekil 2.2. Chitosan'ın biyokimyasal yapısı () 18
- Şekil 2.3. Sellüloz, Chitosan ve Kitin'in Biyokimyasal Yapılarının Karşılaştırması 18
- Şekil 3.1. CK Grubunun Şematik Tasarımı 29
- Şekil 4.1. Aksiyal (transvers) medulla spinalis yarı ince kesitlerinin tüm gruplara ait mikrograflarında kesi bölgesindeki damar (asterisk) ve inflamatuvar hücrelerden (inf) zengin, nekrotik hücre artıklarını içeren granülasyon dokusu görülmektedir. Kök hücre uygulanan gruplarda granülasyon dokusunun diğer gruplara göre daha organize olduğu izlenmektedir. C ve G'de kitosan tüpü saran fibröz enkapsülasyona dikkat ediniz. N: Nöron gövdesi, Ok: Akson, Asterisk: Damar, Inf: İnflamatuvar hücre infiltrasyonu. K: Kapsül. Metilen mavisi-Azur II x400. 63
- Şekil 4.2. Kesit alanı ve komşuluğundaki tamir alanına ait elektronmikrograflardır. Sol kolonda küçük (x12000 ya da x150000) ve sağ kolonda daha büyük (x40000 ya da x50000) büyütmede mikrograflarda aksonlarda değişen edereclerde ultrastrüktürel hasar (miyelinde kopma, erime, şişme, incelme, ayrılma) görülmektedir.. Yalnız kök hücre ve kök hücre-kitosan tüp uygulanan gruplarda dejeneratif değişikliklere aksonların remiyelinizasyonu ile giden onarım sürecinin daha ileri olduğu izlenmektedir. A: Akson; M: Miyelin . Uranil asetat-kurşun sitrat..... 64

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. BBB Fonksiyonel Değerlendirme Tablosu.....	39
Tablo 4.1. Tüm Gruplar Arasında Belirlenen Zaman Dilimlerinde BBB Skorlaması İstatiksel Analizi	44
Tablo 4.2. Tüm Grupların Belirlenen Zaman Dilimleri İçerisindeki İstatistiksel Değerleri.....	45
Tablo 4. 3. Grup İçi Günler Baz Alındığında Anlamli Korelasyon Gösteren BBB Skorlaması İstatistik Değerleri	48
Tablo 4.4. Grup İçi Günler (0. ve 1. gün) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamli İstatistik Değerleri	49
Tablo 4.5. Grup İçi Günler (0. Gün ve 1. Hafta) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamli İstatistik Değerleri	50
Tablo 4.6. Grup İçi günler (0. gün ve 3. hafta) baz alındığında BBB skorlaması anlamli İstatistik değerleri	51
Tablo 4.7. Grup İçi Günler (0. Gün ve 1. Ay) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamli İstatistik Değerleri	52
Tablo 4.8. Grup İçi Günler (1 Gün. ve 1. Hafta) bAz Alındığında BBB Skorlaması Anlamli İstatistik Değerleri	53
Tablo 4.9. Grup İçi Günler (1 Gün. ve 3. Hafta) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamli İstatistik Değerleri	54
Tablo 4.10. Grup İçi Günler (1. Gün ve 1. Ay) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamli İstatistik Değerleri	55
Tablo 4.11. Grup İçi Günler (1. Hafta ve 3. Hafta) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamli İstatistik Değerleri	56
Tablo 4.12. Grup İçi Günler (1. Hafta ve 1. Ay) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamli İstatistik Değerleri	57
Tablo 4.13. Grup İçi Günler (3 Hafta. ve 1. Ay) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamsız İstatistik Değerleri	58
Tablo 4.14. Tüm Grupların Grup İçi Belirlenen Zaman Dilimleri İçerisindeki İstatiksel Değerleri	59
Tablo 4.15. Deneklerin Akson/ Defekt Alanı, Kan Damarı/ Defekt Alanı ve Doku Cevabı İstatistiksel Sonuçları	66
Tablo 4.16. Gruplar Arası Miyelin Kalınlığı Ölçümlerinin Ck ve C Grupları Lehine Anlamli Korelasyon Gösteren İstatiksel Verileri	67
Tablo 4.17. Grup T ve Grup K Arasındaki Myelin Kalınlığı Ölçümü Anlamli İstatistiksel Verileri	67
Tablo 4.18. Grup T ve Grup C Arasındaki Myelin Kalınlığı Ölçümü Anlamsız İstatistiksel Verileri	68

Tablo 4.19. Grup T ve Grup Ck Arasındaki Myelin Kalınlığı Ölçümü Anlamlı İstatistiksel Verileri	68
Tablo 4.20. Grup K ve grup C arasındaki myelin kalınlığı ölçümü anlamsız istatistiksel verileri	69
Tablo 4.21. Grup K ve grup CK arasındaki myelin kalınlığı ölçümü anlamsız istatistiksel verileri	69
Tablo 4.22. Grup C ve grup CK arasındaki myelin kalınlığı ölçümü anlamlı istatistiksel verileri	70
Tablo 4.23. Grupların Myelin Kalınlığı Median Değerlerini Gösteren İstatistiksel Veriler. Grup Ck Lehine Anlamlı Veriler.	71
Tablo 4.24. Biyomalzemeye Doku Yanıtı Kapsamında Chitosan Tübün İç Kısmını Saran Kapsülün Mikroskopik Özellikleri Skorlanmaktadır. Her Örnek İçin Elde Edilen Total Skor Kaydedilmektedir.	73

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1. Kemik iliğinde Oil red ile boyanmış MKH'lerinde yağ hücrelerine farklılaşma.....	9
Resim 2.2 Kemik iliğinde Alirazin red ile boyanmış MKH'lerinde kemik hücrelerine farklılaşma.....	10
Resim 3.1. 4.1 mm Kalınlığındaki Bagetler Kitosan Çözeltilerine Daldırıldıktan ve Uygun Kalınlık Elde Edildikten Sonra 24 Saat Süreyle 1n Naoh'ta Bekletilmesi.	23
Resim 3.2. 1 Gün 1 N NaOH Bekletildikten Sonra Kitosan Tüplerin Bagetteki Görüntüleri	23
Resim 3.3. Kitosan Tüplerin Bagetten Sıyrılarak Ayrılması	24
Resim 3.4. Kitosan Tüplerin Bagetten Sıyrılarak Ayrılması	24
Resim 3. 5 Bagetlerden sıyrılan kitosan tüpler, uçlarından kesilip PBS (fosfat buffer saline) pH 7.4 içerisinde 24 saat bekletilmesi.	25
Resim 3. 6 Cerrahi Aşamada Kullanılan Mikronöroşirürjikal Aletler.....	29
Resim 3. 7. Kök Hücre Konmuş Chitosan tüp.....	30
Resim 3. 8. Mezenkimal Kök Hücreler.....	30
Resim 3. 9. Cerrahi Eksplorasyon Paravertebral Adeleler.....	31
Resim 3.10. Cerrahi Eksplorasyon Vertebral Alan	31
Resim 3.11. Cerrahi Eksplorasyon Spinal Kord	32
Resim 3.12. Cerrahi Eksplorasyon Spinal Kordun Transeksiyonu.....	32
Resim 3. 13. Chitosan Tüpün Yerleştirilmesi	33
Resim 3. 14. Posterior Fiksasyon Materyali	33
Resim 3. 15. Posterior Fiksasyon	33
Resim 3. 16. DiO Boyası	34
Resim 3.17. Spinal Kordu Örtün Skar Dokusu	35
Resim 3.18. Pseudomeningosel Gelişimi.....	35
Resim 3.19. Pseudomeningosel Dokusu	36
Resim 3.20. Otofaji Fenomeni	36
Resim 3.21. HÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında yerleşik LSM Pascal Zeiss marka konfokal mikroskop.....	38
Resim 3.22. BBB Testi Uygulaması	40
Resim 3.23. BBB Testi Uygulaması	40
Resim 3.24. Sakrifiye Edilen Denekten Çıkarılan Transeksiyona Maruz Birakılan Spinal Kord Dokusu.....	42

- Resim 3.25. Vertebral Kolon İçerisinde Transeksiyona Maruz Bırakılan Spinal Kord Dokusu 42
- Resim 4.1. Grup C'deki Aksonların Dil Floresan Boyası İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri. 75
- Resim 4.2 Grup T'deki Aksonların Dil Floresan Boyası İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri. 75
- Resim 4.3. Grup K'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri. 76
- Resim 4.4. Grup Ck'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri. 76
- Resim 4.5. Grup CK'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri. 77
- Resim 4.6. Grup K'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri. 77
- Resim 4.7. Grup Ck'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri. 78
- Resim 4.8. Grup Ck'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri. 78

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 3.1. Chitosan tüplerin MTT sonuçları.....	26
Grafik 4.1. BBB Skorlaması 0. Gün Grafiği.....	46
Grafik 4.2. BBB Skorlaması 1. Hafta Grafiği.....	46
Grafik 4.3. BBB Skorlaması 3. Hafta Grafiği.....	47
Grafik 4.4. BBB Skorlaması 1. Ay Grafiği.....	47
Grafik 4.5. T Grubunun Grup İçi BBB Skorlaması Grafiği.....	60
Grafik 4.6. K Grubunun Grup İçi BBB Skorlaması Grafiği.....	60
Grafik 4.7. C Grubunun Grup İçi BBB Skorlaması Grafiği.....	61
Grafik 4.8. CK Grubunun Grup İçi BBB Skorlaması Grafiği.....	61
Grafik 4.9. Grupların Myelin Kalınlığı Ölçümün Karşılaştırıldığı Grafik.....	72

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Omurilik yaralanmalarında, aksonal devamlılığı bozan patolojik süreç yol açtığı fonksiyonel kayıp yanında hasta, aile, toplum ve devlet üzerinde fiziki, emosyonel ve ekonomik boyutta tahrip edici sonuçlar doğurmaktadır. Dünyada yılda 24- 40 milyon insanın akut omurilik yaralanmasına maruz kaldığı yurtdışı yayınlarda bildirilmektedir.

Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlarda, travmatik omurilik yaralanmasından sonra fizyolojik fonksiyonun yeniden kazanılmasının mümkün olabileceği gösterilmiştir. Ancak şimdiye değin insanlarda uygulanan tedavi edici çalışmalarda, gelişen hasarı rejenerasyon süreci ile ortadan kaldıracak ve sonuç olarak tam bir fonksiyonel iyileşmeyi meydana getirebilecek bir sonuç alınamamıştır. Son çeyrek asırda akut omurilik yaralanmasını takiben ortaya çıkan sekonder hasarı meydana getiren 25 farklı mekanizma tanımlanmıştır. Deneysel alanda bu hasarı engelleyebilecek çeşitli farmakolojik çalışmalar yapılmış önemli adımlar atılmıştır. Fakat rejenerasyon sürecinin temini konusunda henüz yolun başında olduğumuz söylenebilir. 20. yüzyılın başında Ramon Y. Cajal'dan bu yana çeşitli araştırmalar ve deneysel çalışmalar yapılmaktadır. 1980'li yıllarda Aguayo ve arkadaşlarının öncü çalışmasında, “santral sinir sisteminde bulunan nöronların uygun ortamda aksonları geliştirme kapasitesine sahip olduğu” nun ortaya konmasından sonra, hasarlı santral sinir sistemi aksonlarının periferik sinir implantı içerisinde başarılı bir şekilde uzanımlarının sağlanması amaçlanmıştır. Birçok biyomateryal bu çalışmalarda kullanılmıştır. Fakat fonksiyonel bir aksonal büyüme elde edilememiştir. Moleküler düzeyde buna neden olan bir çok inhibitör faktör tanımlanmış ve bu yönde çalışmalar hız kazanmıştır. Bugün gelinen nokta itibarıyla rejenerasyon çalışmalarından elde edilen iyi sonuçların insan omurilik yaralanmalarına yönlendirilmesinde ve uygulanmasında istenilen seviyeye gelinememiştir.

Rejenerasyon ile ilgili transplantasyon çalışmalarının odak noktası, erişkin santral sinir sisteminin(omurilik ve beyin) maruz kalınan travmaya endojen cevabının yetersiz oluşudur. Travma sonrası omurilik santral kanalının döşeyen

ependimal hücrelerin çoğaldığı, travma alanına göç ettikleri ve santral sinir sistemi diğer hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir. Bu aşamada kök hücre kaynağı olarak kullanılacakları anlaşılmış, endojen cevaptaki yetersizliğin buradan elde edilen hücrelerin in vitro ortamda çoğaltılması ve travma alanına değişik yöntemlerle eksojen transplantasyonu ile aşılabileceği düşünülmüştür. Ancak lezyonun büyüklüğü ile omurilik yaralanması olan hastaların bir kısmında meydana gelen ağır aksonal parçalanma, fonksiyon ve doku kaybını daha da artmaktadır. Bu kayıpların giderilmesi zor ve rejenerasyon için geriye kalan doku yetersiz olmaktadır. Buradan yeterli sayıda aksonun üzerinde gelişip büyüyebileceği ve hasarlı alanı dolduran ve lezyonun her iki ucunu birbirine yaklaştıran bir “köprü yapı”nın sağlanması gerekliliği doğmuştur. Hasarlı omurilikte sinir köprülerinin oluşturulmasında hücrenel veya hücrenel olmayan greftleri kullanılmakta olup doku mühendisliği tekniklerinden faydalanılmaktadır. Bu teknikler içerisinde hücrenel greftler en sık kullanılsa da transplante edilen hücrenel greftlerin yetersizlikleri bunların hücrenel olmayan implantlar aracılığıyla ulaştırılması gereksinimini ortaya koymuştur. Bu amaçla omurilik yaralanmalarının rejenerasyon sürecinde omurilik yapısı ile uyum gösteren, omurilik dokusu için toksik olmayan rejenerasyon evresinde bütünlüğünü bozulmadan koruyabilen, rejenerasyon sonrası ortamdan uzaklaşan, mekanik direnci oldukça iyi olan biyomateryaller üzerinde çalışılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, insanlarda ağır omurilik yaralanmasının bir benzeri olan deneysel transeksiyon modelinde ikincil süreçte gelişen hasar alanına erişkin insan mezenşim kaynaklı kök hücrelerin bir biyomateryal olan Chitosan tüpler aracılığıyla ekstramedüller olarak implantasyonunun sonuçlarının değerlendirmektir. Bu biyomateryalin transplante edilen kök hücrelerin çoğalma, yaşam süresi- yaşamda kalma, farklılaşma ve göç etme kabiliyetleri üzerindeki etkisi araştırılmış, bu tip kök hücrelerin biyomateryalle birlikte kullanımının hasarlı alanın proksimal ve distal kısmı arasında köprü yapı oluşturma kabiliyeti, biyouyumluluğu, biyobozulabilirlik ve toksisitesi irdelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Omurilik Transeksiyonu Sonrası Hücresel Düzeyde Meydana Gelen Değişiklikler

Travmatik omurilik yaralanmaları sonucu lezyon alanında oldukça karmaşık patofizyolojik cevaplar ortaya çıkmaktadır (1, 2). Birincil hasara ek olarak erken dönemde kanın ekstravaze olması sonucu monosit, lenfosit ve inflamatuvar ajanlardan oluşan hematojen bir pıhtı lezyon alanını doldurur. Yine bu dönemde ekstrasellüler sıvı bileşimine glutamat ve aspartat gibi ekstatör nörotransmitterlere ek olarak hücre içi protein depolarından demir salınır ve oksijen radikallerinin katalizi başlar. Aşırı kalsiyum ve potasyumun ortaya çıkması sonucu proteazlar işleme koyulur ve büyüme faktörleri gibi nöromediatörler lezyon alanına toplanır. Vasküler yapının da zedelenmesi sonucu oluşan vazospazm lokal iskemi, hipoksi ve hipoglisemiye tetikler. Tüm bu faktörler lezyon alanında nöronal ve glial hücrelerin ölümüne ve aksonal dejenerasyona yol açar. Ekstrasellüler ortamdaki bu değişiklikler glial hücrelerde eser miktarda bulunan trofik faktörlerin artmasına ve yeni moleküllerin ekspresyonuna yol açarlar(3). En belirgin eksprese edilen moleküller difüzyon gösteren polipeptid faktörler, membran ilişkili çeşitli makromoleküller, ekstrasellüler adezyon molekülleri ve membran propeptidleridir. Moleküler düzeyde gerçekleşen birincil değişiklikler GFAP düzeyinde ve MHC antijenlerinin indüksiyonunda artıştır (4, 5) olup bunu laminin, kollajen tip IV ve fibronektin glikoproteinlerin gibi nörotrofik ajanların indüksiyonu izler. Lezyonu takiben hücresel düzeyde astrositlerin mimarisi ve membran bileşimi de değişikliklere uğrar. Nöral hücre adezyon moleküllerinin salınımı ve gap bileşkelerinin sayısı belirgin olarak artar (6) ve değişik türde sitokin, proteaz, lökotrien ve süperoksit gibi biyoaktif molekül salınır. Ekstrasellüler lanan geçen bu maddelerin dejenerasyon ve rejenerasyon sürecindeki rolü henüz tam aydınlatılamamıştır.

Travmatik hasara erken cevabın sonucu olarak hem glial hem non- nöronal hücrelerde belirgin hipertrofi, proliferasyon, migrasyon ve farklı bir fenotipe geçiş görülür. Bu olaylara dizisi sonucu reaktif gliosis gelişir (7). İlk yapısal cevaplar 5- 20 dakika içerisinde lezyonun merkezinden nöropile doğru başlar, lezyon sonrası 2- 3

haftada pik yapar. Yoğun gliozis genellikle beyaz cevher alanında görülür. Makrofajların birincil lezyondan 2 sene sonra dahi hasarlı bölgede gösterilebilmiş olmaları (8, 9) etkilenmiş SSS alanında fizyolojik özellikleri etkileyebilecek metabolik değişikliklerin çeşitliliğini göstermektedir.

SSS'de gri cevheri direkt olarak etkileyen travmalarda nöronal yanıt ya hücrenin birincil travmaya sonucu ölümü ya bahsedilen ikincil süreçler sonucu nöronal çevrenin bozulması ve apoptozisi tetiklemesidir. Aksonal etkilenme hücre gövdesine yakın olduğu koşullarda retrograd hücre ölümü de meydana gelmektedir. Lezyonun beyaz cevheri etkilediği durumlarda erişkin nöronların çoğu yaşamda kalmaktadır.

2.2. Aksonal Dejenerasyon ve Rejenerasyon

Lezyon sonrası aksonlar tam olarak parçalandığı veya ezildiği zaman proksimal ve distal ana iki bölüme ayrılır ve travma sonrası bu uçlara potansiyel bir boşluk bırakarak büzülür. Lezyon sonrası 1. ve 8. günler arası aksoplazma, hücre iskeletinin parçalanması sonucu granüler bir hal alır. Bu evreye myelin retraksiyonu, veziküler şişme- dağılma eşlik eder (7, 10, 11). Geriye kalan myelin debris makrofajlar ve aktif mikrogliyal hücreler tarafından fagosite edilir. SSS'de myelin debrisin uzaklaştırılması PSS'de olduğundan daha yavaştır (12). Distal uç tedricen kaybolurken proksimal uçta büyüme konisi ortaya çıkar. Lezyonu takiben ilk 3 hafta içerisinde erişkin memeli SSS'de ilk aksonal büyüme cevabı belirir. Filizlenen aksonlar ya 1mm. kadar çok kısa mesafelere uzanırlar dejenere olurlar veya lokal olarak lezyon sınırında sonlanırlar (9, 10). SSS'de birçok filizlene akson lezyon yerine girmeyi başaramaz. Geline nokta SSS'de erişkin bir nöronun bir aksonla yeniden bağlantı kurmasının lezyon alanındaki büyüme ile ilişkili genlerin kabiliyetine, büyüme faktörlerinin nöritler tarafından kullanım kapasitesine, büyümeyi inhibe eden moleküllerin varlığına ve reaktif gliozis oluşumuna bağlı olduğu anlaşılmaktadır.

Rejenerasyonda içsel ve dışsal belirleyici faktörlerden bahsetmek mümkündür. Aksonal yaralanma sonrası nöronlar gen ekspresyonunda değişikliklere

giderek aksonal rejenerasyonda etkili olan GAP- 43, c- fos, c- jun ve KROX 24 gibi transkripsiyon faktörleri ve tubulin ve aktinin gibi büyüme ile ilişkin faktörlerde selektif artışlara yol açarlar. Bu aksonal rejenerasyonu uyarıcı bir sinyal vazifesi görmektedir. Bu faktörlerin transkripsiyonun artan salınımı en azından erken perinatal periyod esnasında SSS aksonlarının rejenerasyonunu destekler ve nörit gelişimini intrensek bir belirleyicisi olarak bir fonksiyon ortaya koyar (13, 14). Fakat matür nöronlarda bu durum SSS'deki aksonal rejenerasyonu gerçekleştiremeyebilir. Aksonal yeniden gelişimin devam ettirilmesinde gerekli olan nörit gelişimini teşvik eden faktörlerin yokluğu, büyümeyi önleyici bileşenlerin varlığı ve aksonal rejenerasyonun bir fiziksel engelleyicisi olan skar dokusu oluşumu esasen rejenerasyon oluşumunu engelleyen başlıca dışsal faktörlerdir. Yapılan çalışmalarda SSS lezyon alanında FGF ve CNTF gibi nötrofik faktörlerde artmanın gösterilmesi ile nörotrofik aktivitenin tam yokluğundan daha ziyade yetersiz olduğu düşüncesi ön plana çıkmıştır (15, 16). Kültür ortamında yapılan en uygun nörotrofik faktörlerin belirlenmesine yönelik çalışmalarda nörit gelişimini inhibe eden moleküller de gösterilmiştir (17). Başlıca anti nörotrofik faktörler olarak NI 35/250, MAG, TEN- C, HSPG, KSPG ve CSPG sayılmaktadır. Bunların aksonal elongasyonu çeşitli kaskatlarda inhibe ettiği belirlenmiştir (18, 19). Özellikle ezyon sonrası astrositlerce salınan ve nöronal gelişimi engelleyen TEN- C, nöronların migrasyonu ve adhezyonunu engelleyen bir glikoproteindir (20, 21). ECM'nin çok yaygın bileşenlerinden olan proteoglikanların ise rejenerasyonda hem trofik hem de büyümeyi engelleyici yönde etkili olabileceği gösterilmiş ve bu moleküller üzerinde çalışmalar devam etmektedir (22, 23, 24). SSS'de lezyon sonrası teşekkül eden glial skar dokusu aksonal gelişimi devam ettiren yapı, yüzey ve trofik/ tropik faktörler bakımından uygunsuzdur ve aksonal rejenerasyonun mekanik bir bariyeri olarak hareket eder (18, 19, 25). Bu skar dokusu içindeki nörotrofik faktörlerin de eksikliği ve bir başka geçirgen olmayan komponent- bazal lamina- bulunması rejenerasyonu engelleyen diğer bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (26).

SSS'de aksonlara olan hasar öncelikle distal kökün tam dejenerasyonu ve proksimal aksonların kısmi dejenerasyonu ve retraksiyonu ile sonuçlanır. Proksimaldeki kesik uçlarda hasar lanamı doğrultusunda ilerleyen büyüme eğrileri

oluşur. Bu terminal filizlenmeler geçici olup kısa bir süre sonra ortadan kalkar ve asla harslı alan içerisine 1mm.'den fazla uzanmaz (10, 19). Bu filizlenmeler büzülür ve genellikle kesilmiş olan aksonun proksimal kökü tekrardan ölür. Bu durumda 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. Kollateral ve terminal filizlenme sadece küçük ve myelinsiz bölgelerde yer almaktadır (27, 28). 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 ekstresek belirleyiciler tarafından kontrol edilir (29). Yeniden büyüyen aksonların bir diğer büyük sıkıntısı skar engelinin üstesinden gelir gelmez daha önceki hedeflerine ve doğru hedef nöronlarına ulaşmak için doğru yolu seçme problemidir. Çalışmalarda bu problemin çözümünde normal sinir sistemi gelişimi göz önüne alındığında bu gelişimin çevredeki substratların moleküler bileşimine bağlı olduğu gösterilmiştir. Büyüme konilerinin çeşitli destekleyici ve itici rehber moleküller – örneğin NGF- aracılığı ile hasarlı yollar boyunca uzantılarının gelişimini sürdürdükleri belirlenmiştir (30). Alternatif olarak büyüme konilerinin iyonlar ve transmitterlerin diffüze olabilen büyüme faktörleri tarafından yönlendirildiği kabul edilir ve çok olası olarak denerve olan hedeften salınan bu faktörler yeniden büyüyen aksonları uygun lokalizasyonlara çekebilir (31, 32). Son aşamada, yeniden büyüyen aksonlara hedef nöronlarla sinaptik teması, ileti hızı ve aksiyon potansiyali amplitüdü gibi normal fonksiyonel özelliklerini yeniden kazanmalıdır.

Aksonal rejenerasyonun doğru ve istenilen düzeyde ortaya çıkmasını sağlamak için öncelikle intrinsek nöronal kapasitenin, rejenerasyonu destekleyen proteinlerin salınımı (GAP- 43, Bcl-2, c- Jun gibi) ve nörotrofik faktörlerin (NGF, NT-3,NT-4/5,BDNF gibi) verilmesi yollarıyla arttırılması gerekmektedir. İkincil ve eşzamanlı olarak ekstresek çevrenin hücrel olmayan rehber protezler, fetal nörol doku ve glial hücreler kullanılarak değiştirilmesi önemlidir. Skar dokusu

geçirgenliğinin arttırılması ve büyümei inhibe eden faktörlerin etkinliğinin ortadan kaldırılması diğer önemli bir husustur.

2.3. Santral Sinir Sisteminde Travmaya Cevap

Travmadan sonra SSS'de kan akımı otheregölasyonu bozulduğu için hiperemi gelişir (33, 34), lokal kan akımı azalır. İskemiye maruz kalmış alan nekroza gider ve fonksiyon kaybı gelişir. İskemik alanda meydana gelen ödemin etkisi ile normal dokudaki beslenme de bozulur. Normalde sinir dokusu metabolik ihtiyaçlarını aerobik glikolizden karşılamaktadır. Oksijensiz ortamda doku anaerobik glikoliz kullanmak zorunda kalmaktadır. Süreç hücrelerde ATP miktarının azalması ile başlamakta ve Na/K pompasının işlevini yitirmesi ile birlikte hücre içinde biriken Na iyonu ekstrasellüler alana taşınmamaktadır. Oluşan iyonik gradientin etkisiyle Cl elementinin de hücre içine girişiyle birlikte aquaporin kanallarından suyun hücre içine hızlı akımından dolayı sitotoksik ödem meydana gelir. Belli bir süre sonra intrasellüler ödem ve hiperosmalaliteden dolayı hücre ölümü - onkozis- meydana gelir. Onkoziste hücre içi Ca birikimi en önemli rolü oynamaktadır. Artmış intrasellüler Ca konsantrasyonu: lipid peroksidaz, proteaz, fosfolipaz A2 ve C gibi hücre içi enzimlerin aktivasyonuna neden olur. Bu durum membran hasarına yol açarak sitotoksik ödemde artışa yol açar. Mitokondriyal elektron transport zincirinin kırılmasıyla serbest oksijen radikallerinin de özellikle membran üzerinde birikmesiyle nöroprotektif etki ortadan kaybolmaktadır (35, 36). Kaspaz, translokaz, endonükleaz gibi enzimlerin Ca etkisinde aktivasyonu ile DNA hasarı meydana gelmekte apoptozis tetiklenmektedir (35).

Erişkin memeli SSS trofik faktörlerle yönlendirilen ve kontrol edilen hem multipotent hem de soy kısıtlı kök hücrelere sahiptir (37, 38). Bu hücreler özellikle subependim tabakasında bulunmaktadırlar. Travmaya cevap olarak ependimal hücre proliferasyonu değişik tip omurilik travma modellerinde gösterilmiştir (39, 40). Alt vertebralılarda omurilik ependimindeki hücreler çoğalma, göç etme ve farklılaşma özellikleri ile nöronal rejenerasyonda belirgin rollere sahiptir (41, 42). Tam omurilik kesisinde rejenerasyonu sağlamak için bu ependimal hücreler uzun çıkıntılarını kılavuzluk için rejener santral aksonlara uzatırlar. Daha sonra çoğalan ependimal

hücreler BOS ile temasa geçerek nöronlara farklılaşır ve rejenerasyon için omurilikte rostral aksonlarını gönderir (43). Erişkin memelilerde travmaya maruz kalmış omurilikte epandimal çoğalma ve aktivite vardır. Ancak bu hücrelerin alt vertebra grubundaki kadar rejenerasyonda faydalı olup olmayacağı bilinmemekte ya da en azından yetersiz olduğu şimdilik kabul edilmektedir (44, 45, 46). Erişkin memeli omurilikte stem/ progenitor hücrelerin travma sonrası çoğalma, migrasyon ve farklılaşma gibi özelliklerinin olmasına rağmen SSS'nin normal hücresel mimarisini yeniden yapılandırma yeteneğinin olmadığı belirgindir. Endojen nöral stem/ progenitor hücrelerin, nötrofinlerle veya diğer ajanlarla veya transplante nöral kök hücrelerle desteklenmesinin özellikle omurilik yaralanmalarının tedavisinde gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

2.4. Erişkin Mezenşimal Kaynaklı Kök Hücreler ve Rejenerasyon Yetenekleri

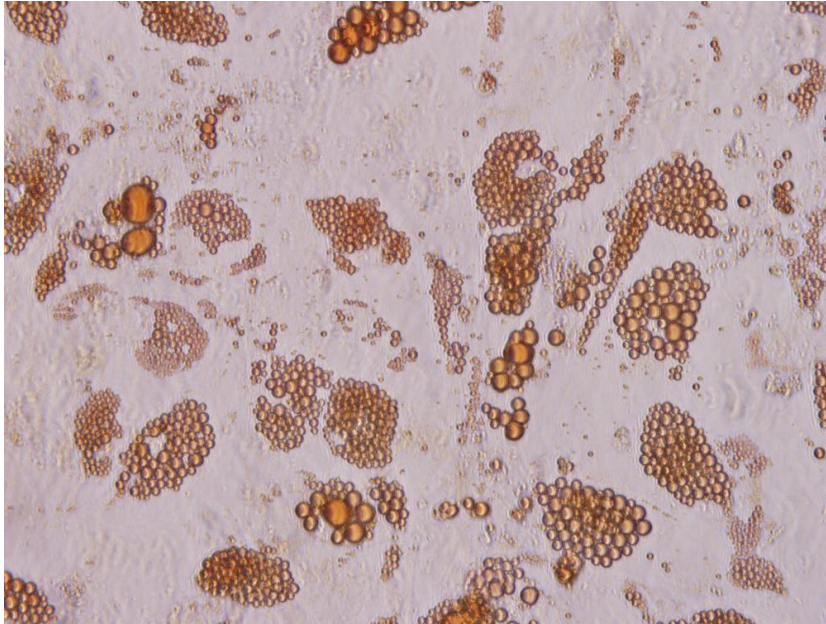
Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) sahip oldukları çeşitli biyolojik özellikler nedeni ile nöronal, embriyolojik ve hematopoetik kök hücrelere göre çeşitli avantajları vardır ve bu nedenle uygulamalarda öncelikli olarak düşünülebilirler (47, 48). Bu avantajlar:

- 1- Kolayca izole edilebilmeleri ve kültür ortamında çok sayıda çoğaltılabilmeleri
- 2- In vitro pasajlama sırasında genetik anormalliklere yatkınlıklarının daha az olması nedeni ile diğer kök hücrelere göre daha düşük oranda kanser riski taşımaları
- 3- Rejeksiyonu önlemek için immünsüpresif tedaviye gerek olmadan otolog olarak verilebilmeleri
- 4- Hipoimmünojenik olmaları nedeni ile allojenik MKH uygulamalarına olanak sağlamaları
- 5- Intravenöz yolla verildiklerinde hasarlanmış dokuya yerleşebilmeleri

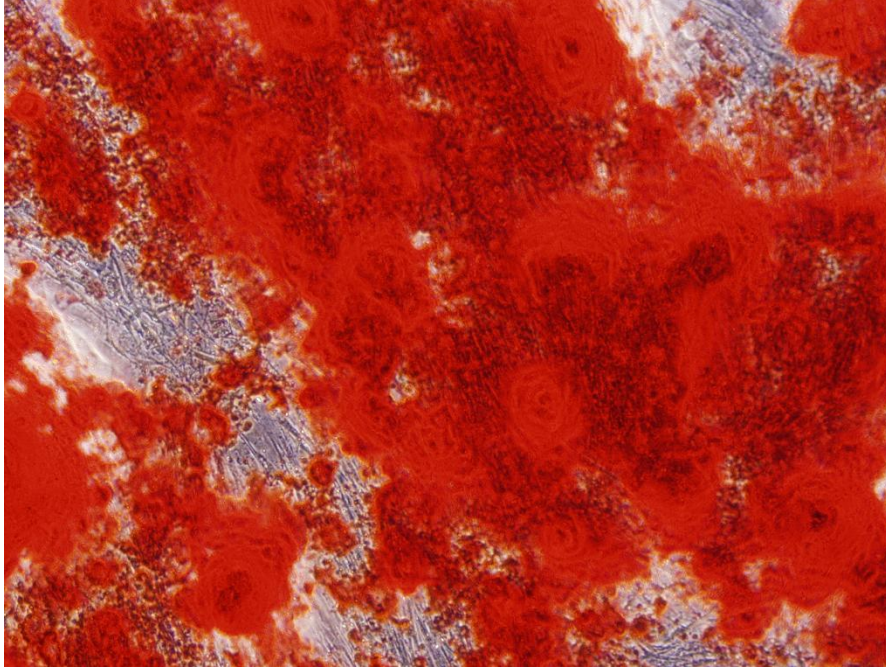
6- Etik olarak en uygun kök hücre çeşidi olmaları

Kemik iliği, MHK'leri en bol bulunduran, en güvenilir ve buna bağlı olarak da klinik uygulamalar için en sıklıkla kullanılan MHK kaynağıdır. Kemik iliğinde bulunan MHK'ler kemik iliği stromasına hamtopoetik kök hücrelerin yaşamları ve farklılaşmaları için çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler salgılamaktadırlar (49). Kemik iliği dışında MHK'lerin yağ dokusu, periosteum, synovial membran, synovial sıvı, iskelet kası, dermis, umbilikal kord kanı, plasenta, karaciğer, dalak, timus gibi çok çeşitli organ ve dokularda buldukları bilinmektedir (50, 51, 52, 53).

Tanımı gereği MHK'lerin kemik, kırıldak, ve yağ dokusuna dönüştüğü bilinmektedir. Bunun dışında MHK'lerin hem mezenkimal, hem de mezenkimal olmayan çok farklı hücre tiplerine dönüşebildikleri gösterilmiştir: miyosit, kardiyomiyosit, hepatosit, insülin üreten hücreler, endotelial hücreler, epitelyum hücreleri, epitelyum benzeri hücrelere, nörona farklılaştıkları gösterilmiştir (50, 54, 55).

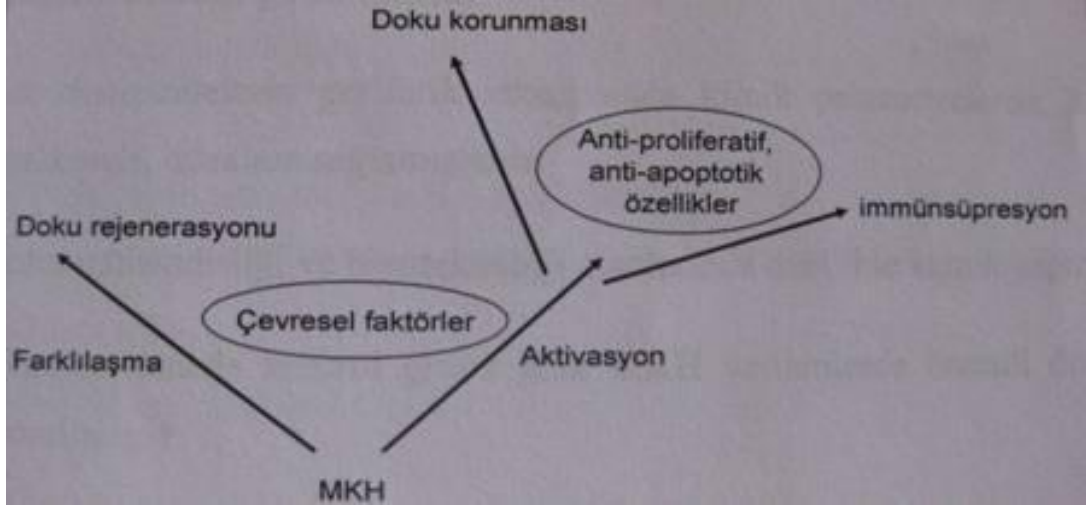


Resim 2.1. Kemik İliğinde Oil Red İle Boyanmış MKH'lerinde Yağ Hücrelerine Farklılaşma



Resim 2.2 Kemik İliğinde Alirazin Red İle Boyanmış MKH'lerinde Kemik Hücrelerine Farklılaşma

MHK'lerin biyolojik etkilerine neden olan moleküler mekanizmalar tam anlaşılammıştır (56). Farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmak için potansiyel bir role sahip olacağı düşünüldüğü için MHK'lerin biyolojilerinin anlama konusunda ilgi giderek artmaktadır ve bu konuda bilgilerin artması ile MHK bazlı tedaviler için protokoller konusunda daha fazla ilerlemeler sağlanabilecektir (54, 57). Diğer kök hücrelerde olduğu gibi MHK'lerin de hasralanmış bölgelere gittikleri ve bu bölgelere yerleştikleri bilinmektedir (49). MHK'lerin tedavide kullanımları ile ilgili iki önemli fonksiyonları vardır. Birincisi, hücre ölümünü geciktiren ve doku tamirini sağlayan trofik etkileri, ikincisi hücre bazlı tedaviler için önemli olan multipotansiyel farklılaşma özelliğidir (Şekil 1.1., 58).



Şekil 2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Doku hasarında Olası Yarar Mekanizmaları

MHK'ler özellikle son yıllarda artan bir hızla çok farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Aşağıda bu uygulamalar ile ilgili örnekler verilmiştir (47,48, 54, 55, 59, 60, 61).

1- Kanser hastalarında hematopoezi destekleyici etkilerinden dolayı kemoterapi ve radyoterapi sonrası kemik iliği düzelmesini hızlandırdıkları gösterilmiştir.

2- Otolog olarak verilen MHK'lerin, toksisite ve yan etkilere neden olmadan, hematopoetik kök hücre transplantasyonlarında engraftman (yamanma) süresini kısaltmıştır.

3- Hematopoetik kök hücre transplantasyonunun en önemli komplikasyonlarından olma akut graft versus host hastalığı önlenmesinde ve tedaviye dirençli ileri evre akut graft versus host hastalığı vakalarının düzelmesinde etkili olmuştur.

4- Ağır anaplastik anemide kemik iliği stromal fonksiyonlarında düzelmeye sağlamıştır.

5- Osteogenesis imperfekta vakalarında MHK verilmesi ile büyüme hızında ve kemik mineral dansitesinde artış olduğu gösterilmiştir.

6- Chron hastalığında kullanımları ile, klinik düzelme ve fistüllerin kapandığı bulunmuştur.

7- Myokard infarktüsünde kardiyak fonksiyonların düzeldiği ve perfüzyon defekti olan shaların azaldığı gösterilmiştir.

8- Alt ekstremitelerin periferik iskemisinde klinik parametrelerde, kronik iyileşmeyen cilt yaralarında düzelme sağlanmıştır.

9- Doku mühendisliği ve biyoteknoloji alanlarında özellikle kemik yapımında kullanılmaktadır.

10- İskemik inmede kontrol grubuna göre MHK verilenlerde önemli derecede düzelme olduğu gösterilmiştir.

11- Hurler sendromu ve metakromatik lökodistrofide MHK'lerin iyi tolere edildiği ve nörolojik fonksiyonlarad düzelmeye neden olduğu bulunmuştur.

12- Amiyotrofik lateral skljeroz ve multiple sklerozda önemli bir yan etkiye neden olmadan klinik fayda sağladıkları gösterilmiştir.

Yukarıda anlatıldığı gibi MHK'ler çok farklı hastalıkların tedavisi için denenmiştir ve daha başka dajaneratif hastalıkların tedavisinde MHK'lerin potansiyal kullanımları konusunda da önemli beklentiler vardır (48). Fakat, MHK'lerin klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmadan önce işlev ve kabiliyetlerini anlamak için temel araştırmalara devam edilmelidir. Çeşitli hastalık modellerinde MHK verilmesi sonrası görülen klinik düzelmelere neden olan moleküler mekanizmaların anlaşılması gerekmektedir (55).

Otolog veya allojenik MHK'lerin kullanımlarının olumlu ve olumsuz yönlerinin belirlenmesi MHK tedavileri konusunda önem taşımaktadır (55). MHK'lerin düşük immüniyete sahip olmaları, allo- reaktif lenfosit çoğalmasına neden olmamaları, T lenfosit çoğalmasını baskılayarak immün cevabın modülasyonuna neden olmaları nedeni ile allojenik olarak uygulanmaları durumunda rejeksiyon riskinin düşük olduğu bilinse de bazı hayvan modellerinde allojenik MHK'lerin rejeke edildiği gösterilmiştir (36, 51, 62). Otolog MHK'lerin kullanımı ile immün rejeksiyon ve karsinogenez riski en aza inmektedir (52, 63). Ayrıca otolog MHK'lerin immünsupresif tedavi verilmeden uygulanabilmeleri de bir başka avantajlarıdır. Fakat otolog kullanım için hastanın kemik iliğinin en azından "normal ve sağlıklı" olduğunun, dolayısı ile MHK'lerin sağlıklı olduğunun bilinmesi gerekmektedir (63). Bazı çalışmalarda, dejeneratif hastalıklarda MHK'leri farklılaşma potansiyellerinin baskılandığı gösterilmiş, bazı çalışmalarda bu hastalıklarda MHK'lerin normal farklılaşma özelliklerini koruduğu gösterilmiştir (51). Bu nedenle otolog MHK kullanımı için MHK'lerin normal fonksiyonlara sahip olduklarının gösterilmesi gerekmektedir (64).

MHK'ler nörotrofik etkileri, bunun yanı sıra nöron, glia ve kas hücrelerine farklılaşabilme özellikleri nedeni ile yarar sağlayabilirler. MHK'lerin kan- beyin bariyerini geçebilecek migrasyon yeteneğine sahip olmaları bir diğer önemli özellikleridir (49). Bu özellik invazif cerrahiye gereksinim duymadan periferal yoldan verildiğinde santral hedeflere ulaşabileceği konusunda umut vermiştir. Böylece yerel glial skar oluşumu, yaygın glial aktivasyon ve inflamatuvar faktör salınımından kaçınılmış olacaktır (65). MHK'lerin distrofin ekspresyonunu arttırdığı ve kas hücrelerine dönüştüğü için kas hastalıklarının tedavisinde etkili olması düşünülmektedir (66).

2.5. Mezenşim Kaynaklı Kök Hücrelerin İşaretlenmesi ve Transplantasyonu

Transplantasyon çalışmalarında transplante edilen hücrelerin kesin olarak tanınması dışında alıcı dokuya uyum sağladıklarının ve orda yaşadıklarının gösterilmesi gereklidir. Bu transplante edilen kök hücrelerin in vivo tanınabilmesi için onları işaretleyen değişik yöntemler kullanılmaktadır. Hücreler transplantasyon

öncesi in vitro olarak hücre kompartmanın özgü marker ya da reporter genlerle işaretlendikten sonra in vivo tanınır ya da reporter gen eksprese eden transjenik hayvandan kaynaklanan hücreler transplantasyon sonrası alıcı doku içerisinde kolaylıkla bulunabilir. Transplante edilecek kök hücreler:

1- Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi suretiyle (Bisbenzimidide Hoechst floresan boyası ile)

2- Sitoplazmik işaretlenme suretiyle (Fast- blue, RDA, carboxyfluorescein, thiol ile)

3- Membran işaretlenme suretiyle (DiL, DiO,i PKH26 ile)

4- Reporter gen işaretlenme suretiyle (lacZ ve EGFP ile)

alıcı doku içerisinde tanınabilir hale gelebilirler.

DiL ve DiO membran işaretleyici boyaoları oldukça floresan olması ve hücre yapılarının görünmesine izin vermeleri gibi nedenlerle kök hücre işaretlenmesinde kullanılmaktadır. DiL ve DiO plazma membranın dış yaprağına geri dönüşsüz biçimde birleşen ve lateral olarak membran boyunca yayılan karbosiyanin lipofilik boyalardır. İşaretli hücrenin membranı fiziksel olarak parçalanmadıkça DiL- DiO işaretli hücreden işaretli olmayan hücreye transfer edilemez (67).

Travma sonrası hasarlı omurilik içerisine transplante edilecek kök hücrelerin etkinliği, transplante edilen hücrelerin yaşam süresini en yüksek düzeyde tutacak ve lezyon alanını en çok daraltacak greftleme metoduna bağlıdır. Transplantasyon çalışmalarının büyük çoğunluğunda verilecek olan kök hücreler SSS içerisine intraparakimal ya da direk enjeksiyon yolu ile verilmektedir (68, 69). İntratekal ve intraventriküler yolla kök hücre verilen çalışmalar da mevcut olup daha etkin bir biçimde hasarlı omurilik içerisine kök hücrelerin taşındığı çalışmalarda gösterilmiştir (69, 70). Vasküler sistem aracılığıyla intravenöz yoldan verilen kök hücrelerin metoda bağlı olarak hasarlı dokuya migre olduğu da gösterilmiştir (70, 71, 72).

Transplante edilecek kök hücrelerin hacmi transplant yerinin hacmine bağlıdır. Omurilik içerisine olası en küçük hacmi enjekte etmek en yararlıdır. Ortalama 0,5-5 mikrolitre hacimler sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre yoğunluğu ve transplante edilen toplam hücre sayısı greftleme için yeterli olacak kök hücre sayısı ve en iyi yaşam süresinin temin edilmesi gerekmektedir. Siklosporin gibi immüsupresan ajanlar hücrelerin yaşamda kalma şansı üzerinde greft rejeksiyonun boyutunun bilinmediği transplantasyon durumlarında dahi sıklıkla kullanılmaktadır (73, 74).

2.6. Mezenşim Kaynaklı Kök Hücrelerin İmplantasyonunda Biyomateriyallerin Yeri

Toplumda karşılaşılan omurilik yaralanmalarının yaklaşık 1/3'ü komplet transeksiyon kalan kısmı ise daha sıklıkla beyaz cevherin korunduğu inkomplet yaralanmalardır (75). Bu yaralanmalarda meydana gelen ağır aksonal parçalanma ve gelişen skar dokusu ile birlikte lezyon alanını geçen devamlılık halinde bir doku yer almakta 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 yapının sağlanması gereklidir.

Doku mühendisliği teknikleri SSS travması sonrası hasarlı nöral doku içerisine kök hücreleri transplante etmek için özellikle 3 boyutlu biyobozulabilir çatıları olan biyomateriyalleri kullanıma sokmuştur. Bu biyomateriyaller lezyon yerinde yeniden büyümeyi, köprü yapı oluşturulmasını ve böylece büyük nöral defektleri kapatma yeteneğinde transplante edilen hücreler için bir çatı oluşturulmasını sağlamaktadırlar (76, 77). Bu çatı aynı zamanda doku implantasyonu ile aksonal rejenerasyonu kolaylaştıran tedavi edici yöntemlerin bileşimine de izin vermektedir (78, 79). Nörotrofik faktörlerle kombine edilen çatılar kök hücrelerin farklılaşmasına neden olduğu bildirilmektedir (80). Fakat transplante edilen kök hücrelerin ekildiği sert ama bozulabilir ideal biyomateriyal implantasyonu ile ilgili

çalışmalar devam etmektedir. Başlıca köprü yapı kurmak için kullanılan materyaller aşağıda belirtilmiştir.

1- Hücresel olmayan köprü materyaller (Hidrojel, nitroselüloz membranlar, karbon filamentler, cam filamentler, gelfoam gibi)

2- Biyobozulabilir köprü materyaller (Kollajen, fibronektin, alginat/agarose, hyaluronic acid, chitosan, poly-beta-hydroxybutirate, PGA/PLA, polycarbonate, polyethylene glycol gibi)

3- Biyobozulabilir olmayan köprü materyaller (PHEMA, PHEMA- MMA, PHMPMA, PAN/ PVC, silikon gibi)

4- Hücresel köprü materyaller (Fetal SSS dokusu, Schwann hücreleri, OEGs, astroblastlar, mikrogial hücreler gibi)

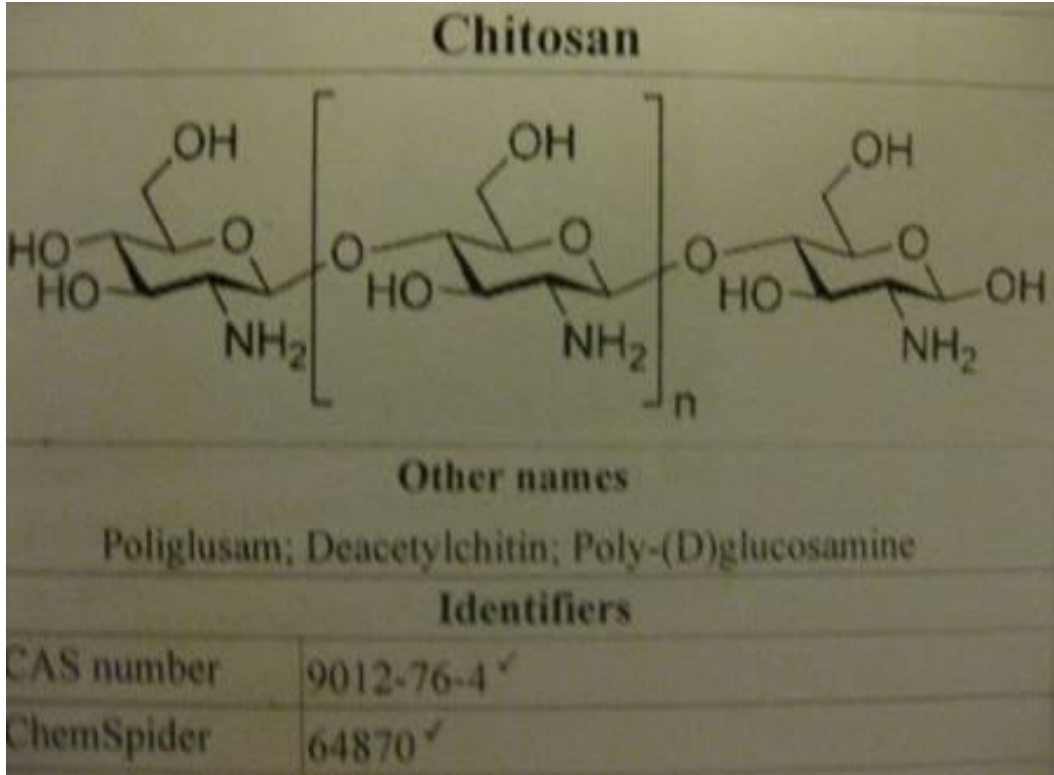
2.7. Doku Mühendisliği, Nanoteknoloji ve Nanotıp

Doku mühendisliği organ ve doku fonksiyonlarının iyileştirilmesi, korunması ve onarımını sağlayacak biyolojik yapıların geliştirilmesi üzerine mühendislik ve yaşam bilimleri prensiplerinin uygulandığı interdisipliner bir alandır (82). Nanoteknoloji nanometre boyutlarında malzemelerin anlaşılması ve kontrolünün amaçlayan bir bilim dalı olup biyolojik doğal dokuların yapısal özelliklerini taklit etmek ancak nanoteknolojinin ilgi alanına gire nanomateryaller ile mümkün olabilmektedir. Nanomateryaller farklı ve eşsiz özellikleri ile çeşitli dokuların restorasyonuna yardımcı olmaktadır (81). Nanofiberler 100 nanometre çapa sahip fiberler olup canlı dokuların birçok ekstrasellüler ve intrasellüler yapısal elemanları için temel oluşturular. Nanofiber üretmek için günümüzde en sık kullanılan yöntem elektrospin yöntemidir. Nanofiber haline getirilen biyomateryaller köprü yapı oluşturmak suretiyle kök hücre transplantasyonunda yaygın kullanılır hale gelmiştir.

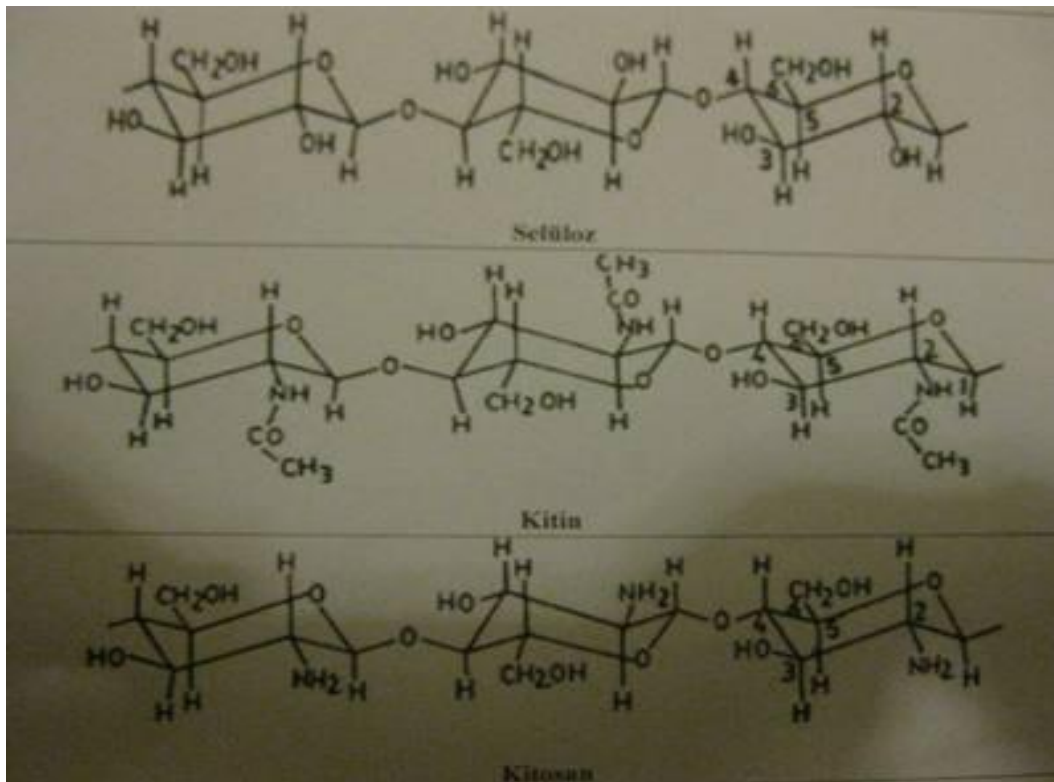
2.8. Chitosan

Chitosan, yeryüzünde selülozdan sonra en bol bulunan ikinci biyopolimer olan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir biyopolimerdir (83. 84). Kitin doğada deniz kabukluları ile kabuklu böceklerin kabuk yapısında bol miktarda bulunmaktadır. Kitinin kimyasal yapısı selülozla çok benzemektedir, aralarındaki en önemli farklılık selüloz moleküllerinin 2 numaralı karbon atomunda yer alan – OH-gruplarının yerinde asetil grupları - NHCOCH_3 yer almaktadır. Kitin biyopolimerinden chitosan elde debilmek için yüksek sıcaklıklarda ve bazik koşullar altında deasetilasyon işlemi gerçekleştirilir ve bu işlem hiçbir zaman sonlanmaz. Bu nedenle chitosan yapılarının en tipik özelliklerinden biri de deasetilasyon derecesi adı verilen kitin yapısında asetil gruplarının uzaklaştırılabilme oranını temsil eden değerdir. Öte yandan chitosan biyopolimeri bazı fungal yapılardan da izole edilebilmektedir (85). Chitosan biyopolimeri biyolojik uyumluluk özelliğinin yanı sıra biyolojik bozunabilme, toksik olmama, antifungal ve antimikrobiyal olma özellikleri gibi özelliklerinden dolayı başta biyomedikal uygulamalar olmak üzere daha birçok değişik uygulamada kullanılmaktadır. Chitosan'ın kullanılabilirliğindeki bu zenginliğin bir diğer nedeni de Chitosan'ın kolaylıkla istenilen şekil ve geometriye (membran, süngerimsi yapı, fiber, mikro ve nanoküre, tüp gibi)sahip yapılara dönüştürülebilmesidir (86, 87). Chitosan biyopolimerinde yer alan yüksek y,k yoğunluğundan dolayı polikasyonik özelliği söz konusudur ve ayrıca hidroksil ve amino grupları gibi reaktif gruplara sahiptir. Literatürde yer alan araştırmalara göre Chitosan'ın yara iyileştirme, serumdaki kolesterol düzeyini azaltma ve bağışıklık sistemini aktive etmek gibi son derece önemli fonksiyonları mevcuttur (88, 89).

Kimyasal ve biyolojik aktiviteye sahip olan Chitosan biyopolimerinin istenilen şekil ve geometride işlenebilmesi için kullanılan en yaygın yöntem Chitosan polimeri üzerinde yer alan fonksiyonel gruplar aracılığı ile bifonksiyonel çapraz bağlama ajanları (örneğin; formaldehit, glutaraldehit, etilenglikol diglisidileter gibi) ya da NaOH, tripolifosfat gibi alkalın yapılar kullanılırtak çapraz bağlama tekniği olmuştur (90). Bir diğer çapraz bağlama yöntemi ise Chitosan'ın polikasyonik yapısı dikkate alındığında beraberinde polianyonik bir yapı (örneğin; aljinat biyopolimeri) kullanılarak gerçekleştirilen çapraz bağlama işlemidir (91).



Şekil 2. 2. Chitosan'ın Biyokimyasal Yapısı ()



Şekil 2. 3. Sellüloz, Chitosan ve Kitin'in Biyokimyasal Yapılarının Karşılaştırması

Chitosan biyopolimerinin periferik sinir yaralanmalarında kılavuz kanal olarak kullanımını sınırlayan neden daha düşük mekanik dirence sahip olmasıdır. Ancak bir takım bileşenlerin eklenmesi mekanik dirençlerini arttırdı ve sinir kılavuzu olarak kullanımları yaygınlaştı (92). Biyoyumlu ve biyobozulabilir özelliğe sahip olması dışında toksik olmayan Chitosan kemirgenlerin ve köpeklerin siyatik sinir yaralanmasında onarım için yapay köprü olarak kullanıldı (93, 94). Ek olarak Chitosan'dan elde edilen tüp şeklindeki çatılar üzerinde Schwann hücre transplantasyonunun periferik sinir yaralanmasında faydalı olduğu gösterildi (95).

Biyomateryal olarak hazırlanan ideal Chitosan tüplerin optik ve elektron mikroskopi teknikleri kullanılarak morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi gereklidir. Ayrıca hazırlanan bu yapıların şişme davranışları, biyolojik uyum ve biyolojik bozulabilirlik testleri gerçekleştirilmelidir. Biyolojik uyum testlerinde ise standart bir hücre hattı (örneğin; L929 gibi) kullanılarak MTT testi yapılmalıdır; karakterizasyon işleminde hazırlama koşullarının (örneğin; molekül ağırlığı, asetik asit derişimi, sodyum hidroksit derişimi gibi) mekanik özelliklere etkilerine bakılmalıdır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya ait deney protokolü Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve 25.05.2012 tarihli oturumda 2012/32-04 karar numarası ile onaylanmıştır.

Çalışmada kullanılan denekler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Laboratuvarı'ndan temin edilmiş, çalışmada kullanılan insan mezenkimal kök hücreleri Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma Ve Uygulama Merkezi'nden temin edilmiş, çalışmanın tüm deneysel aşamaları Hacettepe Üniversitesi Nöroşirurji Anabilim Dalı Mikroşirurji Laboratuvarı'nda yapılmış, histolojik incelemeler ise Hacettepe Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda tamamlanmıştır. Bu çalışmada ağırlıkları 225 ile 275 gr. arasında değişen 32 adet Wistar-Hannover dişi sıçan kullanıldı. Deney süresince hayvanlar standart laboratuvar koşullarında (polikarbon kafeslerde, %50- 60 nem aralığında, 20- 25⁰C' de) tutuldu ve standart yem (ad labitum su ve pellet yem) ile beslendi.

3.1. Mezenşim Kaynaklı Kök Hücrelerin Hazırlanması

Sağlıklı donörlerin leğen kemiklerinden toplanan kemik iliklerinin 2 ml'sinden "Fikol Ekstrasyonu" metodu kullanılarak MKH izolasyonları yapıldı. MKH'lerin sayıca arttırılması amacıyla Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM), L-Glutamin ve Fötal Dana Serumu içeren zengin besi yerinde 37°C ve 5% CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmaları sağlandı. Kültürde çoğaltılan hücrelere Tripsin-EDTA enzimi uygulandı ve hücreler kültür kabının yüzeyinden kaldırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonundaki hücreler Tripkan Mavisini boyası kullanılarak Thoma lamında sayıldı ve hücre sayısına göre bir kısım hücre daha sonra kullanılmak üzere %10 DMSO içeren dondurma medyumunu ile -196°C'lik sıvı azot tankında donduruldu, kalan hücreler ise tekrar kültüre edildi.

Tüm karakterizasyon çalışmalarında pasaj 3 MKH'ler kullanıldı. İlk olarak inverted mikroskop kullanılarak hücrelerin morfolojik karakterizasyonu yapıldı. Daha sonra ise FACS Arıa cihazı kullanılarak MKH'lerin pozitif (CD105, CD44,

CD73 gibi) ve negatif (CD45, CD34, HLA-DR gibi) yüzey işaretleri belirlenerek immunfenotip özellikleri saptandı. Ayrıca bu hücrelerin yağ, kemik ve kıkırdak hücrelerine farklılaşmaları sağlanarak karakterizasyonları tamamlandı.

Kemik Hücre Farklılaşması: Tripsinize edilmiş olan pasaj MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek üzerine DMEM-LG içerisine %10 serum, 100 nM deksametazon, 10mM beta gliserofosfat ve 0,2mM askorbik asit ilave edilerek hazırlanmış olan osteoblast farklılaşma medyumu eklendi. 21 gün süresince 3–4 gün aralıklarla medyumu değiştirilerek takip edildi. Süre bitiminde farklılaşması beklenen hücreler Alizarin Kırmısı S boyası ile boyanarak farklılaşma potansiyeli gösterildi ve Quantichrom calcium assay kiti kullanılarak kantitatif olarak kalsiyum miktarı ölçüldü.

Yağ Hücre Farklılaşması: Tripsinize edilmiş olan MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek üzerine DMEM-LG içerisine %10 serum, 1µM deksametazon, 60µM indometazin, 500µM izobutilmetilksantin (IBMX) ve 5µg/ml insülin ilave edilerek hazırlanmış olan adipojenik farklılaşma medyumu eklendi. 21 gün süresince 3–4 gün aralıklarla medyumu değiştirilerek takip edildi ve süre bitiminde farklılaşması beklenen hücreler Oil red O boyası ile boyanarak farklılaşma potansiyeli gösterildi.

Kıkırdak hücre farklılaşması: 15 ml'lik polipropilen tüp içerisinde MKH peleti oluşturularak tüp içerisindeki hücreler 37°C'de 5% CO₂'li ve nemli etüv içerisinde 24 saat inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün DMEM-HG içerisine 1µM deksametazon, 10ng/ml TGF-β3, 50µg/ml askorbik asit ve 50mg/ml ITS+Premix ilave edilerek hazırlanmış olan kıkırdaklaşma medyumu ilave edildi. 21 gün süresince 3-4 gün aralıklarla medyumu değiştirilerek takip edildi ve süre bitiminde farklılaşması beklenen hücre peletinden 5µm kalınlığında frozen kesitler alınarak, kesitler Alsiyan mavisi ile boyandı ve farklılaşma potansiyeli gösterildi.

DiO (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) boyası ile süspansiyon haldeki MKH'lerin aşağıda tarif edilen yöntemle boyandı:

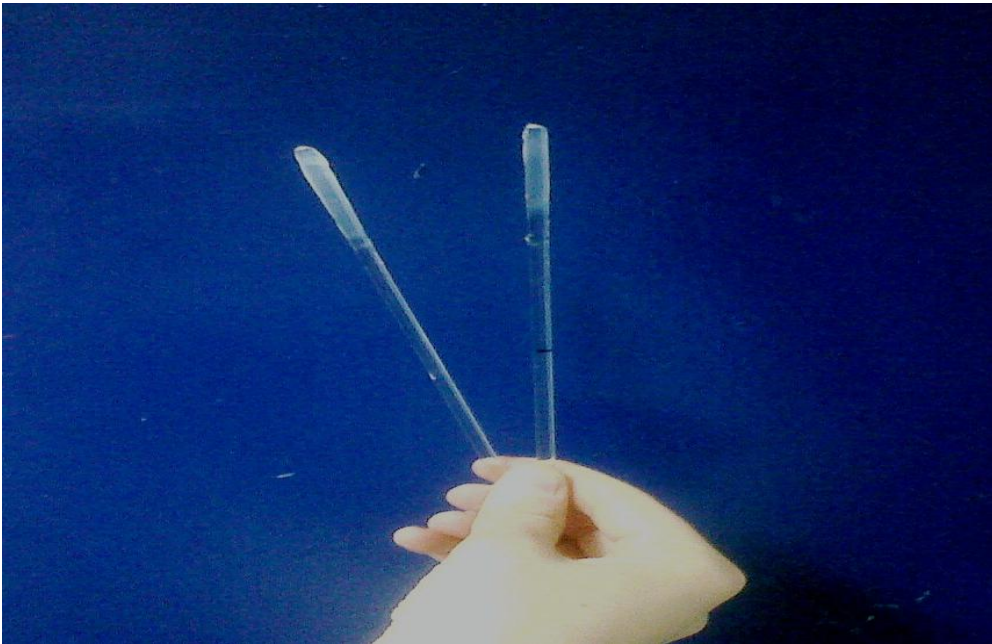
1. Serum içermeyen besiyeri içerisinde bulunan 0.5×10^6 /mL miktarda hücre pelet haline getirildi.
 2. Hücrelerin üzerine 5 µl DiO boyası eklentikten sonra yavaşça pipetlendi.
 3. Hücreler 20 dakika boyunca 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi
 4. Hücre içeren tüpler 37°C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi
 5. Süpernatant atıldıktan sonra ve pelet homojenize edilerek üzerine 37°C'de olan besiyerinden eklendi.
 6. Yıkama protokolü 2 kere daha tekrarlandı.
- İşaretili hücreler hayvanlara verilmeden önce 10 dakika 37°C'de bekletildi.

3.2. Chitosan Tüplerin Hazırlanması

%7'lik Chitosan çözeltisi, %2 'lik asetik asit içerisinde hazırlandı. Çözelti içerisindeki hava kabarcıklarının giderilebilmesi için çözelti 10 dakika süreyle ultrason banyosuna yerleştirildi. 4.1 mm. çapı olan silindirik cam bagetler daha geniş bir tüp içerisine daha küçük boyutta cam rodlar - iç çapı 2 mm.- yerleştirilmek suretiyle Chitosan çözeltisi içerisine daldırılıp- çıkarılarak sıcak hava akımında kurumaya bırakıldı. Bu işlem 3- 4 dakika arayla yinelendi. Cam baget etrafında oluşan Chitosan katmanın kalınlığı 0.21 mm. olana kadar işleme devam edildi. Daha sonra hazırlanan bu jel yapısındaki 5 cm. uzunluğundaki bu tüpler 1 N NaOH içerisinde 24 saat süreyle çapraz bağlanmaya bırakıldı. Oluşan Chitosan tüpler 3 kez PBS ile yıkandı ve 1 cm.'lik uzunluklarda kesilerek pH: 7.4 olan PBS içerisinde saklandı. Tüplerin yaklaşık olarak dış çapı 4.1mm. ve duvar kalınlıkları 0.21mm. idi.



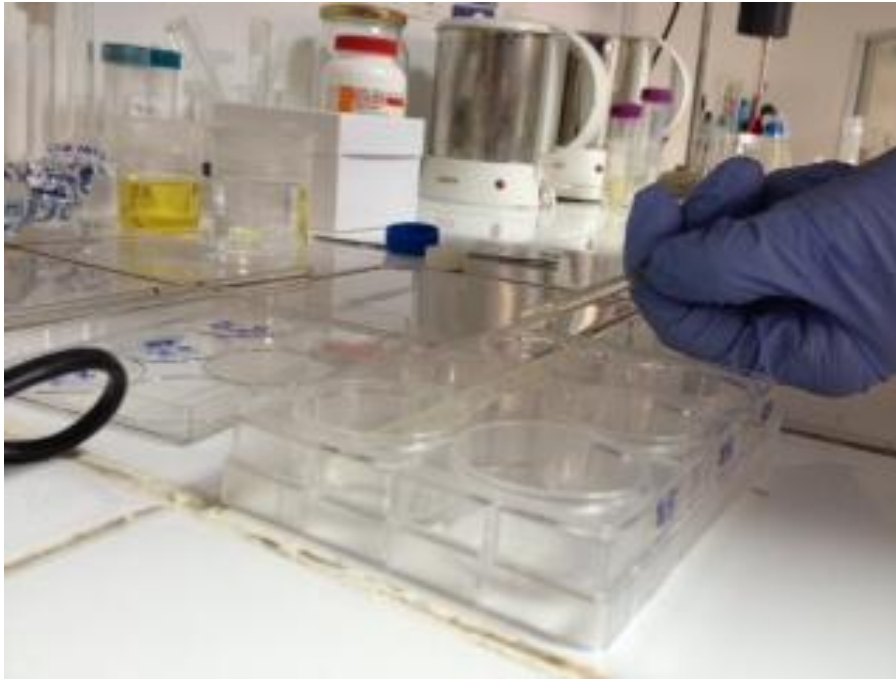
Resim 3.1. 4.1 mm Kalınlığındaki Bagetler Kitosan Çözeltilerine Daldırıldıktan ve Uygun Kalınlık Elde Edildikten Sonra 24 Saat Süreyle 1n Naoh'ta Bekletilmesi.



Resim 3.2. 1 Gün 1 N NaOH Bekletildikten Sonra Kitosan Tüplerin Bagetteki Görüntüleri



Resim 3.3. Kitosan Tüplerin Bagetten Sıyrılarak Ayrılması



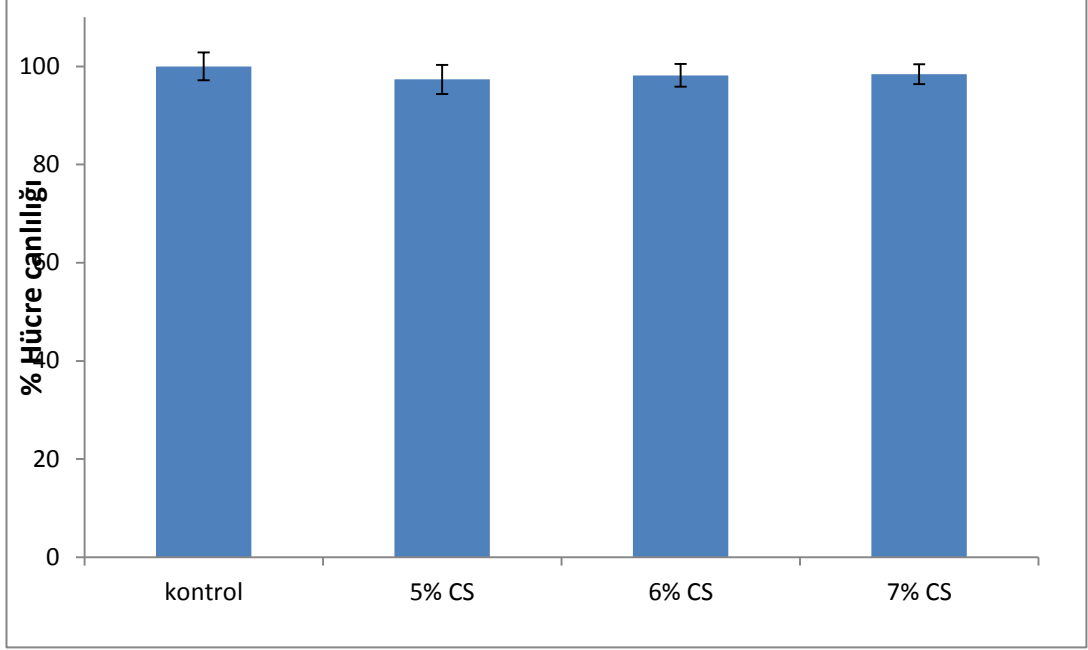
Resim 3.4. Kitosan Tüplerin Bagetten Sıyrılarak Ayrılması



Resim 3. 5 Bagetlerden Syrılan Kitosan Tüpler, Uçlarından Kesilip Pbs (Fosfat Buffer Saline) Ph 7,4 İçerisinde 24 Saat Bekletilmesi.

Chitosan tüplerin MTT sonuçları: %5, %6 ve %7 konsantrasyona sahip kitosan tüp yapıları ISO 10993 “Biyomoleküllerin in vitro sitotoksiteleri testi” prosedürüne göre test edildi. Örnek grupları 72 saat boyunca hücre besiyerinde bekletip bu besiyerleri L929 hücre hattı hücreleri ile etkileştirildi. Besi yeri %90 DMEM ve %10 FBS içeren çözeltiler olup, bu besiyerinde örnek grupları ile etkileştirilen çözeltiler herhangi bir örnek grubu ile etkileştirilmeyen besi yeri (kontrol grubu) ile karşılaştırıldı. Test edilen örneklerdeki hücre canlılıkları 24 saatlik hücre proliferasyonu sonunda MTT testi ile test edildi.

Sonuçlara göre 5%, 6% ve 7% kitosan konsantrasyonlarında elde edilen yapıların kontrol grubuna göre herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı görüldü.



Grafik 3.1. Chitosan Tüplerin MTT Sonuçları

3.3. Hayvan Grupları

Bu çalışmada 32 adet Wistar-Hannover dişi albino rat kullanıldı. Deneklerin ağırlıkları 225-275 gr. arasında idi. Çalışma süresince denekler standart post operatif bakım odasında (12 saat karanlık- aydınlık dönüşümüne sahip, 20- 25°C ısı kontrollü odalarda), standart kafeslerde (Polikarbon) tutuldu ve standart beslenme koşulları (ad libitum su ve pellet yem, ameliyat sonrası 2 gün boyunca günde 3 kez gavaj ile beslenme) sağlandı. Çalışma sonunda histopatolojik çalışma için örneklerin alınması amacı ile denekler kurban edildi. Sonuçlar fonksiyonel, histopatolojik, elektron mikroskopisi ve konfokal mikroskopisi ile değerlendirildi. Çalışmada denekler 4 ana gruba ayrıldı.

- Grup T (Sadece transeksiyon yapılan grup), n=8:
- Grup K (Transeksiyon sonrası sadece MHK verilen grup), n=8:
- Grup C (Transeksiyon sonrası Chitosan tüp yerleştirilen grup), n=8:

- Grup CK (Transeksiyon sonrası Chitosan tüp içerisinde MHK verilen grup), n=8:

3.4. Anestezi

İki saatlik açlık sonrasında deneklere 1mgr/kg ketamin (Ketalar, Phizer) ve 1mgr/kg xylasin (Alfazyne, Alfasan) intraperitoneal olarak verildi ve denekler spontan solunuma bırakılarak cerrahi işlemler yapıldı.

3.5. Omurilik Transeksiyonu Oluşturulması ve Transplantasyon

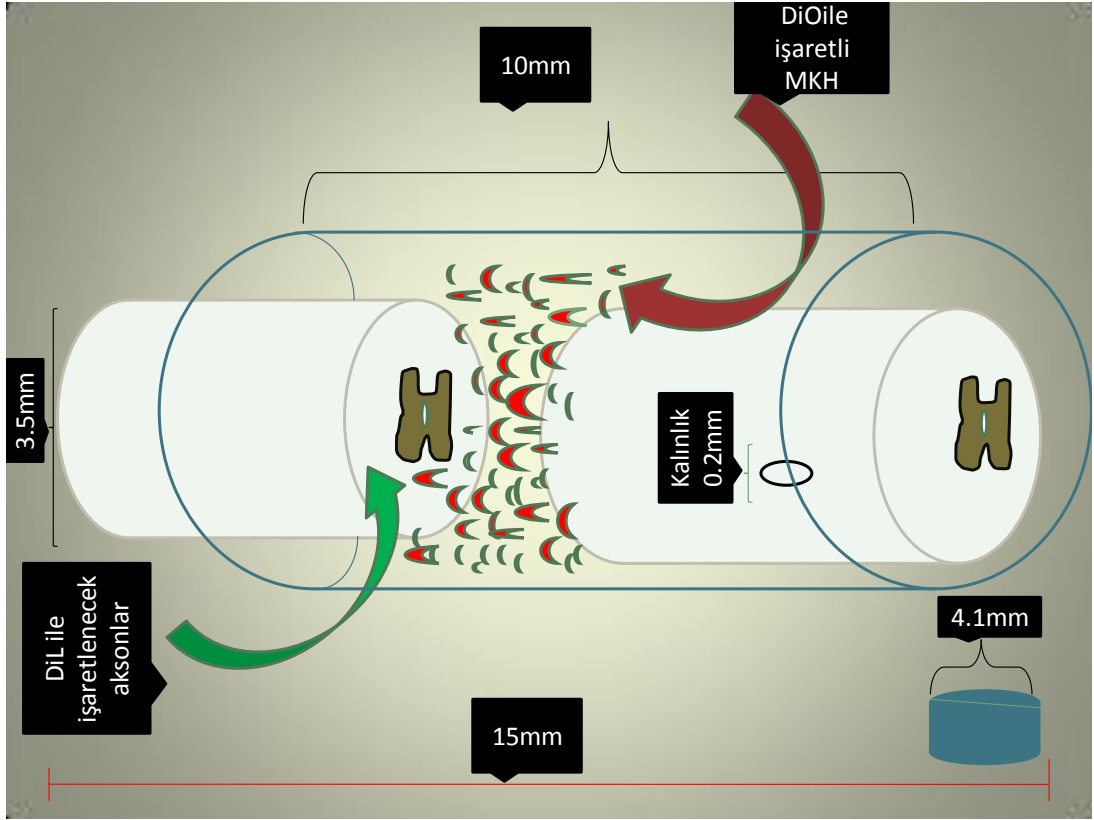
Cerrahi uygulamalar Zeiss Opmi99 laboratuvar mikroskobu ve mikrocerrahi aletleri kullanılarak gerçekleştirildi. Anestezi sonrası denekler baş hafif fleksiyonda prone pozisyonda tespit edildi. Mesafe tayinini takiben cerrahi alan traş edildi ve lokal antiseptiklerle (Batticon ve hidrojen peroksit) yıkandı. Steril örtünmeyi takiben cilt insizyonu ve bilateral paravertebral adale diseksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra mikrocerrahi aletler marifetiyle T7, T8, T9 total laminektomi yapıldı. Dura ve spinal kord ortaya kondu. T8 laminası hizasından laboratuvar mikroskobu altında spinal kord 11 numaralı bistüri ile tam kat olarak kesildi. Daha sonra aksonal işaretlenme ince iğne kullanılarak (iğneye 90⁰C açı verilerek) DiL floresan boyası ile her bir denekte 4'er kez uygulandı. Bu işlemi takiben daha önce Dr. C. Tator tarafından tanımlanmış olan model kullanılarak T6- T10 arası spinal fiksasyon gerçekleştirildi (). 4 numara cerrahi çelik tel (Ethicon Inc.) kullanılarak gerçekleştirilen fiksasyon apareyi, her iki uçta oluşturulan delikleri vasıtasıyla T6 ve T10 spinöz çıkıntılarına oturtuldu. Lateralde yer alan Kosta altından geçen 2/0 ipek sütürler (Johnson and Johnson Inc.) aracılığıyla aparey tespit edildi. Paravertebral adale 4/0 Vicryl sütür (Johnson and Johnson Inc.) ile ve cilt 3/0 Prolen (Johnson and Johnson Inc.) ile usulüne uygun olarak kapatıldı.

Grup T'deki deneklere transeksiyon sonrası DiL tissue- labeling paste (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) ile aksonal işaretlenme yapıldı ve tarif edilen şekilde cerrahi işlem sonlandırıldı.

Grup K'daki deneklere transeksiyon sonrası 10 mikrolitrelik Hamilton enjektör içerisinde aynı sayı ve kıvamda çekilen 0.5×10^6 MKH hasarlı omurilik uçları üzerine kontrollü ve yavaşça verildi. DiL tissue- labeling paste ile aksonal işaretlenme yapıldı ve tarif edilen şekilde cerrahi işlem sonlandırıldı.

Grup C'deki deneklere transeksiyon sonrası daha önce tarif edilen şekilde hazırlanan Chitosan tüpler transeksiyona maruz bırakılan spinal kordun proksimal ve distal uçlar tüp içerisinde kalacak şekilde yerleştirildi. DiL tissue- labeling paste ile aksonal işaretlenme yapıldı. Daha sonra tarif edilen şekilde cerrahi işlem sonlandırıldı.

Grup CK'daki deneklere transeksiyon sonrası daha önce tarif edilen şekilde hazırlanan Chitosan tüpler içerisinde Hamilton enjektör yardımıyla yerleştirilen 0.5×10^6 sayıdaki kök hücre yerleştirildi. Daha sonra chitosan tüpler transeksiyona maruz bırakılan spinal kordun proksimal ve dista uçlar tüp içerisinde kalacak şekilde yerleştirildi. DiL tissue- labeling paste ile aksonal işaretlenme yapıldı ve tarif edilen şekilde cerrahi işlem sonlandırıldı.



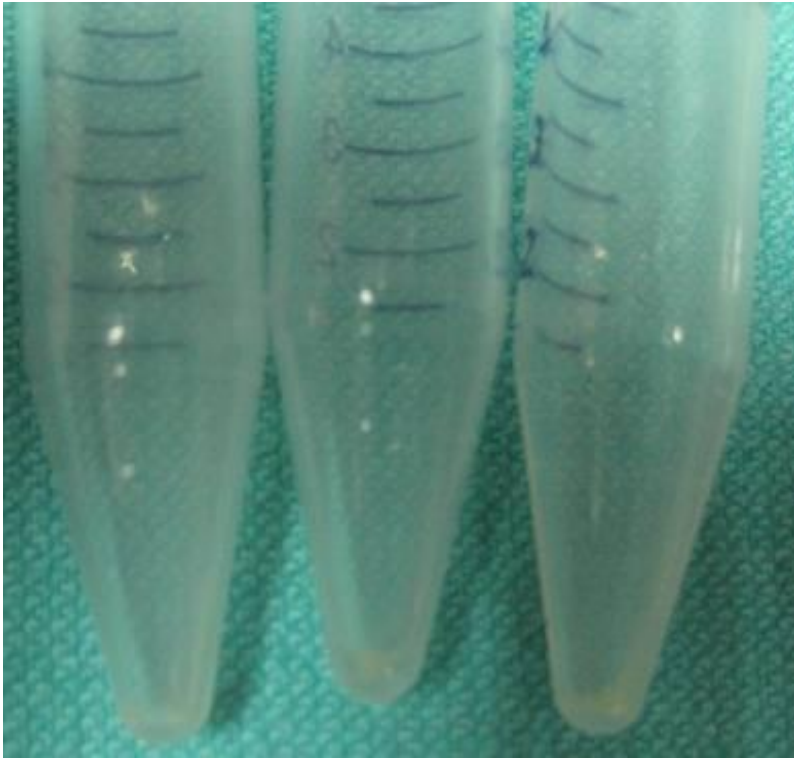
Şekil 3.1. CK Grubunun Şematik Tasarımı



Resim 3. 6 Cerrahi Aşamada Kullanılan Mikronöroşirürjikal Aletler



Resim 3. 7. Kök Hücre Konmuş Chitosan tüp



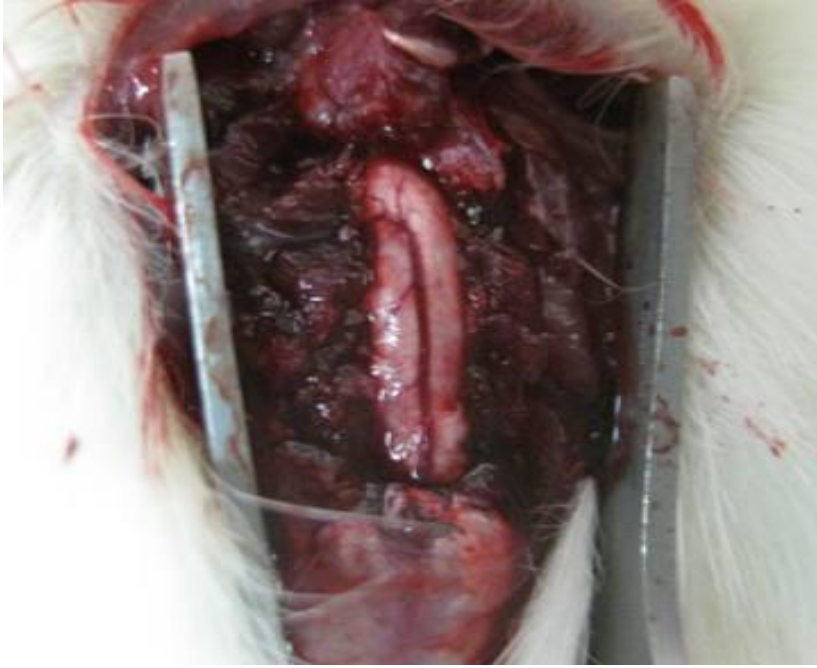
Resim 3. 8. Mezenkimal Kök Hücreler



Resim 3. 9. Cerrahi Eksplorasyon Paravertebral Adeleler



Resim 3.10. Cerrahi Eksplorasyon Vertebral Alan



Resim 3.11. Cerrahi Eksplorasyon Spinal Kord



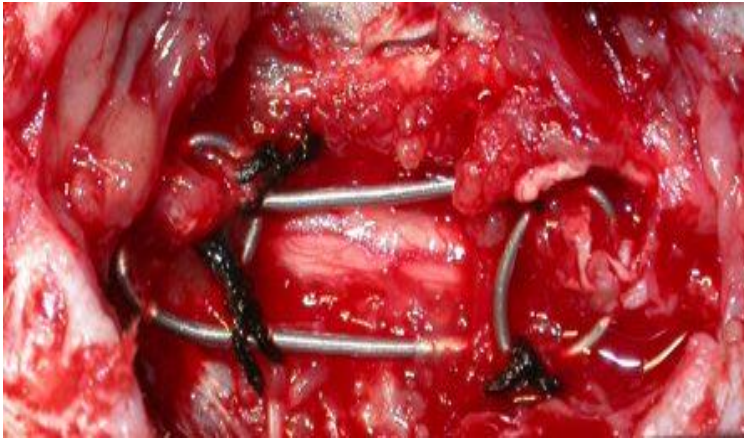
Resim 3.12. Cerrahi Eksplorasyon Spinal Kordun Transeksiyonu



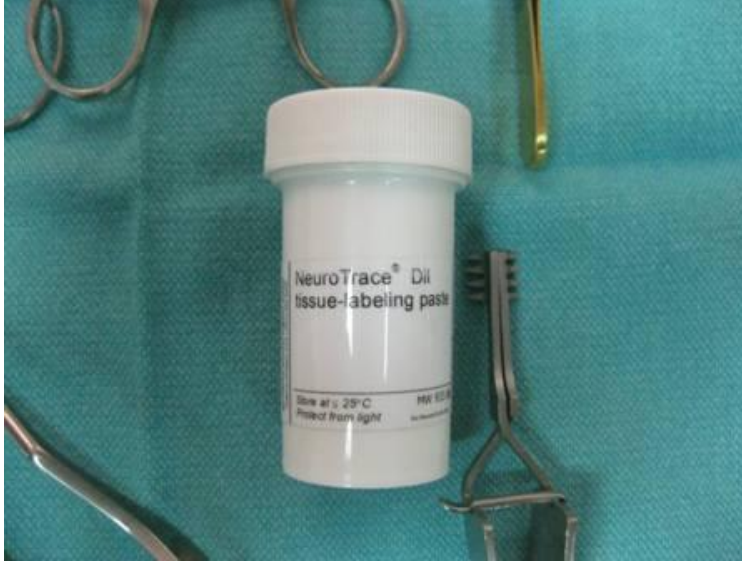
Resim 3. 13. Chitosan Tüpün Yerleştirilmesi



Resim 3. 14. Posterior Fiksasyon Materyali



Resim 3. 15. Posterior Fiksasyon



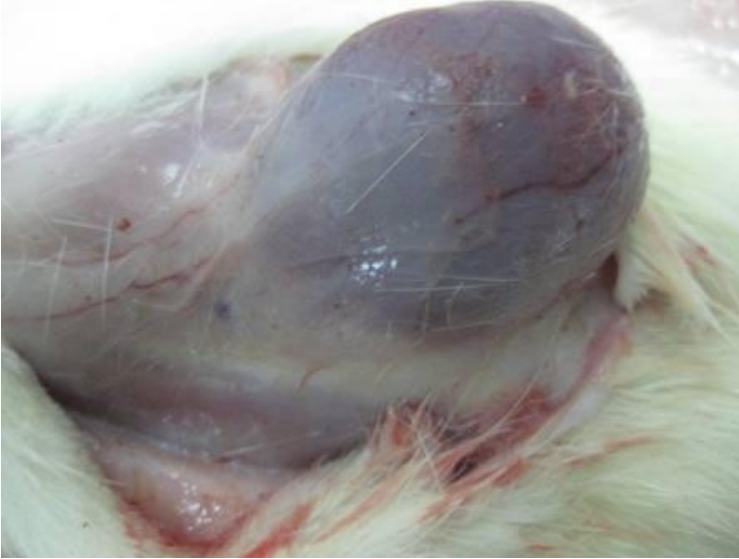
Resim 3. 16. DiO Boyası

3.6. Yara Kapatılması ve Postoperatif Erken Bakım

Posterior fiksasyonu takiben paravertebral adale 4/0 Vicryl ve cilt- ciltaltı dokuları anatomik katlara uygun olarak ise 3/0 prolene ile kapatıldı. Ameliyat sonrası erken dönemde tüm ratlar karanlık/ aydınlık dönüşümüne sahip ısı kontrollü 27⁰C'de odalarda standart kafeslerine alındı. Ameliyat sonrası 2 gün boyunca günde 3 kez tüm ratların gavaj ile beslenmeleri sağlandı. Özellikle yara yeri ve üriner sistem enfeksiyonlarını engellemek amacıyla 5gün gavaj ile oral yoldan Amoklavlin/ Klavulunik asit 62.5mg./gün verildi. Tüm ratlar aynı zamanda Siklosporin 15mg./kg. (Sandimmun, Novartis) sakrifiye edilene kadar sübkutan enjekte edildi.



Resim 3.17. Spinal Kordu Örtün Scar Dokusu



Resim 3.18. Pseudomeningosel Gelişimi



Resim 3.19. Pseudomeningosel Dokusu



Resim 3.20. Otofaji Fenomeni

3.7. Rejenerasyon Takibi

Aksonların rejenerasyon takibi aksonlar transeksiyon sırasında DiL floresans boyası ile boyandıktan sonra konfokal mikroskop ile yapıldı. Lezyon alanına verilen kök hücreler ise DiO floresans boyası ile boyanmış oldukları için farklı spektrometreye sahiptirler. İki farklı spektrometreye sahip boyaların konfokal mikroskop altında verdiği floresans rölfe de farklı olmaktadır. Böylelikle MKH'ler ve aksonal rejenerasyon filizlenmeler karışmamaktadır. Konfokal fenomen,

ışık kaynağına ait görüntünün, bir delikli levha ile süzülerek sadece odak düzlemindeki kısmının görüntülenmesi esasına dayanmaktadır. Burada kullanılan ışık kaynağı, pratik olarak nokta ışık kaynağı gibi davranabilen, lazer ışığıdır. Doygun ışık kaynakları bu amaçla kullanılamamaktadır. Örneğe yönlendirilen lazer ışını dikroik aynadan geçerek objektif üzerinden örneğe yöneltilmekte ve lazer ışığı flouresan işaretli örneği geçerken yol boyunca tüm flouresan molekülleri uyarmaktadır. Odak planındaki fluoroforlardan kaynaklanan emisyon geometrik optiğinin kurallarına uygun olarak objektif tarafından toplanmaktadır. Emisyon dalga boyu uyarı ışığından daha uzun olduğundan dikroik aynadan yansıması sağlanmaktadır. Yansıyan ışının karşısına ortasında küçük bir delik olan bir plaka konmakta, odaktan kaynaklanan ışık emisyon yayılım geometrisi nedeniyle tam deliğe denk gelmekte ve foton çarpıcı tüpe ulaşıp enerjisini vermektedir. Emisyon bu şekilde sayısal olarak kaydedilebilmektedir. Buna karşın odak planının altından ve üstünden kaynaklanan emisyon yayılımları deliğe değil plağa çarptığı için kayıt olmamaktadır. Bu prensibin mikroskoba uygulanması ile konfokal mikroskop geliştirilmiştir. Ayrıca saçılma minimum olduğundan açısız tarama yapan galvanometrik motorlara monte edilmiş aynaları hareket ettirerek yansıyan ışığa her iki ekseninde tarama yaptırmak mümkündür. Bu sayede X, Y ekseni piksellere ayrılarak lateral çözünürlük elde edilmektedir. Her düzleme ait fokal emisyon bilgileri bir araya getirilerek örneğin fokal planına ait görüntüsü oluşturulmaktadır. Daha sonra objektif Δz kadar kaydırılarak bir sonraki fokal plan taranıp görüntülenmekte ve bu işlem ardışık olarak tekrarlanarak z ekseninde hepsi sabit aralıklarla yerleşik görüntü takımı elde edilmiş olur. XY planında pikselleme yapıldığından ve Z ekseninde iki fokal plan resmi arasında mesafe mekanik olarak belirlendiğinden her üç eksene çözünürlük elde edilmektedir. Elde edilen görüntü takımlarından örneğe ait 3 boyutlu projeksiyon veya stereo görüntüleri oluşturulabilmektedir.

Konfokal mikroskobun bir diğer kayıt modalitesi “ Transmitted Light Detection (TMLDM)” modu olup bu kayıt yönteminde örneğin içinden geçen lazer ışığının şiddeti, diğer tarafta kondensetör üzerinden geçirilerek her piksel için tek tek PMT kanalı ile toplanıp sayısal hale getirilmektedir. Bu yöntemle örneğin parlak alan

mikroskopisine benzer görüntülerini elde etmek mümkün olup ancak TMLDM’da delik kullanılmadığından derinlik bilgisi yani z ekseninde çözünürlük olmamaktadır. (96).



Resim 3.21. HÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında yerleşik LSM Pascal Zeiss marka konfokal mikroskop

3.7.1. Fonksiyonel Değerlendirme

Spinal kord yaralanma modellerinde fonksiyonel değerlendirme için kullanılan skorlama sistemi olan BBB skorlaması Basso ve ark. tarafından 1995’te geliştirilmiştir (97). Bu skorlama çok merkezli havyan spinal kord yaralanması çalışmalarında ve nörotravma litaretüründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Deney protokollerinde kimyasal veya cerrahi müdahale sonrası en erken 1. gün sonrasında 21 puanlı skala ile lokomotor değerlendirilir. Test belirlenen aralıklarla 8-10 hafta tekrarlanabilir. Arka ayaklarda hiç hareket olmamasından, tüm vücut stabilitesinin sağlanması ve kuyruğun havada olmasına kadar çok geniş bir lokomotor değerlendirme sağlanır. Bu skorlama denekler arasında sürekli değil ara dönemler hakkında bilgi vermektedir.

İlk kısım (0-7 puan arası) iyileşmenin erken dönemindeki arka ekstremitelerin eklem hareketini değerlendirmektedir. İkinci kısım (8-13 puan arası) iyileşmenin ara fazında adımlama ve koordinasyonu değerlendirmektedir. Üçüncü kısım (14-21 puan arası) lokomasyon esnasında pençe kullanımının detaylarını değerlendirmektedir.

Tablo 3.1. BBB Fonksiyonel Değerlendirme Tablosu

Puan	
0	Hiçbir gözlenebilen arka ekstremitel (AE) hareketi yok
1	1 veya 2 eklemde hafif hareketi (genelde diz ve /veya kalça)
2	1 eklemde kapsamlı hareket veya bir eklemde kapsamlı hareket birlikte diğer eklemde hafif hareket
3	2 eklemde kapsamlı hareket
4	3 eklemde hafif hareket(AE) (kalça, diz, ayak bileği)
5	2 eklemde hafif hareket ile birlikte 3. eklemde geniş hareket
6	2 eklemde kapsamlı hareket ile birlikte 3. eklemde hafif hareket
7	3 eklemde kapsamlı hareket
8	Ekstremitenin süpürür pozisyonu (ağırlık veya yüke destek olmadan) veya yükü taşımaksızın pençenin ya da ayağın plantar pozisyonda olması
9	Sadece duruş pozisyonunda yükü destekleyerek pençe ya da ayağın plantar pozisyonda olması veya seyrek, sık veya sürekli yük destekli dorsal adımlama ve plantar adımlamanın yokluğu
10	Seyrek yük destekli plantar adımlama ancak ön ve arka ekstremiteler arasında koordinasyon olmaması
11	Sık sık, sürekli ağırlığını taşıyarak plantar adımlama. Ön ve arka ekstremitel arasında koordinasyonu olmaması
12	Sık sık, sürekli ağırlığını taşıyarak plantar adımlama ve ara sıra ön ve arka ekstremitel arasında koordinasyonun olması
13	Sürekli ağırlığını taşıyarak plantar adımlama ve ara sıra ön ve arka ekstremitel arasında koordinasyonun olması
14	Sürekli ağırlığını taşıyarak adımlama, sürekli ön ve arka ekstremitel arasında koordinasyonun olması veya hareket sırasında predominant pençe pozisyonunda yuvarlanma veya sık plantar adımlama, sürekli ön ve arka ekstremitel koordinasyonun olması, ara sıra dorsal adımlama olması
15	Sürekli ön ve arka ekstremitel koordinasyonun olması, parmak temizleme hareketi olmaması veya ekstremitenin öne ilerletilmesi ile ara sıra parmak temizleme hareketi, ilk dokunuşta predominant pençe hareketi vücuda paralel olması
16	Yürüyüş sırasında sürekli ön ve arka ekstremitel koordinasyonun olması, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi olması; ilk dokunuşta predominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında dönme olması
17	Yürüyüş sırasında sürekli ön ve arka ekstremitel koordinasyonun olması, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi olması; ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketi paralel olması
18	Yürüyüş sırasında sürekli ön ve arka ekstremitel koordinasyonun olması ve ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sürekli parmak temizleme hareketinin olması, ilk dokunuşta predominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında dönme olması
19	Yürüyüş ile sürekli koordineli ön ve arka ekstremitel hareketi olması, ekstremitenin öne hareketi ile sürekli parmağı temizleme hareketi olması; ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketi paralel olması
20	Sürekli koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme hareketi olması, ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketinin paralel olması; fakat gövde instabilitesi olması; kuyruğun sürekli havada olması
21	Koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme, predominant pençe pozisyonunun paralel olması, sürekli gövde stabilitesi, kuyruğun sürekli havada olması

Her bir ratın fonksiyonel olarak iyileşmesi travma sonrası 4 hafta boyunca 1. gün, 3. hafta ve 4. Hafta yapılan BBB açık alan lokomotor testi ile değerlendirildi. Bu test için daha önce bu çalışma ile ilgisi olmayan 3 bağımsız gözlemci kullanılarak skorlamalar gerçekleştirildi.



Resim 3.22. BBB Testi Uygulaması



Resim 3.23. BBB Testi Uygulaması

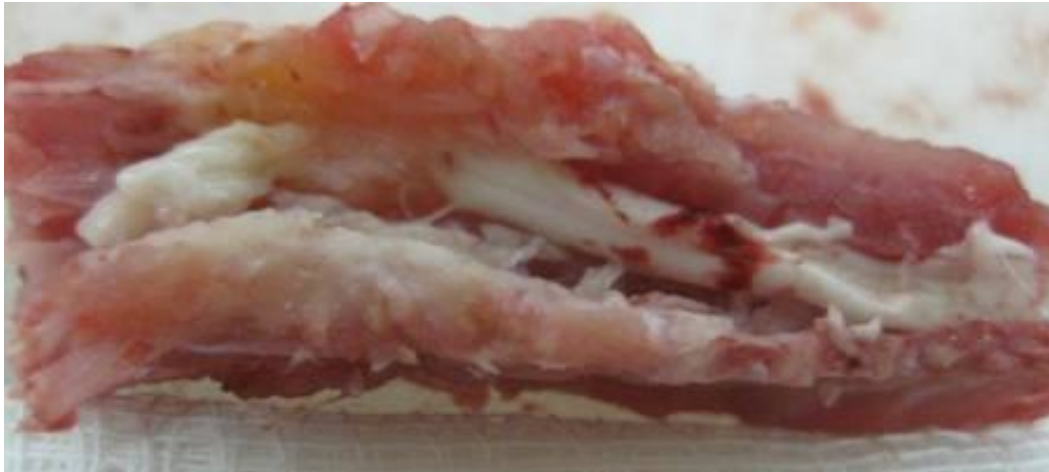
3.7.2. Histolojik Değerlendirme

Genel anestezi altındaki hayvanlara sol ventrikülden hayvanın ekstremiteleri sertleşinceye dek sabit hızda % 4 paraformaldehit (0.1 mol/L fosfat tamponu içinde, pH 7.4) verilerek perfüzyon fiksasyonu yapıldı. Uygun cerrahi yöntemle izole edilen medulla spinalis örnekleri, çevre yumuşak dokulardan dikkatle temizlendikten sonra % 2'lik gluteraldehit solüsyonu içinde 4-6 saat süreyle 4⁰C'de immersiyon yoluyla fikse edildikten sonra fosfat tamponu solüsyonunda yıkandı ve fosfat tamponlu %1'lik ozmiyum tetroksit içinde 40C'de iki saat süreyle postfikse edildi. Sabit ajitasyonlu doku takip cihazıyla (Leica Wetzlar, Almanya) dereceli etil alkollerden geçirilerek epona (EMS, Almanya) gömüldü. Yarı ince kesitler (her örnek için en az 10 kesit), metilen mavisi-azur II ile literatürde bildirilen medulla spinalis rejenerasyon kriterleri açısından, bilgisayar ve dijital kamera (Leica DC500, Westlar Almanya) bağlantılı ışık mikroskobu aracılığıyla kaydedilerek Leica Application Suite marka görüntü analiz programı ile literatürden modifiye edilen yöntemle kantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre spinal kordun kesiyi içeren bölgesine ait enine kesit alanı dijital ortamda mikrometre kare (μm^2) cinsinden hesaplandı. Bu alandaki toplam akson ve kan damarı kesiti sayıları ayrı ayrı hesaplanarak elde edilen sayısal veri lezyonun kesit alanına oranlandı. Biyomalzeme uygulanan gruplarda implanta (biyomalzemeye) doku yanıtı literatürdeki yumuşak doku implantlarına ait yöntemle göre semikantitatif olarak skorlandı. Örnekler histolojik incelemeye verilmeden önce kitosan tüp çıkarıldığından tüpün dış yüzüne ait doku yanıtı değerlendirilmedi.

Ince kesitler otomatik boyama cihazında (Leica, Almanya) uranil asetat-kurşun sitrat ile boyandıktan sonra Jeol JEM-1400 model transmisyon elektron mikroskobuna bağlantılı Orius marka dijital kamera ile spinal kordun morfolojik onarım kriterleri açısından ince yapı düzeyinde değerlendirildi. Bunun için her örneğe ait en az 3 adet ince kesitte en az 10 adet akson kalınlığı ölçülerek elektron mikroskobunda mikrometre (μm) cinsinden kaydedildi.



Resim 3.24. Sakrifiye Edilen Denekten Çıkarılan Transeksiyona Maruz Bırakılan Spinal Kord Dokusu



Resim 3.25. Vertebral Kolon İçerisinde Transeksiyona Maruz Bırakılan Spinal Kord Dokusu

3.8. İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen sonuçlar Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda analiz edildi. Bağımsız değişkenler gruplar, bağımlı değişkenler histoloji ve yürüme analizi ölçümleridir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı ve varyansların homojenliği Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Tüm veriler parametrik olmayan testlerle- çoklu karşılaştırma için- Kruskal Wallis, ikili karşılaştırma için Mann- Whitney testi ile değerlendirildi. Korelasyon analizi için Spearman testi, zaman içi değişim için Fredman testi yapıldı. Tüm veriler ortanca, minimum ve maksimum değerleriyle temsil edildi. Analizler SPSS versiyon 15.0 ile gerçekleştirildi. Fark, p 0.05'ten küçük olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Gözlemler

Tüm gruplardaki tüm deneklerde komplikasyonsuz yara yeri iyileşmesi olduğu görüldü. Deneklerde beyin omurilik sıvısı fistülü görülmedi; yara yeri enfeksiyonu veya kötü yara yeri iyileşmesini gösterecek akut dönemde ısı artışı, şişlik, aşırı kızarıklık, kronik dönemde hipertrofik skar veya keloid oluşumu görülmedi.

Cerrahi eksplorasyonlar sırasında 1 denekte lezyon bölgesinde psödomeningosele rastlandı (Resim 3.20, resim 3.21). Bir denekte otofaji fenomeni (sağ arka ekstremitte) görüldü (Resim 3.22.).

4.2. Fonksiyonel Değerlendirme

BBB skorları histolojik ölçümlerle anlamlı bir korelasyon göstermedi. BBB skorları gruplar arasında zaman içinde anlamlı bir değişim de göstermedi. Fakat grup içi günler baz alındığında 3. Hafta- 1. Ay zaman dilimi dışında tüm gruplarda anlamlı bir korelasyon gözlemlendi ($p < 0.05$).

Tablo 4.1.Tüm Gruplar Arasında Belirlenen Zaman Dilimlerinde BBB Skorlaması İstatiksel Analizi

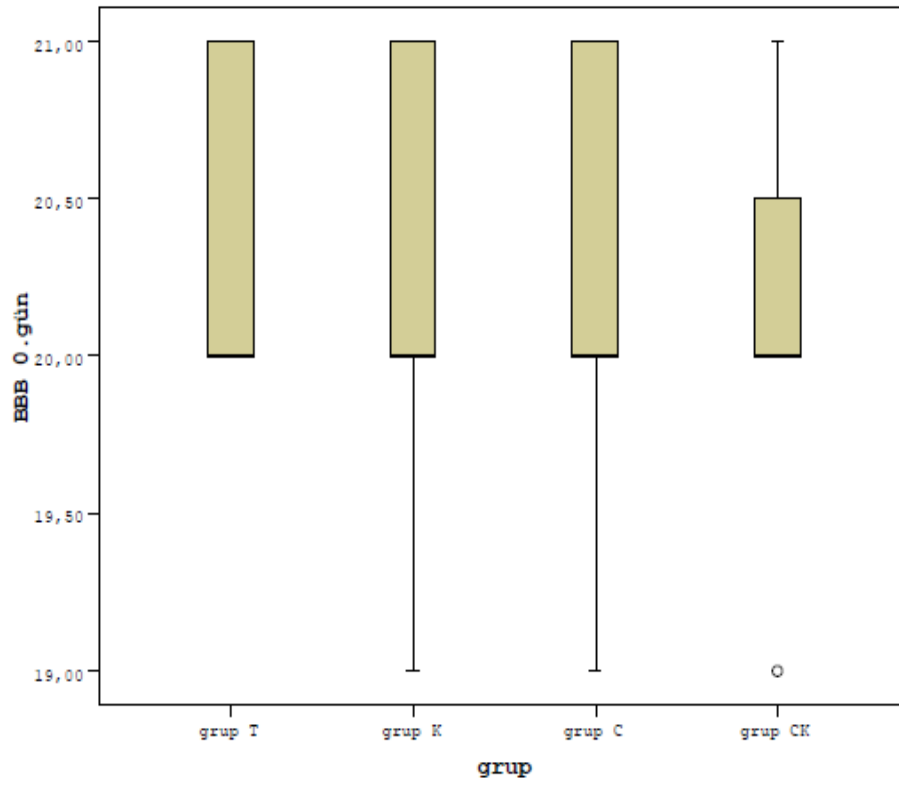
Ranks

	grup	N	Mean Rank
BBB 0.gün	grup T	8	17,94
	grup K	8	16,63
	grup C	8	16,63
	grup CK	8	14,81
	Total	32	
BBB 1.hafta	grup T	8	15,88
	grup K	8	15,88
	grup C	8	17,13
	grup CK	8	17,13
	Total	32	
BBB 3.hafta	grup T	8	14,00
	grup K	8	16,94
	grup C	8	16,75
	grup CK	8	18,31
	Total	32	
BBB 1.ay	grup T	8	13,69
	grup K	8	16,56
	grup C	8	17,88
	grup CK	8	17,88
	Total	32	

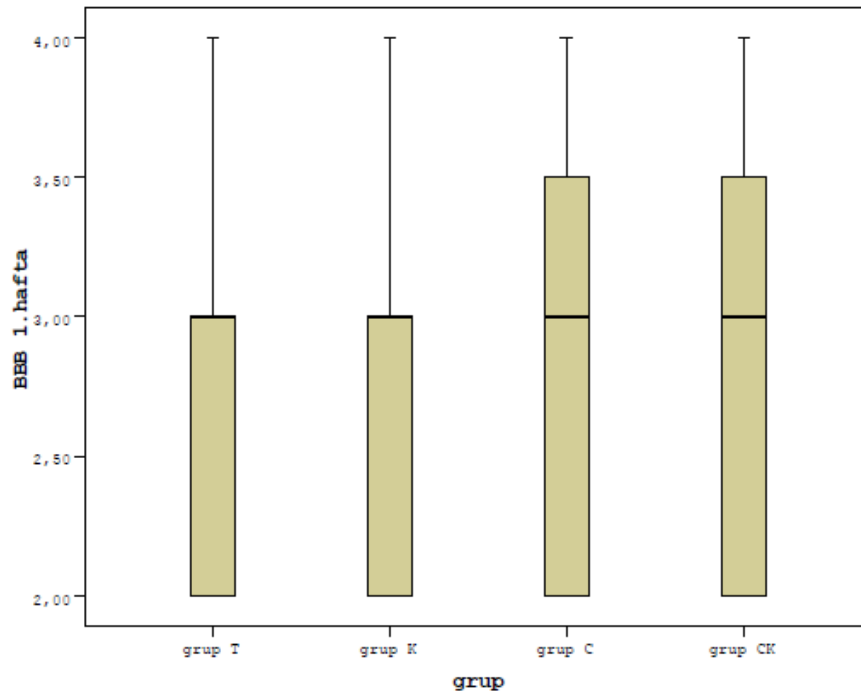
	BBB 0.gün	BBB 1.hafta	BBB 3.hafta	BBB 1.ay
Chi-Square	,575	,166	1,039	1,228
df	3	3	3	3
Asymp. Sig.	,902	,983	,792	,746

Tablo 4.2. Tüm Grupların Belirlenen Zaman Dilimleri İçerisindeki İstatistiksel Değerleri

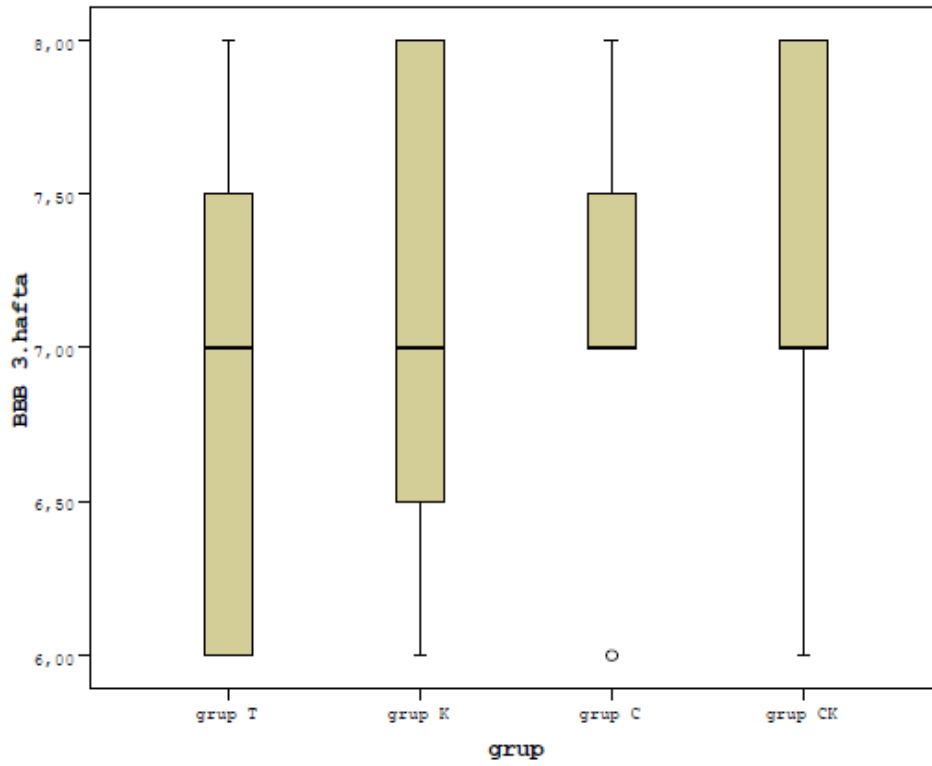
grup			BBB 0.gün	BBB 1.gün	BBB 1.hafta	BBB 3.hafta	BBB 1.ay
grup T	N	Valid	8	8	8	8	8
		Missing	0	0	0	0	0
	Mean		20,3750	,0000	2,7500	6,8750	7,8750
	Median		20,0000	,0000	3,0000	7,0000	8,0000
	Std. Deviation		,51755	,00000	,70711	,83452	,83452
	Minimum		20,00	,00	2,00	6,00	7,00
	Maximum		21,00	,00	4,00	8,00	9,00
grup K	N	Valid	8	8	8	8	8
		Missing	0	0	0	0	0
	Mean		20,2500	,0000	2,7500	7,1250	8,1250
	Median		20,0000	,0000	3,0000	7,0000	8,0000
	Std. Deviation		,70711	,00000	,70711	,83452	,83452
	Minimum		19,00	,00	2,00	6,00	7,00
	Maximum		21,00	,00	4,00	8,00	9,00
grup C	N	Valid	8	8	8	8	8
		Missing	0	0	0	0	0
	Mean		20,2500	,0000	2,8750	7,1250	8,2500
	Median		20,0000	,0000	3,0000	7,0000	8,0000
	Std. Deviation		,70711	,00000	,83452	,64087	,70711
	Minimum		19,00	,00	2,00	6,00	7,00
	Maximum		21,00	,00	4,00	8,00	9,00
grup CK	N	Valid	8	8	8	8	8
		Missing	0	0	0	0	0
	Mean		20,1250	,0000	2,8750	7,2500	8,2500
	Median		20,0000	,0000	3,0000	7,0000	8,0000
	Std. Deviation		,64087	,00000	,83452	,70711	,70711
	Minimum		19,00	,00	2,00	6,00	7,00
	Maximum		21,00	,00	4,00	8,00	9,00



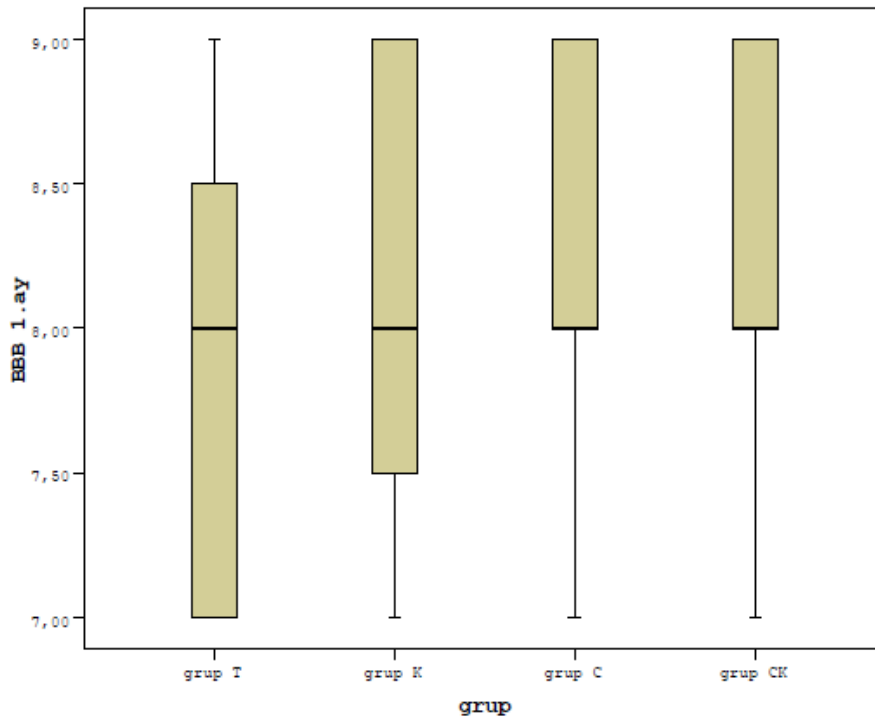
Grafik 4.1. BBB Skorlaması 0. Gün Grafiği



Grafik 4.2. BBB Skorlaması 1. Hafta Grafiği



Grafik 4.3. BBB Skorlaması 3. Hafta Grafiği



Grafik 4.4. BBB Skorlaması 1. Ay Grafiği

Tablo 4. 3. Grup içi Günler Baz Alındığında Anlamlı Korelasyon Gösteren BBB Skorlaması İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank
Grup T	gun0	8	36,50
	gun1	8	4,50
	hafta1	8	12,50
	hafta3	8	22,19
	ay1	8	26,81
	Total	40	
Grup K	gun0	8	36,50
	gun1	8	4,50
	hafta1	8	12,50
	hafta3	8	22,19
	ay1	8	26,81
	Total	40	
Grup C	gun0	8	36,50
	gun1	8	4,50
	hafta1	8	12,50
	hafta3	8	21,56
	ay1	8	27,44
	Total	40	
Grup CK	gun0	8	36,50
	gun1	8	4,50
	hafta1	8	12,50
	hafta3	8	21,88
	ay1	8	27,13
	Total	40	

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Chi-Square	36,845	36,810	37,233	37,072
df	4	4	4	4
Asymp. Sig.	,000	,000	,000	,000

Tablo 4.4. Grup İçi Günler (0. ve 1. gün) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamlı İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T	gun0	8	12,50	100,00
	gun1	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup K	gun0	8	12,50	100,00
	gun1	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup C	gun0	8	12,50	100,00
	gun1	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup CK	gun0	8	12,50	100,00
	gun1	8	4,50	36,00
	Total	16		

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000	36,000
Z	-3,664	-3,633	-3,633	-3,655
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a

Tablo 4.5. Grup İçi Günler (0. Gün ve 1. Hafta) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamlı İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T	gun0	8	12,50	100,00
	hafta1	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup K	gun0	8	12,50	100,00
	hafta1	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup C	gun0	8	12,50	100,00
	hafta1	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup CK	gun0	8	12,50	100,00
	hafta1	8	4,50	36,00
	Total	16		

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000	36,000
Z	-3,459	-3,432	-3,419	-3,437
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a

Tablo 4.6. Grup İçi Günler (0. Gün ve 3. Hafta) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamlı İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T	gun0	8	12,50	100,00
	hafta3	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup K	gun0	8	12,50	100,00
	hafta3	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup C	gun0	8	12,50	100,00
	hafta3	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup CK	gun0	8	12,50	100,00
	hafta3	8	4,50	36,00
	Total	16		

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000	36,000
Z	-3,445	-3,419	-3,451	-3,451
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a

Tablo 4.7. Grup İçi Günler (0. Gün ve 1. Ay) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamlı İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T	gun0	8	12,50	100,00
	ay1	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup K	gun0	8	12,50	100,00
	ay1	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup C	gun0	8	12,50	100,00
	ay1	8	4,50	36,00
	Total	16		
Grup CK	gun0	8	12,50	100,00
	ay1	8	4,50	36,00
	Total	16		

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000	36,000
Z	-3,445	-3,419	-3,432	-3,451
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a

Tablo 4.8. Grup İçi Günler (1 Gün. ve 1. Hafta) bAz Alındığında BBB Skorlaması Anlamlı İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T	gun1	8	4,50	36,00
	hafta1	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup K	gun1	8	4,50	36,00
	hafta1	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup C	gun1	8	4,50	36,00
	hafta1	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup CK	gun1	8	4,50	36,00
	hafta1	8	12,50	100,00
	Total	16		

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000	36,000
Z	-3,633	-3,633	-3,617	-3,617
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a

Tablo 4.9. Grup İçi Günler (1 Gün. ve 3. Hafta) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamlı İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T	gun1	8	4,50	36,00
	hafta3	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup K	gun1	8	4,50	36,00
	hafta3	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup C	gun1	8	4,50	36,00
	hafta3	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup CK	gun1	8	4,50	36,00
	hafta3	8	12,50	100,00
	Total	16		

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000	36,000
Z	-3,617	-3,617	-3,655	-3,633
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a

Tablo 4.10. Grup İçi Günler (1. Gün ve 1. Ay) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamlı İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T	gun1	8	4,50	36,00
	ay1	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup K	gun1	8	4,50	36,00
	ay1	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup C	gun1	8	4,50	36,00
	ay1	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup CK	gun1	8	4,50	36,00
	ay1	8	12,50	100,00
	Total	16		

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000	36,000
Z	-3,617	-3,617	-3,633	-3,633
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a

Tablo 4.11. Grup İçi Günler (1. Hafta ve 3. Hafta) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamlı İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T	hafta1	8	4,50	36,00
	hafta3	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup K	hafta1	8	4,50	36,00
	hafta3	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup C	hafta1	8	4,50	36,00
	hafta3	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup CK	hafta1	8	4,50	36,00
	hafta3	8	12,50	100,00
	Total	16		

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000	36,000
Z	-3,419	-3,419	-3,437	-3,419
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a

Tablo 4.12. Grup İçi Günler (1. Hafta ve 1. Ay) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamlı İstatistik Değerleri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T	hafta1	8	4,50	36,00
	ay1	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup K	hafta1	8	4,50	36,00
	ay1	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup C	hafta1	8	4,50	36,00
	ay1	8	12,50	100,00
	Total	16		
Grup CK	hafta1	8	4,50	36,00
	ay1	8	12,50	100,00
	Total	16		

	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	36,000	36,000	36,000	36,000
Z	-3,419	-3,419	-3,419	-3,419
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,001	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a	,000 ^a

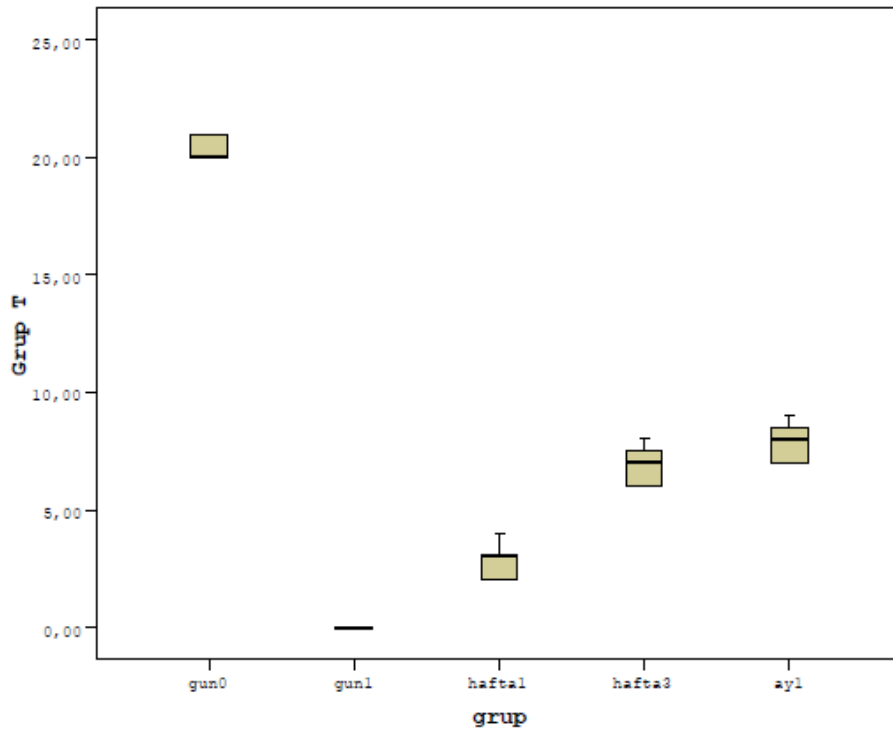
Tablo 4.13. Grup İçi Günler (3 Hafta. ve 1. Ay) Baz Alındığında BBB Skorlaması Anlamsız İstatistik Değerleri

grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Grup T			
hafta3	8	6,19	49,50
ay1	8	10,81	86,50
Total	16		
Grup K			
hafta3	8	6,19	49,50
ay1	8	10,81	86,50
Total	16		
Grup C			
hafta3	8	5,56	44,50
ay1	8	11,44	91,50
Total	16		
Grup CK			
hafta3	8	5,88	47,00
ay1	8	11,13	89,00
Total	16		

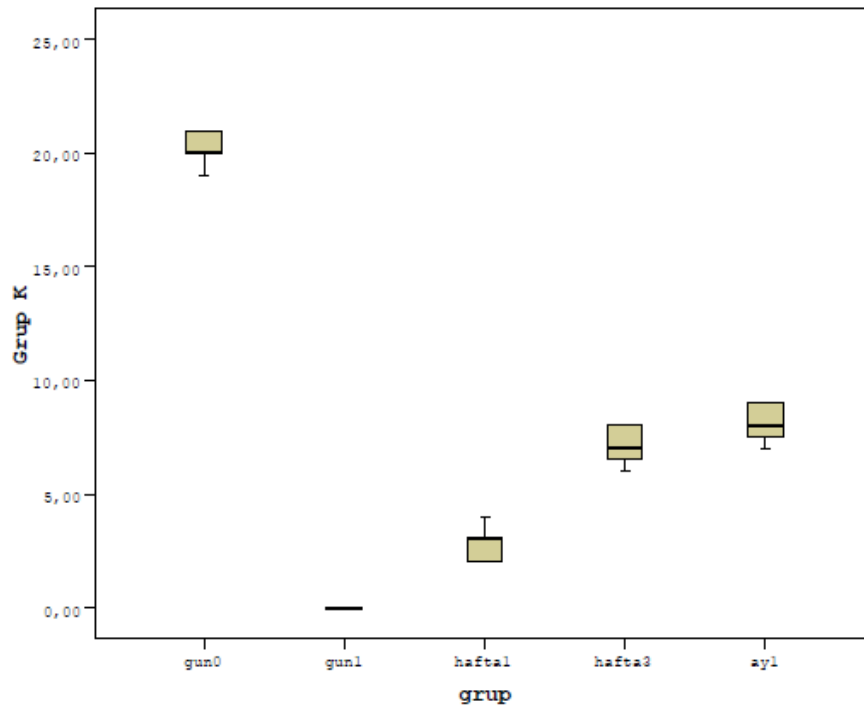
	Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
Mann-Whitney U	13,500	13,500	8,500	11,000
Wilcoxon W	49,500	49,500	44,500	47,000
Z	-2,035	-2,035	-2,614	-2,348
Asymp. Sig. (2-tailed)	,042	,042	,009	,019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,050 ^a	,050 ^a	,010 ^a	,028 ^a

Tablo 4.14. Tüm Grupların Grup İçi Belirlenen Zaman Dilimleri İçerisindeki İstatistiksel Değerleri

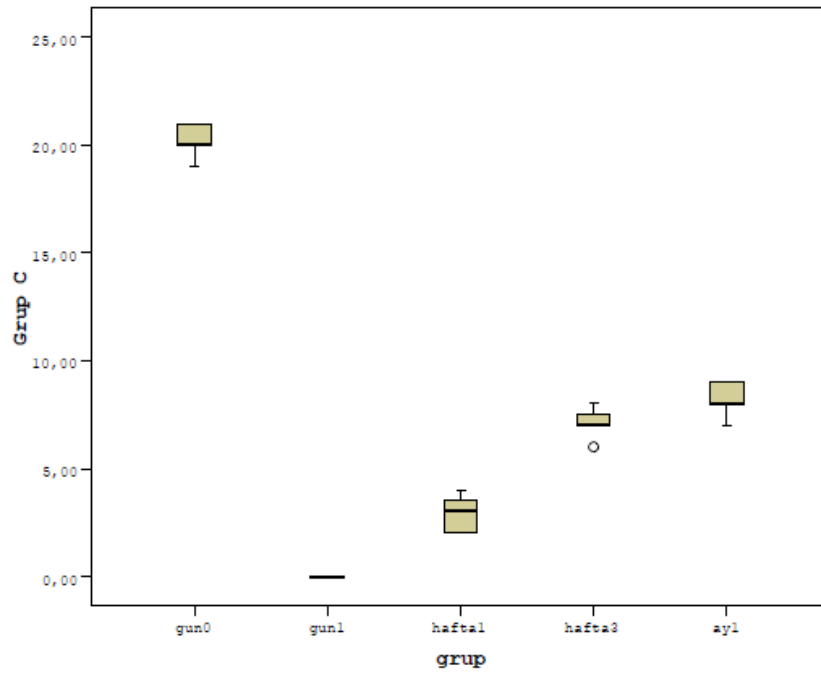
grup			Grup T	Grup K	Grup C	Grup CK
gun0	N	Valid	8	8	8	8
		Missing	0	0	0	0
	Mean	20,3750	20,2500	20,2500	20,1250	
	Median	20,0000	20,0000	20,0000	20,0000	
	Std. Deviation	,51755	,70711	,70711	,64087	
	Minimum	20,00	19,00	19,00	19,00	
	Maximum	21,00	21,00	21,00	21,00	
gun1	N	Valid	8	8	8	8
		Missing	0	0	0	0
	Mean	,0000	,0000	,0000	,0000	
	Median	,0000	,0000	,0000	,0000	
	Std. Deviation	,00000	,00000	,00000	,00000	
	Minimum	,00	,00	,00	,00	
	Maximum	,00	,00	,00	,00	
hafta1	N	Valid	8	8	8	8
		Missing	0	0	0	0
	Mean	2,7500	2,7500	2,8750	2,8750	
	Median	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	
	Std. Deviation	,70711	,70711	,83452	,83452	
	Minimum	2,00	2,00	2,00	2,00	
	Maximum	4,00	4,00	4,00	4,00	
hafta3	N	Valid	8	8	8	8
		Missing	0	0	0	0
	Mean	6,8750	7,1250	7,1250	7,2500	
	Median	7,0000	7,0000	7,0000	7,0000	
	Std. Deviation	,83452	,83452	,64087	,70711	
	Minimum	6,00	6,00	6,00	6,00	
	Maximum	8,00	8,00	8,00	8,00	
ay1	N	Valid	8	8	8	8
		Missing	0	0	0	0
	Mean	7,8750	8,1250	8,2500	8,2500	
	Median	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	
	Std. Deviation	,83452	,83452	,70711	,70711	
	Minimum	7,00	7,00	7,00	7,00	
	Maximum	9,00	9,00	9,00	9,00	



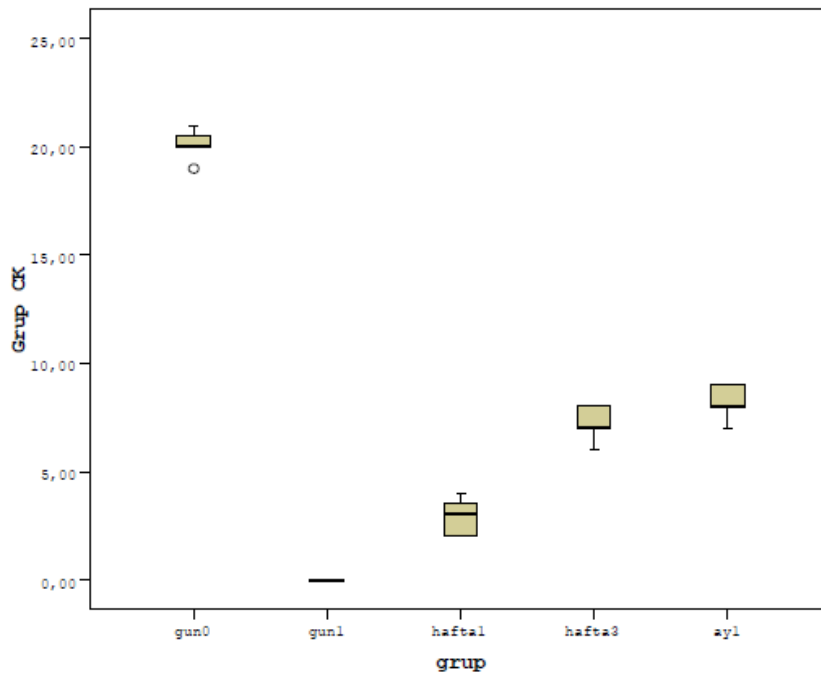
Grafik 4.5. T Grubunun Grup İçi BBB Skorlaması Grafiği



Grafik 4.6. K Grubunun Grup İçi BBB Skorlaması Grafiği



Grafik 4.7. C Grubunun Grup İçi BBB Skorlaması Grafiği

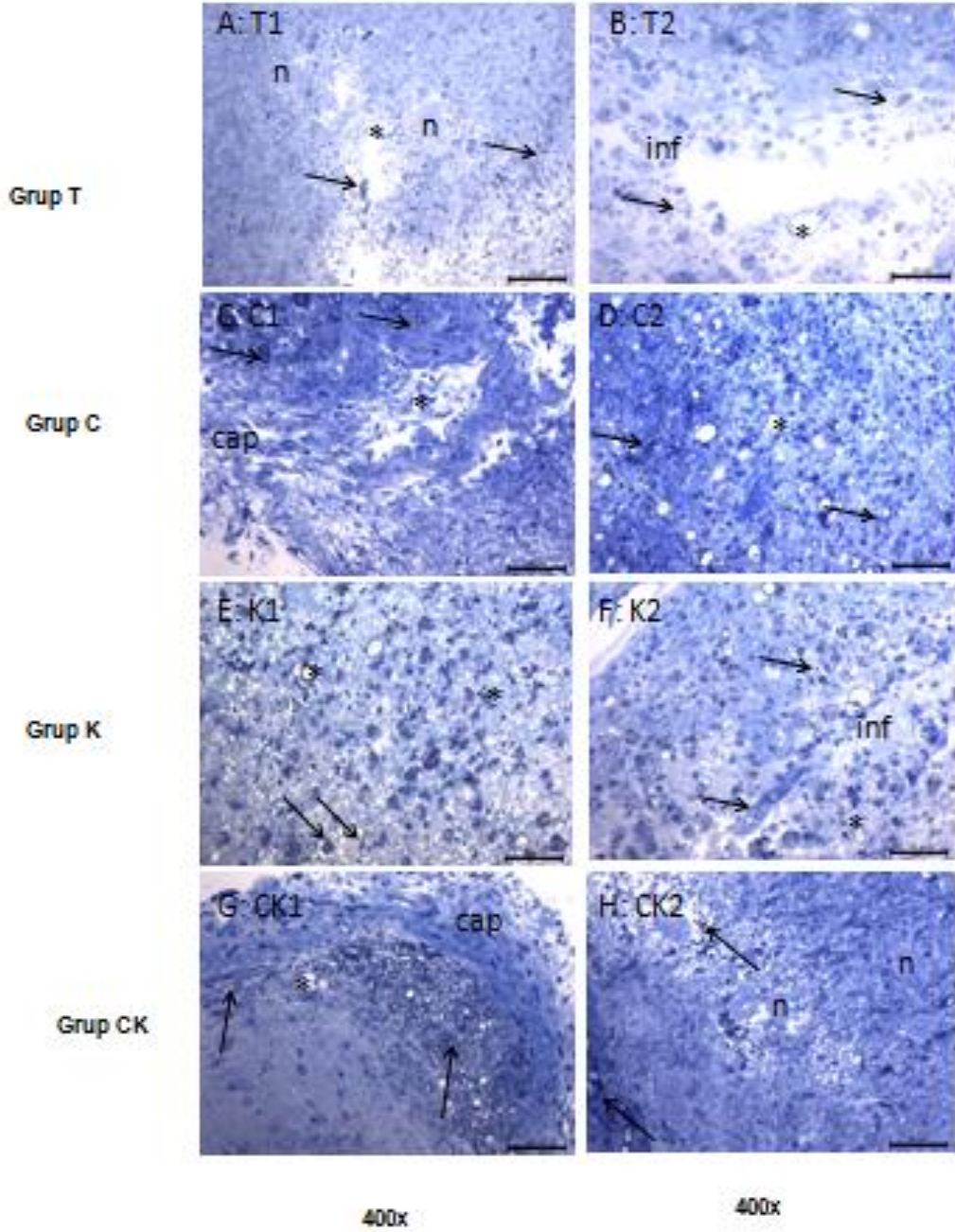


Grafik 4.8. CK Grubunun Grup İçi BBB Skorlaması Grafiği

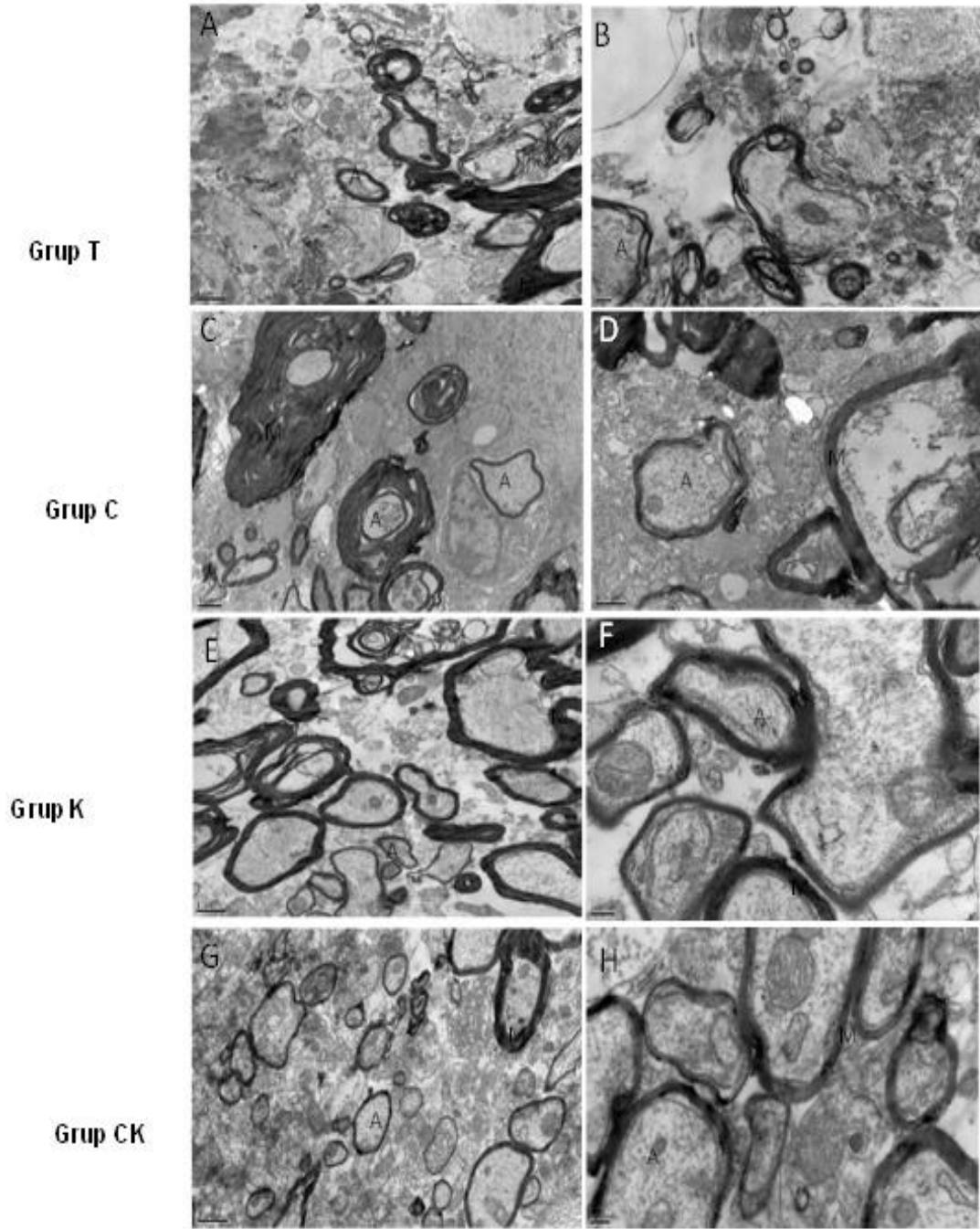
4.3. Histolojik Değerlendirme

Genel anestezi altındaki hayvanlara sol ventrikülden hayvanın ekstremiteleri sertleşinceye dek sabit hızda % 4 paraformaldehit (0.1 mol/L fosfat tamponu içinde, pH 7.4) verilerek perfüzyon fiksasyonu yapıldı. Uygun cerrahi yöntemle izole edilen medulla spinalis örnekleri, çevre yumuşak dokulardan dikkatle temizlendikten sonra % 2'lik gluteraldehit solüsyonu içinde 4-6 saat süreyle 40C'de immersiyon yoluyla fikse edildikten sonra fosfat tamponu solüsyonunda yıkandı ve fosfat tamponlu %1'lik ozmiyum tetroksit içinde 40C'de iki saat süreyle postfikse edildi. Sabit ajitasyonlu doku takip cihazıyla (Leica Wetzlar, Almanya) dereceli etil alkollerden geçirilerek epona (EMS, Almanya) gömüldü. Yarı ince kesitler (her örnek için en az 10 kesit), metilen mavisi-azur II ile literatürde bildirilen medulla spinalis rejenerasyon kriterleri açısından (98, 99), bilgisayar ve dijital kamera (Leica DC500, Westlar Almanya) bağlantılı ışık mikroskobu aracılığıyla kaydedilerek Leica Application Suite marka görüntü analiz programl ile literatürden modifiye edilen yöntemle kantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre spinal kordun kesiyi içeren bölgesine ait enine kesit alanı dijital ortamda mikrometre kare (μm^2) cinsinden hesaplandı. Bu alandaki toplam akson ve kan damarı kesiti sayıları ayrı ayrı hesaplanarak elde edilen sayısal veri lezyonun kesit alanına oranlandı. Biyomalzeme uygulanan gruplarda implanta (biyomalzemeye) doku yanıtı literatürdeki yumuşak doku implantlarına ait yöntemle göre semikantitatif olarak skorlandı (100, 101, Tablo 2.25). Örnekler histolojik incelemeye verilmeden önce kitosan tüp çıkarıldığından tüpün dış yüzüne ait doku yanıtı değerlendirilmedi.

Ince kesitler otomatik boyama cihazında (Leica, Almanya) uranil asetat-kurşun sitrat ile boyandıktan sonra Jeol JEM-1400 model transmisyon elektron mikroskobuna bağlantılı Orius marka dijital kamera ile spinal kordun morfolojik onarım kriterleri açısından ince yapı düzeyinde değerlendirildi. Bunun için her örneğe ait en az 3 adet ince kesitte en az 10 adet akson kalınlığı ölçülerek elektron mikroskobunda mikrometre (μm) cinsinden kaydedildi (98, 99).



Şekil 4.1. Aksiyal (transvers) medulla spinalis yarı ince kesitlerinin tüm gruplara ait mikrograflarında kesi bölgesindeki damar (asterisk) ve inflamatuvar hücrelerden (inf) zengin, nekrotik hücre artıklarını içeren granülasyon dokusu görülmektedir. Kök hücre uygulanan gruplarda granülasyon dokusunun digger gruplara göre daha organize olduğu izlenmektedir. C ve G’de kitosan tüpü saran fibröz enkapsülasyona dikkat ediniz. N: Nöron gövdesi, Ok: Akson, Asterisk: Damar, İnf: İnflamatuvar hücre infiltrasyonu. K: Kapsül. Metilen mavisi-Azur II x400.



Şekil 4.2. Kesit alanı ve komşuluğundaki tamir alanına ait elektronmikrograflardır. Sol kolonda küçük (x12000 ya da x150000) ve sağ kolonda daha büyük (x40000 ya da x50000) büyütmede mikrograflarda aksonlarda değişen edereclerde ultrastrüktürel hasar (miyelinde kopma, erime, şişme, incelme, ayrılma) görülmektedir.. Yalnız kök hücre ve kök hücre-kitosan tüp uygulanan gruplarda dejeneratif değişikliklere aksonların remiyelinizasyonu ile giden onarım sürecinin daha ileri olduğu izlenmektedir. A: Akson; M: Miyelin . Uranil asetat-kurşun sitrat.

Işık mikroskobu düzeyinde kitosan tüp orta derecede doku reaksiyonuna neden oldu (Şekil 1C, G). Ortaya çıkan doku reaksiyonu hücre uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi Tüpün iç yüzünde mononükleer fagositer hücreler, dev hücreler, lenfositler ve fibroblastların katıldığı orta kalınlıkta (bir ila 10 katlı) bir kapsül oluştuğu izlendi. Bu doku gevşek ve damardan zengin medulla spinalisin transeksiyon ve rejenerasyonun gerçekleştiği granülasyon dokusu ile devamlılık gösteriyordu. Tüpün dış yüzündeki enkapsülasyon cerrahi sonrası tüp çıkarıldığından izlenemedi.

Transeksiyon alanı tüm gruplarda hücre ve damardan zengin, gevşek gliyal fibriller, nekrotik hücre artıkları ve makrofajları içeren granülasyon dokusu ile kaplıydı. (Şekil 1). Polimerik tüpün iç yüzeyine komşu bağ dokusu buna göre daha sıkı ve fibröz karakterde olmasına rağmen küçük kan damarları aracılığıyla (transeksiyon) onarım bölgesindeki bağ dokusu ile bağlantılıydı. Kesi alanındaki medulla spinalis segmentindeki gri ve beyaz maddede nöronların ve aksonların dejenere olduğu ve yerlerini çoğunlukla mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu, gliyal skar ve fibrotik dokuların aldığı izlendi. Tüm gruplarda kesi alanı komşuluğunda aksonların değişen derecelerde rejenere olmakta olduğu izlendi. Düzensiz ve farklı boyutta akson gruplarına zengin bir kapiller ağ eşlik ediyordu Bu alanlarda kesi ile kök hücre ve kök hücre-kitosan tüp uygulanan gruplarda kesi komşuluğundaki dokunun yalnız kitosan ve yalnız kesi uygulanan gruplara göre daha iyi organize olduğu ve birim alana düşen akson sayısının diğer gruplara göre daha fazla olduğu saptandı. Ancak incelenen denek sayısı az olduğu için kök hücre uygulaması akson ve kan damarı sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açmadı (Şekil 1.5., Tablo 2.6.). Sonuç olarak mezenkimal kök hücre uygulamasının tek başına tüp uygulamasına göre spinal kord tamir prosesini bir miktar hızlandırdığı (Şekil 1.5.) saptanmıştır

Elektron mikroskop düzeyinde kesi bölgesi ve ona komşu gri ve beyaz maddede ödem, nöronal ve aksonal ultrastrüktürel hasar bulguları izlendi. Aksonlarda gevşeme ve incelme, miyelinde, ayrılma, şişme, soyulma, aksoplazmik mitokondriyonlarda hasar saptandı. Miyelin kılıfların onarım süreci kök hücre ve kök hücre-kitosan tüp uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre daha ileriydi. Bu

gruplardaki miyelin kalınlığı ölçümleri kontrol gruplarına göre anlamlı biçimde daha fazlaydı ($p < 0.05$). (Şekil 1.6., Grafik 4.10.).

Tablo 4.15. Deneklerin Akson/ Defekt Alanı, Kan Damarı/ Defekt Alanı ve Doku Cevabı İstatistiksel Sonuçları

grup			ax/da	bv/da	tissue response
grup T	N	Valid	2	2	2
		Missing	0	0	0
	Mean		,8972665	,0153577	,0000
	Median		,8972665	,0153577	,0000
	Std. Deviation		,00685709	,00369671	,00000
	Minimum		,89242	,01274	,00
	Maximum		,90212	,01797	,00
grup K	N	Valid	2	2	2
		Missing	0	0	0
	Mean		,0109405	,0441234	,0000
	Median		,0109405	,0441234	,0000
	Std. Deviation		,00471189	,05276827	,00000
	Minimum		,00761	,00681	,00
	Maximum		,01427	,08144	,00
grup C	N	Valid	2	2	2
		Missing	0	0	0
	Mean		,2706425	,0483098	20,0000
	Median		,2706425	,0483098	20,0000
	Std. Deviation		,20969268	,03515532	1,41421
	Minimum		,12237	,02345	19,00
	Maximum		,41892	,07317	21,00
grup CK	N	Valid	2	2	2
		Missing	0	0	0
	Mean		,8972665	,0153577	20,5000
	Median		,8972665	,0153577	20,5000
	Std. Deviation		,00685709	,00369671	,70711
	Minimum		,89242	,01274	20,00
	Maximum		,90212	,01797	21,00

Tablo 4.16. Gruplar Arası Miyelin Kalınlığı Ölçümlerinin Ck ve C Grupları Lehine Anlamlı Korelasyon Gösteren İstatistiksel Verileri

	grup	N	Mean Rank
myelin thickness	grup T	20	20,90
	grup K	20	49,43
	grup C	20	32,25
	grup CK	20	59,43
	Total	80	

	myelin thickness
Chi-Square	32,965
df	3
Asymp. Sig.	,000

Tablo 4.17. Grup T ve Grup K Arasındaki Miyelin Kalınlığı Ölçümü Anlamlı İstatistiksel Verileri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
myelin thickness	grup T	20	12,60	252,00
	grup K	20	28,40	568,00
	Total	40		

	myelin thickness
Mann-Whitney U	42,000
Wilcoxon W	252,000
Z	-4,274
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a

Tablo 4.18. Grup T ve Grup C Arasındaki Myelin Kalınlığı Ölçümü Anlamsız İstatistiksel Verileri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
myelin thickness	grup T	20	17,85	357,00
	grup C	20	23,15	463,00
	Total	40		

	myelin thickness
Mann-Whitney U	147,000
Wilcoxon W	357,000
Z	-1,434
Asymp. Sig. (2-tailed)	,152
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,157 ^a

Tablo 4.19. Grup T ve Grup Ck Arasındaki Myelin Kalınlığı Ölçümü Anlamlı İstatistiksel Verileri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
myelin thickness	grup T	20	11,45	229,00
	grup CK	20	29,55	591,00
	Total	40		

	myelin thickness
Mann-Whitney U	19,000
Wilcoxon W	229,000
Z	-4,896
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a

Tablo 4.20. Grup K ve grup C arasındaki myelin kalınlığı ölçümü anlamsız istatistiksel verileri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
myelin thickness	grup K	20	24,80	496,00
	grup C	20	16,20	324,00
	Total	40		

	myelin thickness
Mann-Whitney U	114,000
Wilcoxon W	324,000
Z	-2,326
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,020 ^a

Tablo 4.21. Grup K ve grup CK arasındaki myelin kalınlığı ölçümü anlamsız istatistiksel verileri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
myelin thickness	grup K	20	17,23	344,50
	grup CK	20	23,78	475,50
	Total	40		

	myelin thickness
Mann-Whitney U	134,500
Wilcoxon W	344,500
Z	-1,772
Asymp. Sig. (2-tailed)	,076
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,076 ^a

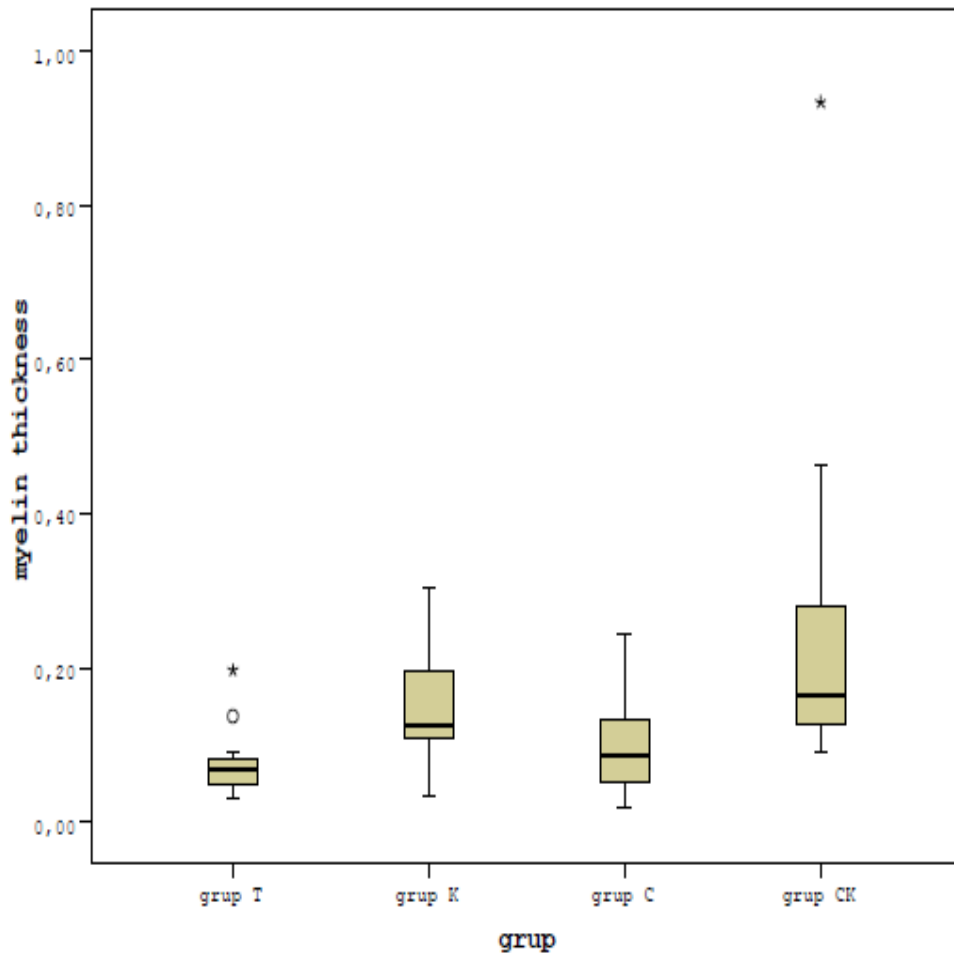
Tablo 4.22. Grup C ve grup CK arasındaki myelin kalınlığı ölçümü anlamlı istatistiksel verileri

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
myelin thickness	grup C	20	13,90	278,00
	grup CK	20	27,10	542,00
	Total	40		

	myelin thickness
Mann-Whitney U	68,000
Wilcoxon W	278,000
Z	-3,571
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a

Tablo 4.23. Grupların Myelin Kalınlığı Median Değerlerini Gösteren İstatistiksel Veriler. Grup Ck Lehine Anlamlı Veriler.

grup T	N	Valid	20
		Missing	0
	Mean		,0713
	Median		,0667
	Std. Deviation		,03834
	Minimum		,03
	Maximum		,20
grup K	N	Valid	20
		Missing	0
	Mean		,1476
	Median		,1250
	Std. Deviation		,06483
	Minimum		,03
	Maximum		,30
grup C	N	Valid	20
		Missing	0
	Mean		,1003
	Median		,0857
	Std. Deviation		,06306
	Minimum		,02
	Maximum		,24
grup CK	N	Valid	20
		Missing	0
	Mean		,2436
	Median		,1644
	Std. Deviation		,20034
	Minimum		,09
	Maximum		,93



Grafik 4.9. Grupların Myelin Kalınlığı Ölçümün Karşılaştırıldığı Grafik

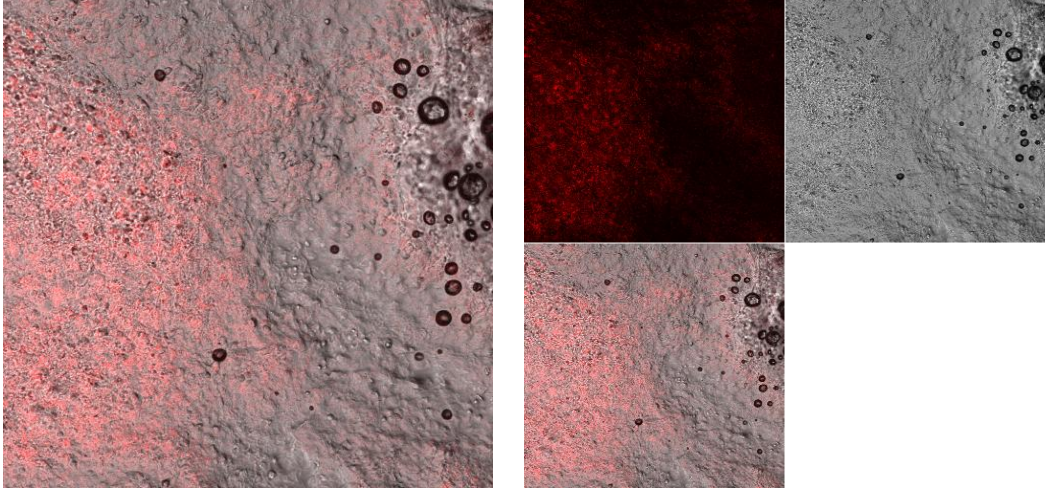
Tablo 4.24. Biyomalzemeye Doku Yanıtı Kapsamında Chitosan Tübün İç Kısmını Saran Kapsülün Mikroskopik Özellikleri Skorlanmaktadır. Her Örnek İçin Elde Edilen Total Skor Kaydedilmektedir.

Ölçütler	Skorlar				
		4	3	2	1
Kapsülün yerleşimi		İki yüzde de kapsül var	İç yüzde kapsül var	Dış yüzde kapsül var	Kapsül yok
Kapsülün yapısı		Dens	Gevşek firoadipöz ya da adipöz	Gevşek fibroelasik	Kapsül yok
Kapsülün hücresel özellikleri	Fibroblast kalınlığı	30 kattan fazla	10-30 kat	0-10 kat	0 lkat
	Fibroblastlarla temas eden yüzey			Yok	Var
	Akut-kronik inflamasyon			Kronik	Akut
	İnflamasyonun derecesi	Ciddi	Orta	Hafif	Yok
İnflamatuvar hücrelerin yerleşimi	İnflamatuvar hücrelerin yerleşimi	Sonda ve ortada	Ortada	Sonda	Yok
	Makrofajlarla temas eden yüzey			Yok	Var
	Dev hücrelerle temas eden yüzey			Yok	Var
	Polimorfonükleer lökositlerle temas eden yüzey			Yok	Var
	Plazma hücreleriyle temas eden yüzey			Yok	Var
	Kandamarlarının varlığı			Yok	Var

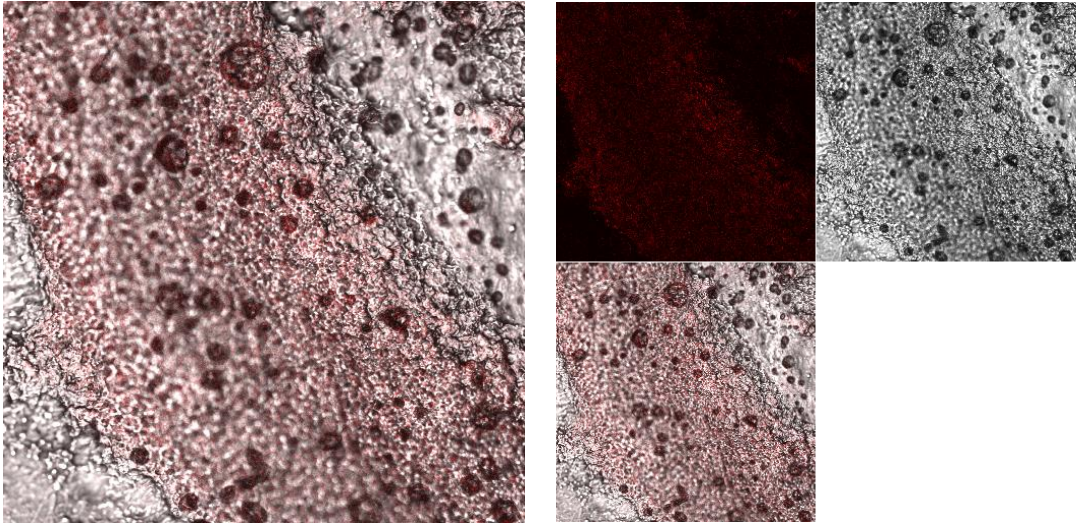
4.4. Konfokal Mikroskopik Değerlendirme

Genel anestezi altında uygun cerrahi yöntemle izole edilen ve paraformaldehit tespiti uygulanan sabit büyüklükteki medulla spinalis örneklerine, çevre yumuşak dokulardan dikkatle temizlendikten sonra % 30'luk sükröz solüsyonu içinde 6-8 saat süreyle kriyoproteksiyon yapıldı. Örnekler ardından sıvı azotta -196oC'de dondurularak inceleme için saklandı. Konfokal mikroskobunda incelenmek üzere örneklerden kriyostatta longitudinal düzlemde 40-60 µm'lik seri kesitler alındı. Konfokalde aksonlar ve kök hücrelerin gözlemlendiği bölgelerden immünohistokimyasal inceleme için ardışık 5-7 µm'lik kesitler alınarak soğuk asetonda 10 dakika süreyle fikse edildi. Hızla kurutulan kesitler -30oC'de derin dondurucuda immünohistokimyasal incelemede kullanılacak antikorlar gelinceye kadar saklandı.

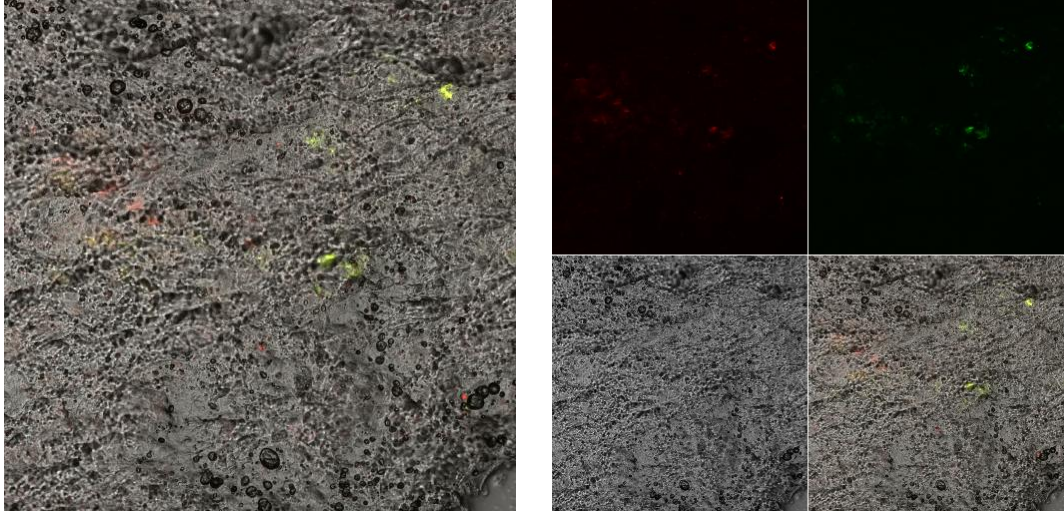
Konfokal mikrosop ile, kök hücre uygulanan gruplarda DiO fluoresan işaretli mezenkimal kök hücreler (yeşil röfle) ve her gruba standart uygulanan aksonal DiL fluoresan boyası ile işaretli (kırmızı röfle) aksonlar izlendi. Fluoresanla işaretli hücrelerin bir kısmının lezyon bölgesinde dağılmakta olduğu saptandı. DiO ve DiL floresan boyalarının lipofilik yapısı nedeniyle komşu hücrelere aktarılabilençeği olasılığı gözönünde bulundurulmalıdır.



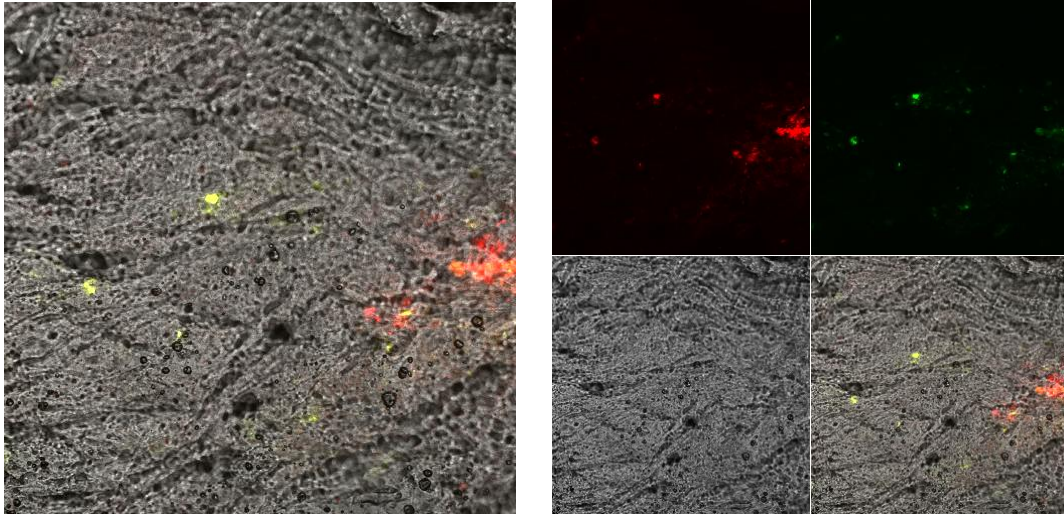
Resim 4.1. Grup C'deki Aksonların Dil Floresan Boyası İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafda Sırasıyla Pür Floresan, Tımdm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri.



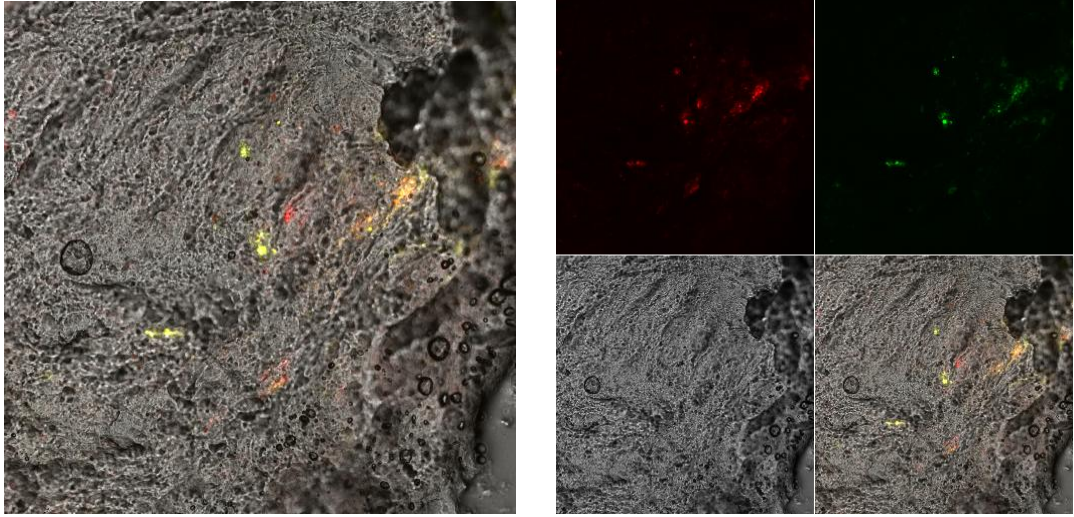
Resim 4.2 Grup T'deki Aksonların Dil Floresan Boyası İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafda Sırasıyla Pür Floresan, Tımdm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri.



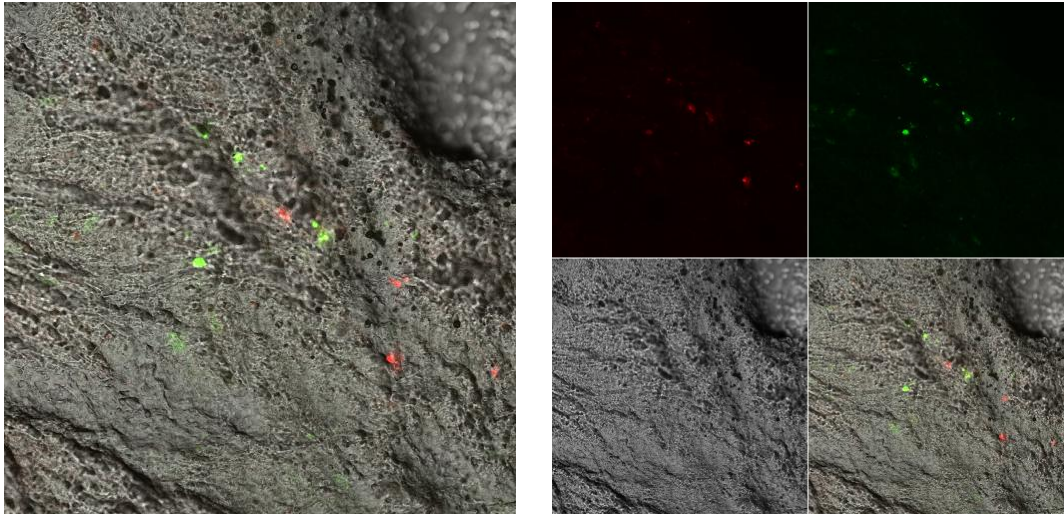
Resim 4.3. Grup K'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tımdm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri.



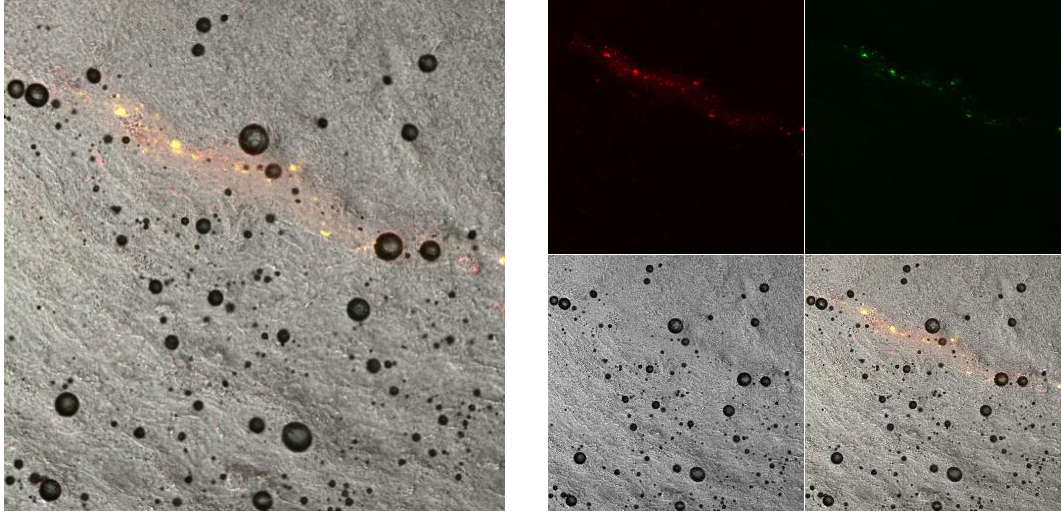
Resim 4.4. Grup Ck'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tımdm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri.



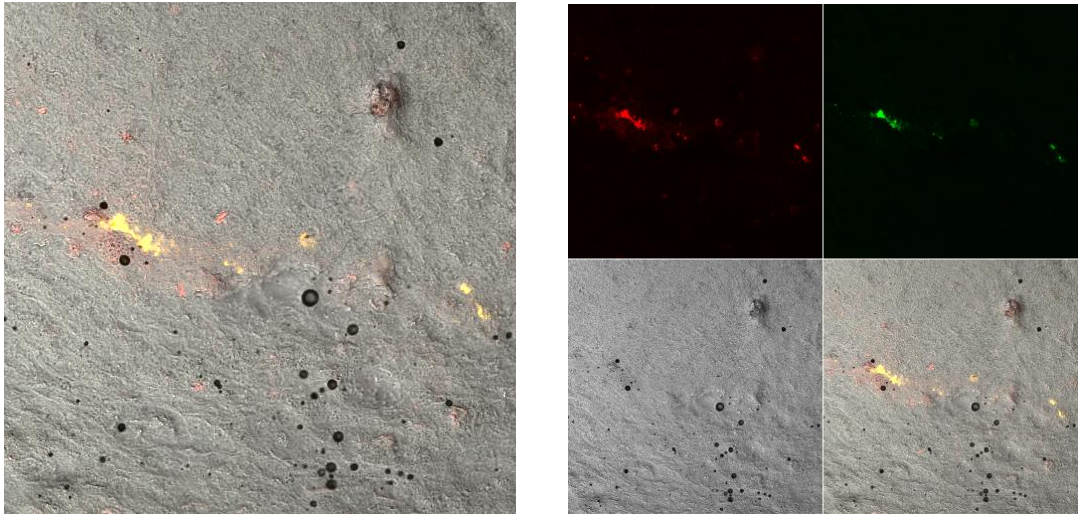
Resim 4.5. Grup CK'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafda Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri.



Resim 4.6. Grup K'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafda Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tmldm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri.



Resim 4.7. Grup Ck'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tımdm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri.



Resim 4.8. Grup Ck'daki Aksonların Dil Floresan Boyası ve Transplante Edilen Mkh'lerin Dio Floresan İle İşaretli Görüntüleri. Sağ Tarafa Sırasıyla Pür Floresan Dil ve Dio Görüntüleri, Tımdm Modu ve Her İki Görüntünün Süperpoze Edilen Halleri.

5. TARTIŞMA

Omurilik yaralanmalarında, aksonal devamlılığı bozan patolojik süreç yol açtığı fonksiyonel kayıp yanında hasta, aile, toplum ve devlet üzerinde fiziki, emosyonel ve ekonomik boyutta tahrip edici sonuçlar doğurmaktadır. Bu nedenle özellikle son 50 yıldır yoğun olarak deneklerde omurilik travma modelleri oluşturulmakta ve tedavisi için çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejiler omuriliğin endojen cevabını nötrofik yönde arttırıcı çabaları içermektedir. Bu amaçla çeşitli köprü biyomateryaller, hücre veya genomik transferler, çeşitli enzim veya büyüme faktörleri ya da bunların kombinasyonu denenmektedir. Klinik olarak komplet omurilik yaralanmalı hastalarda yaralanmanın en sıklıkla karşılaşılan birincil mekanizması özellikle subpial bölgede bir parça nörolojik dokunun korunduğu, kemik veya diskin yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkan akut kompresyon ya da nöral dokunun korunamadığı akut transeksiyondur. Klip kompresyon, omuriliğin tam ya da yarı kesileri gibi travma modelleri oluşturularak insanda omurilik yaralanmalarının histolojik olarak bir benzerinin yaratılması amaçlanmakta ve patofizyolojisi anlaşılmaya çalışılmaktadır. Günümüzde gelinen nokta itibariyle insan omuriliğinde aksonların devamlılığını bozan ve ağır fonksiyonel kayıplara yol açan bir travmanın etkin bir tedavisi yoktur. Bu duruma yol açan sebeplerin başında hasarlı alanın onarımında erişkin SSS dokusunun cevabının yetersiz olması gelmektedir. Aslında erişkinlerde karşılaşılan bu yetersizlik beyin ve omurilik dokusunda en azından aktivite baımdan farklılıklar göstermektedir. Bilindiği gibi erişkin memeli ve insanlarda ön beyin lateral ventrikül subependiması kök hücrelerin kaynağı olarak kabul edilmektedir (38). Bu beyinde yer alan multipotent precursor hücreler, yaşam boyunca bu özelliklerini aktif olarak korur ya da sürdürürken omurilikte bu kök hücre kaynağı olma potansiyali taşıyan santral kanal çevresi ependimal hücreler doğumdan sonra sessiz ve inaktif döneme geçmektedir. Erişkin ratların ependimasında bu hücreler artık bulunmazlar. Ancak omurilikte bir yaralanma durumunda inaktif ya da sessiz durumda olan bu hücrelerin embriyonik dönemdeki aktif duruma geçtikleri gözlemlenmiştir (37). Daha sonraki çalışmalarda in vivo kök hücre kaynağı olarak omurilik santral kanal çevresindeki ependimin de kullanılabileceği anlaşılmıştır. Ancak günümüzde gelinen nokta itibariyle bu tür kök

hücre çalışmalarında her 2 kaynaktan hangisinin rejenerasyon da daha üstün ve nitelikli olduğu ortaya konulamamıştır. Bu hücrelerin büyük çoğunluğunun travma sonrası süreçte glial yönde farklılaştığı ve belirli mesafelere göç etme yeteneklerinin olduğu gözlemlendi. Ancak bu hücrelerin travmanın 3. Gününde sayısal olarak maksimum düzeyde cevap verdiği daha sonraki 14 günlük süreçte giderek azaldığı tespit edilmiştir. Bu da omuriliğin travmaya karşı olan endojen cevabının başlangıçta var olduğunu ve daha sonraki süreçte bu cevabın hızlı bir şekilde aaldığını göstermektedir (39). Birçok endojen ve eksojen faktörün etkili olduğu böylesi bir travmada sağaltıcı uygun bir algoritma elde etmek maalesef mümkün olamamıştır. Daha sonraki süreç içerisinde bu endojen cevap geliştirilmeye çalışıldı ise de hasarlı alanda daha fazla kök hücre bulunması için in vitro kültür ortamında çoğaltılan ve yönlendirilen bu hücrelerin eksojen transplantasyonuna ve biyomateryallerle birlikte kullanımına yönelindi. Günümüzde çalışmalar özellikle köprü biyomateryaller ile bunların çeşitli orjinlerden sağlanan kök hücreler ile kombinasyonu sonucu anlamlı sonuçlara elde edebilmek üzerine yoğunlaşmıştır. Birçok sentetik, yarı sentetik, doğal biyomateryaller denenmiş fakat travma alanında ideal bir köprü çatı kurulamamıştır. İn vivo çalışmalarda kullanılan kök hücrelerin – eğer hayatta kalabilmeleri sağlanabilirse- çeşitli dokulara farklılaşabildikleri tespit edilmiş fakat henüz kök hücrelerin nöronlara farklılaşması gösterilememiştir. Travma modellerinde erişkin mezenşim kaynaklı kök hücrelerin kullanımı sıklaşmıştır. Erişkin mezenşim kaynaklı kök hücrelerin: Kolayca izole edilebilmeleri ve kültür ortamında çok sayıda çoğaltılabilmeleri, in vitro pasajlama sırasında genetik anormalliklere yatkınlıklarının daha az olması nedeni ile diğer kök hücrelere görece daha düşük oranda kanser riski taşımaları, rejeksiyonu önlemek için immünsüpresif tedaviye gerek olmadan otolog olarak verilebilmeleri, hipoinmünojenik olmaları nedeni ile allojenik MHK uygulamalarına olanak sağlamaları, intravenöz yolla verildiklerinde hasarlanmış dokuya yerleşebilmeleri ve etik olarak en uygun kök hücre çeşidi olmaları bu konuda büyük etken teşkil etmektedir. Bir biyomateryal olarak Chitosan'ın tomurilik travma modellerinde kullanımı ilk kez Dr. Charles Tator tarafından gündeme getirilmiş olup ilk çalışmalar da kendisi ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.

Bu çalışmada akut dönemde omurilik yaralanmasında endojen cevaptaki yetersizliğin in vitro ortamda çoğaltılan erişkin mezenşim kaynaklı stem/ progenitor hücreler ve bir biyomateryalle aşılmasına çalışıldı; bir biyomateryal olan Chitosan ile insan erişkin mezenşim kaynaklı kök hücrelerin akut omurilik yaralanması (transeksiyon modeli) travma modelinde kombine olarak uygulandı. Literatürde omurilik transeksiyon modelinde Chitosan ile daha çok nöronal kaynaklı kök hücre (allogreft ya da ksenogreft olarak) çalışmaları mevcuttur. Çalışmamızın bu yönden bir ilki teşkil etmektedir.

Çalışmamızda transeksiyona maruz bırakılmış omuriliğe ekstramedüller olarak yerleştirilen Chitosan tüp içerisindeki erişkin kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin yaşamda kalma, aksonal filizlenme üzerindeki etkisi, diğer hücrelere farklılaşabilme kabiliyetlerinin ve bunların bir sonucu olarak kaybedilen fonksiyonlardaki düzelme derecesinin irdelenmesi amaçlanmıştır. İmmünohistokimyasal çalışma henüz tamamlanmamış olup bu incelemeden çıkacak olan sonuçlar önem taşıdığı göz ardı edilmemelidir. Yapılan histolojik (ışık ve elektron mikroskobisi) ve konfokal mikroskobisi incelemelerinden elde edilen verilerin immün histokimyasal inceleme tamamlanması önem arz etmektedir. Bulgular deneklerin 4 hafta yaşatılması sonrası sakrifiye edilmesi ile elde edilmiştir. Travma sonrası 4 hafta yaşatılan deneklerin fonksiyonel düzeyleri belirlenen zaman aralıklarında (0. ve 1. gün, 1. hafta, 3. hafta ve 1. ay) BBB skorlaması ile tayin edilmiş ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Grup içi zaman aralıklarında ise anlamlı bir korelasyon elde edilmiştir. Yapılan histolojik incelemelere; elektron mikroskobisi altında aksonal myelin kalınlıkları değerlendirilmiş ve grup CK lehine anlamlı bir korelasyon elde edilmiştir. Işık mikroskobisinden elde edilen ilk veriler ile bu yönde bir uyum gözlenmiştir. Konfokal mikroskobisi altında yapılan değerlendirmelerde, DiL floresan boyası ile işaretlenen aksonlar kesit alanlarında gösterilmiş yine DiO floresan boyası ile inkübe edilerek işaretlenen mezenşimal kaynaklı kök hücreler ilgili gruplardan elde edilen preparatların kesit alanlarında gösterilmiştir. Fakat gösterilen hücrelerin yaşamda kalıp kalmadığı, farklılaşma gösterip göstermediği immünohistokimyasal incelemeye

muhtaçtır. DiO ve DiL floresan boyalarının lipofilik özellikleri de bu yönde bir çalışmayı zaruri kılmaktadır.

Bu süre zaafında klinik bir iyileşmenin görülmesi neredeyse imkansız olup zaman ilerledikçe aksonal rejenerasyonun tamamlanacağı ve artık iyileşmenin olmayacağı kabul edilen süre (yaklaşık 2 yıl) ulaşılacaktır. Bu durumu ortaya koymak için daha uzun süreli çalışmalar gereklidir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada deneysel omurilik transeksiyon modelinde Chitosan tüpler içerisinde transplante mezenkimal kök hücrelerin etkisi incelenmiştir. Hasarlı SSS'nin rejenerasyonunu teşvik etmek amacıyla hücresel transplantasyon ile köprü biyomateryallerin kombine kullanımı gerçekleştirilmiştir. Travma sonrası 4 hafta yaşatılan deneklerin fonksiyonel düzeyleri belirlenen zaman aralıklarında (0. ve 1. gün, 1. hafta, 3. hafta ve 1. ay) BBB skorlaması ile tayin edilmiş ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Grup içi zaman aralıklarında ise anlamlı bir korelasyon elde edilmiştir. Yapılan histolojik incelemelere; elektron mikroskopisi altında aksonal myelin kalınlıkları değerlendirilmiş ve grup CK lehine anlamlı bir korelasyon elde edilmiştir. Işık mikroskopisinden elde edilen ilk veriler ile bu yönde bir uyum gözlenmiştir. Konfokal mikroskopi altında yapılan değerlendirmelerde, DiL floresan boyası ile işaretlenen aksonlar kesit alanlarında gösterilmiş yine DiO floresan boyası ile inkübe edilerek işaretlenen mezenşimal kaynaklı kök hücreler ilgili gruplardan elde edilen preparatların kesit alanlarında gösterilmiştir. Fakat gösterilen hücrelerin yaşamda kalıp kalmadığı, farklılaşma gösterip gösteremediği immünohistokimyasal incelemeye muhtaçtır. DiO ve DiL floresan boyalarının lipofilik özellikleri de bu yönde bir çalışmayı zaruri kılmaktadır.

Kök hücre transplantasyon çalışmaları omurilik yaralanmalarının tedavisine yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Şüphesiz ki en ideal tedavi yöntemine ulaşmak için alınması gereken önemli bir mesafe vardır. Bugüne kadar elde edilen bilgilerle omurilik yaralanmalarının patofizyolojisi tamamen aydınlatılabilmemiş değildir. Dejenerasyon ve rejenerasyon süreçlerinin anlaşılması, ideal biyomateryallerin ve kök hücre transplantasyonlarındaki etkin yöntemlerin bulunması bu yöndeki ilerlemelere temel oluşturacaktır.

7. KAYNAKÇA

- 1- Schwab ME, Bertholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.* 76: 319- 370, 1996.
- 2- Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons, a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 38: 1176- 1195, 1996.
- 3- Brodkey JA, Gates MA, Laywell ED, Steindler DA. The complex nature of interactive neuroregeneration- related molecules. *Exp. Neurol.* 123: 251- 270, 1993.
- 4- Condorelli DF, Dell'Albani P, Kaczmarek L, Messina L, Spampinato G, Avola R, Messina A, Guiffrida Stella AM. Glial fibrillary acidic protein Messenger RNA and glutamine synthetase after nervous system injury. *J. Neurosci. Res.* 26: 251- 257, 1990.
- 5- Neumann H, Bonerant J, Hahnel, C, Misgeld T, Wekerle H. Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur. J. Neurosci.* 8:2581- 2590, 1996.
- 6- Choung CM, Chen HM. Enhanced expression of neural cell adhesion molecules and tenascin (cytotactin) during wound healing. *A. R. P. m. J. Pathol.* 138: 427- 440, 1991.
- 7- Maxwell WL, Follows R, Ashhurst DE, Berry M. The response of the cerebral hemisphere of the rat to injury. I. The mature rat. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 328: 36-500, 1990.
- 8- Stichel CC, Muller HW. Relationship between injury- induced astrogliosis, laminin expression and axonal sprouting in the adult rat brain. *J. Neurocytol.* 23: 615- 630, 1994.
- 9- Stichel CC, Muller HW. Extensive and long- lasting changes of glial cells following transection of the postcommissural fornix in the adult rat. *Glia.* 10: 89- 100, 1994.

- 10- Richardson PM, Issa VMK, Shemie S. Regeneration and retrogradedeeneration af axons in rat optic nevre. *J. Neurocytol.* 11: 949- 966, 1982.
- 11- Povlishock JT, Christman CW. The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans. A review of current thoughts. *J. Neurotrauma* 12: 555- 564, 1995.
- 12- Avellino Am, Hart D, Dailey AT, MacKinnon M, Ellegala D, Klio M. Differatial macrophage responses in the peripheral and central nervous system during Wallerian degeneration of axons. *Exp. Neurol.* 136, 183- 198, 1995.
- 13- Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43, an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *TINS* 20: 84- 91, 1997.
- 14- Kroeemer G. The proto- oncogene Bcl-2 and its role in regulating apopitosis. *Nature Med.*3: 614- 620, 1997.
- 15- Asada H, Kaseloo PA, Ís A, Petti DM, Plunkett RJ. Traumatized rat striatum produces neurite- promoting and neurotrophic activities in vitro. *Exp. Neurol.* 139: 173- 187, 1996.
- 16- Ip NY, Wiegand SJ, Morse J, Rudge JS. Injury- induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 5: 25- 33, 1993.
- 17- Schwab ME, Thoenen H. Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nevre explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J. Neurosci.* 5: 2415- 2423, 1985.
- 18- Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody- againts myelin associated neurite growht inhibitors. *Nature* 342: 269- 272, 1990.
- 19- Schnell L, Schwab ME. Sprouting andregeneration of lesioned corticospinal tract fibres in the adult rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 5: 1156- 1171, 1993.

- 20- Zhang Y, Anderson PN, Campbell G, Mohajeri H, Schachner M, Lieberman AR. Tenascin-C expressions by neurons and glial cells in the rat spinal cord changes during postnatal development and after dorsal root or sciatic nerve injury. *J. Neurocytol.* 24: 585- 601, 1995.
- 21- Brodkey JA, Gates MA, Lywell ED, Steindler DA. The complex nature of interactive neuroregeneration-related molecules. *Exp. Neurol.* 123: 251- 270, 1993.
- 22- Harding TE, Fosang AJ. Proteoglycans, many forms and many functions. *FASEB J.* 6: 861- 870, 1992.
- 23- Snow DM, Letourneau PC. Neurite outgrowth of a step gradient of chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurobiol.* 23: 322- 336, 1992.
- 24- Davies SJA, Fitch MT, Memeberg SP, Hall AK, Raismann G, Silver J. Regeneration of adult axon in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390: 680- 683, 1997.
- 25- Reier PJ, Stensaas LJ, Guth L. The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system. In: *Spinal cord reconstruction*, pp. 163- 196. Eds. C. C. Kao R. P. Bunge and P.J. Reier. Raven Press, New York, 1983.
- 26- Stichel CC, Niermann H, Lausberg F, Hermanns S, d'U D Servos, Muller HW. Axonal regeneration through a modified CNS lesion scar. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 1998.
- 27- Stichel CC, Kappler J, Junghaus U, Koops a, Kresse H, Muller HW. Differential expression of the small chondroitin dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain. *Brain Res.* 704: 263- 274, 1995.
- 28- Stichel CC, Wunderlich G, Schwab ME, Muller HW. Clearance of myelin constituents and axonal sprouting in the transected postcommisural fornix of the adult rat. *Eur. J. Neurosci.* 7: 401- 411, 1995.

- 29- Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367: 170- 173, 1994.
- 30- Oueda M, hagg T. Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 140: 218- 229, 1996.
- 31- McFarlane S Hlt CE. Growth factors: a role in guiding axons. *Trends.Cell. Biol.* 7: 424- 430, 1997.
- 32- Kuffler DP. Chemoattraction of sensory neuron growth cones by diffusible concentration gradients of acetylcholine. *Mol. Chem. Neuropathol.* 28: 199- 208, 1996.
- 33- Garner AA. The role of physician staffing of helicopter emergency medical services in prehospital trauma response. *Emerg. Med. Australas.* 16:318- 323, 2004.
- 34- Junger EC, Newell DW, Grant GA, Avellino AM, Ghatan S, Douville CM, Lam AM, Aaslid R, Winn HR. Cerebral autoregulation following minor head injury. *J. Neurosurg* 86(3): 425- 432, 1997.
- 35- Verweij BH, Amelink GJ, Muizelaar JP. Current concepts of cerebral oxygen transport and energy metabolism after severe traumatic brain injury. *Progress in Brain research* 161: 11- 124, 2007.
- 36- Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *BR Anaesthesia* 99(1): 4- 9, 2007.
- 37- Temple S, Alvarez- Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9(1): 135- 41, 1999.
- 38- Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D. Is there a neuro stem cell in the mammalian forebrain? *Trends. Neurosci.* 19(9): 387- 393, 1996.

- 39- Marthens DJ, Seaberg RM, van der Kooy D. Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor- responsive and epidermal growth factor responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. *J. Neurosci.* 20(3): 1085- 95, 2000.
- 40- Martens DJ, Seaberg RM, van der Kooy D. In vivo infusion of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult Mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and central canal of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 16(6): 1045- 57, 2002
- 41- Dervan AG, Roberts BL. Reaction of spinal cord central canal cells to cord transection and their contribution to cord regeneration. *J. Comp. Neurol.* 458(3):293- 306. 2003.
- 42- Egar M, Singer M. The role of ependyma in spinal cord regeneration in the urodele, *Triturus*. *Exp. Neurol.* 37(2): 422- 430, 1972.
- 43- Simpson SBjr., duffy MT. The lizard spinal cord: a model system for the study of spinal cord injury and repair. *Prog. Brain Res.* 103: 229- 241, 1994.
- 44- Bruni JE. Ependymal development, proliferation and functions: a review. *Microsc. Res. Tec.* 41(1): 2- 13, 1998.
- 45- Matthews MA, St. Onge MF, Faciane CL. An electron microscopic analysis of abnormal ependymal cell proliferation and envelopment of sprouting axons following spinal cord transection in the rat. *Acta Neuropathol.* 45(1): 27- 36, 1979.
- 46- Wallace MC, Tator CH, Lewis AC. Chronic regenerative changes in the spinal cord after cord compression injury in rats. *Surg. Neurol.* 27(3): 209- 219, 1987.
- 47- Kraussis D, Kassis I. The potential use of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: an overview of preclinical experience. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 110: 889- 896, 2008.
- 48- Abdallah BM, Kassem M. The use of mesenchymal stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. *J. Cell Physiol.* 218: 9- 12, 2009.

- 49- Zietlow R Lane EL, Dunnet SB, et al. Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res.* 331: 301- 322, 2008.
- 50- LiuZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochemst.*106: 984- 991, 2009.
- 51- Müller I, Lymperi S, Dazzi F. Mesenchymal stem cell therapy for degenerative inflammatory disorders. *Curr Opin Organ Transplant.*13:639- 644, 2008.
- 52- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, et al. mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine *Int. J. Biochem Cell Bio.* 40: 815- 820, 2008.
- 53- Patel SA, Sherman L, Munoz J, et al. Immunological properties mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol. Ther Exp.* 56: 1-8, 2008.
- 54- Giordano A, Galderisi, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells.
- 55- Spitkovsky D, Hesheler J.. Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 17: 79- 90, 2008.
- 56- Ozawa K, Sato Oh I, et. Al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells. *J. Autoimmun.* 30: 121- 127, 2008.
- 57- Scolding Ni Marks D, Rice C. Autologous mesenchymal bone marrow stem cells: practical considerations. *J. Neurol Sci.* 265: 111- 115, 2008.
- 58- Endo T stem cells and plasticity of skeletal muscle cell differentiation: potential application to cell therapy for degenerative muscular diseases. *Regen Med.* 2: 243- 256, 2007.
- 59- Kassem M, Abdallah BM. Human bone- marrow- derived mesenchymal stem cells: *Cell Tissue Res.* 331: 157- 163, 2008.

- 60- Pelagiadis I, Dimitriou H, Kalmanti M. Biologic characteristics of mesenchymal stromal cells and their clinical applications in pediatric patients. *J. Pediatric.Hematol Onco.*30: 301- 309, 2008.
- 61- Slavin S, Kurkalli BG, Karuissis D. The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clin Neurol. Neurosurg.* 110: 943- 946, 2008.
- 62- Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheum.* 47: 126- 13, 2008.
- 63- Dezawa M. Insights into autotransplantation: the unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. *Cell Mol Life Sci.* 63: 2764- 2772, 2006.
- 64- Schaefer R, Kehlbach R, Müller M, et al. Labeling of human mesenchymal stromal cells with superparamagnetic iron oxide leads to a decrease in migration capacity and colony formation ability. *Cytotherapy.* 11: 68-78, 2009.
- 65- Zietlow R, Lane EL, Dunnet SB, et al. Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res.* 331: 301- 322, 2008.
- 66- Feng SW, Lu XL, Liu ZS, et al. Dynamic distribution of bone- marrow- derived mesenchymalstromal cells and change of pathology after infusion into mdx mice. *Cytherapy.* 10: 254- 264, 2008.
- 67- Honig MG, Hume RI. Carbocyanine dyes. Novel markers for labelling neurons. *Trends. Neurosci.* 12(9): 336-8, 1989.
- 68- Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci.* 20(23): 8727- 8735, 2000.
- 69- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus- derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383(6601): 624- 627, 1996.

- 70- Bakhsi A, Hunter C, Swanger S, Lepore A, Fisher I. Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. *J. Neurosurg. Spine.* Oct;1(3): 330- 337, 2004.
- 71- Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, Glogarova K, Kruopova J, Andersson B, Bryja V, Burian M, Hajek M, Sykova E. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 76(2): 232- 243, 2004.
- 72- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32(4): 1005- 1011, 2001.
- 73- Modo M, Rezai P, Heuschling P, Patel S, Male DK, Hodges H. Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short term graft survival and acute host immunological response. *Brain Res.* 20; 958(1): 70- 82, 2002.
- 74- Weiss ML, Mitchell KE, Hix JE, Medicetty S, El-Zerkouny SZ, Grieger D, Troyer DL. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp. Neurol.* 182(2): 288- 299, 2003.
- 75- Wu P, Tarasenko YI, Gu Y, Huang LY, Coggeshall RE, Yu Y. Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. *Nat. Neurosci.* 5(12): 1271- 1278, 2002.
- 76- Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury. *Curr. Opin. Neurol.* 16(6): 711- 715, 2003.
- 77- Woerly S, Pinet E, DeRobertis L, Bousmina M, Laroche G, Roitback T, Vargova L, Sykova E. Heterogeneous PHPMA hydrogels for tissue repair and axonal regeneration in the injured spinal cord. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9(7): 681- 711, 1998.
- 78- Gautier SE, Odega M, Fragoso M, Chapon P, Plant GW, Bunge MB, Parel JM. Poly(alpha-hydroxyacids) for application in the spinal cord. *J. Biomed. Mater. Res.* 42(4):642- 654, 1998.

- 79- Xu XM, Zhang SX, Li H, Aebischer P, Bunge MB. Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann- cell- seeded mini- cahnnel implanted into hemisected. Adult rat spinal cord.. Eur. J. Neurosci. 11(5): 1723-1740,1999.
- 80- Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. Exp. Neurol. 181(2): 115- 129, 2003.
- 81- Zhang L, Thomas WJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. Nano today 4: 66- 80, 2009.
- 82- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 260: 920- 926, 1993.
- 83- Hirano S. Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th edn.p. 231.Elvers, 1994.
- 84- Yao K, Peng T, Yin Y, Xu M. JMR rev. Macromal. Chem. Phys. C35: 155, 1995.
- 85- Khalof SA. International Journal of Agriculture and biology. 6(6): 1033- 1036, 2004.
- 86- Muzzarelli RA, Mattioli M, Pugnali A, Biagini G. Biochemistry, histology and clinical uses of Chitins an Chitosans in wound healing. In chitin and chitosan, Birkhauser, Basel, 1999.
- 87- Kenawy E, Abdel- Hay I, El- Magd AA, Mamoud Y. J. Bioact. Comp. Pol. 20:95, 2005
- 88- Malette WG, Qigley HJ, Gaines RD, Johson ND, Rainer WG. Am. Thor. Surg. 36: 55- 58, 1983.
- 89- Nagyvary JJ, Falk JD, Hill ML, Schmidt ML, Wilkins AK, Bradbury EL. Nutri. Rep. Int. 20: 677- 684, 1979.
- 90- Denkbaş EB, Odabaşı MA. Journ. App. Polymç Scie, Vol 76, 1637- 1643, 2000.

- 91- Öztürk E, Ergün MA, Öztürk Z, Nurözler AB, Keçeci K, Özdemir N, Denkbaş EB. *Int. Jour. Artif. Organs*, 29(2): 228- 238, 2006.
- 92- Freier T, Montenegro R, Shan Koh H, Shoichet MS. Chitin- based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials* 26(22): 4624-32, 2005.
- 93- Itoh S, Suzuki M, ymaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka j. Development of a nevre scaffold sin a tendon chitosan tube. *Arti. Organs*. 27(12): 1079- 1088, 2003.
- 94- Rosales -Cortes M, Peregrina- Sandoval J, Banuelos- Pineda J, Castellanos- Martinez EE, Gomez- Pineodo UA, Albarran- Rodriguez e. Regeneration of the axotomised sciatic nevre in dogs using the tubulisation technique with chitosan biomaterial preloaded with progesterone. *Rev. Neurol.* 36(12)1137- 1141, 2003.
- 95- Yuan Y, Zhang P, Yang Y, Wang X, Gu X. The interrraction of schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials* 25(18): 4273- 4278, 2004.
- 96- Popovich PG, Van Rooijen N, Fickey WF, et al. Hematogenous macrophages express CD8 and distribute to regions of lesion cavitation after spinal cord injury. *Experimental Neurology* 182:275–87, 2003.
- 97- Basso Dm, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotr.* 12: 1- 21, 1995.
- 98- NomuraH, Zahir T, Kim H, Katayama Y, Kulbatski I, Morshead CM, Shoichet MS, Tator CH. Extramedullar chitosan channels promote survival of transplanted neural stem and progenitor cells and create a tissue bridge after complete spinal cord transection. *Tissue Eng Part A*14(5): 649-664, 2008.
- 99- Li X, Yang Z, Zhang A, Wang T, Chen W. Repair of thorasic cord injury by chitosan tube implantation in adult rats. *Biomaterials* 30: 1121-32, 2009.

- 100- An YH and Friedman RJ eds. *Animal Models in Orthopedic Research*, An YH and Friedman RJ eds., CRC press, Raton, pp 402-403, (1999).
- 101- Bölgen N, Vargel İ, Korkusuz P, Menceloğlu YZ, Pişkin E. In vivo performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions. *J Biomed Mat Res Part B: Applied Biomaterials*, (2007);81B:530-43.