

# DONDURULMUŞ PERİFERİK SİNİR GREFTLERİNDE SCHWANN HÜCRESİ MİGRASYONU

Zeki CAN, Kutlu SEVİN, Erdem YORMUK  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi ABD, Cebeci-Ankara

## SUMMARY

Freeze-dried sciatic nerve grafts containing cultured Schwann cell population were anastomosed to severed sciatic nerve ends in adult inbred Fischer rats. In order to prevent any axonal ingrowth to the graft and direct physical contact between axons and cultured Schwann cells, Sciatic nerve ends were ligated at the anastomosis sites. The grafts were examined 15 days to 8 weeks after operation. The distance migrated by the Schwann cells were evaluated by using immunofluorescence for S-100 protein. Schwann cells migrating through the graft, formed columns which looked like bands of Bungner. The maximum distance penetrated by the Schwann cells was 11.5 mm and this was achieved at 8 weeks after the operation. This is nearly half of the maximum distance migrated by the Schwann cells accompanying axons in similar grafts. In this paper, the reasons for this shorter migration distance and the importance of these results for the axonal regeneration through acellular grafts are discussed.

Memeli periferik sinir aksonları yaralanmalardan sonra yüksek rejenerasyon yeteneğine sahiptirler. Periferik sinir lifleri santral sinir sistemi içine doğru rejenerasyon olmazken (1,2), santral sinir sistemi lifleri periferik sinir grefti boyunca rejenerasyon olabilmektedir (3). Bu gerçeklerin ışığında yüksek rejenerasyon potansiyelinin, kısmen yaralanmış periferik sinir gövdesinin sağladığı ortama bağlı olduğuna inanılmaktadır. Rejenerasyon olan periferik sinir aksonları hemen daima bir Schwann hücresi veya diğer bir periferik glial hücre ile temas halindedir (4,5). Dahası, Schwann hücresi proliferasyonu inhibe edildiğinde proksimal güdükten aksonun tomurcuklanma güçleşmektedir (6). "Freeze-dried" (asellüler) greftlerde aksonal ilerleme greftin ilk 10-20 mm'sinde sınırlı kalmaktadır (7). Rejenerasyon bittiğinde kasonun distal 2-3 mm'lik kısmı, Schwann hücresi desteğinden yoksun bulunmaktadır (8). Rejenerasyonda 10-20 mm uzunluktan sonra görülen bu yetmezliğin, yaralanmış sinire ait intrinsek faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir. En muhtemel intrinsek faktör de, "freeze-dried" greft

## ÖZET

Kültür Schwann hücresi içeren freeze-dried siyatik sinir greftleri, erişkin Fischer ratlarının kesilen siyatik sinir uçlarına anastomoz edildi. Greft içine aksonal büyüme ve direkt aksonal teması önlemek için anastomoz bölgesinde siyatik sinir uçları bağlandı. Greftler 15 günden 6 haftaya dek incelendi. Schwann hücrelerinin kat ettiği mesafe S-100 proteini için immüno Floresans tekniği ile değerlendirildi. Greft boyunca ilerleyen Schwann hücreleri Bungner bantlarına benzeyen kolonlar oluşturdular. Schwann hücrelerinin kat ettiği maksimum mesafe 11.5 mm idi ve buna 8. haftada ulaşıldı. Bu mesafe benzer greftlerde kasonların eşlik ettiği durumda kat edilen mesafenin yaklaşık yarısıdır. Bu yazıda asellüler greftlerdeki daha kısa migrasyon ve bu sonuçların aksonal rejenerasyon için önemi tartışılmaktadır.

**Key words :** Schwann cell culture, nerve graft.

içinde Schwann hücresinin migrasyon yeteneğinin kısıtlanmış olmasıdır. Bu hipotezin denenmesi amacıyla aksonların bulunmadığı ortamda Schwann hücresi migrasyonu incelendi. S-100 proteinine karşı immunofloresans boyama ve elektronmikroskopi incelemesi sonucunda, greft içinde Schwann hücrelerinin 11 mm uzaklığa kadar göç edebildiği saptandı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma University College London, The Rayne Institute'de "Sinir iyileşmesinde Schwann hücrelerinin rolü" adlı deneysel araştırmanın bir aşaması olarak yapılmıştır. Deney boyunca olası immünolojik reaksiyonları önlemek amacıyla yetişkin inbred (izojenik) Fischer ratları kullanıldı. Donör hayvanlardan alınan siyatik sinirlerden Dulbecco modifiye Eagle ortamında Schwann hücre kültürü yapıldı. Kontaminant fibroblast sayısını azaltmak amacıyla re-eksplantasyon işlemi üç defa tekrarlandı. Tersiyer kültürde % 95-97 saflık derecesine ulaşıldı.

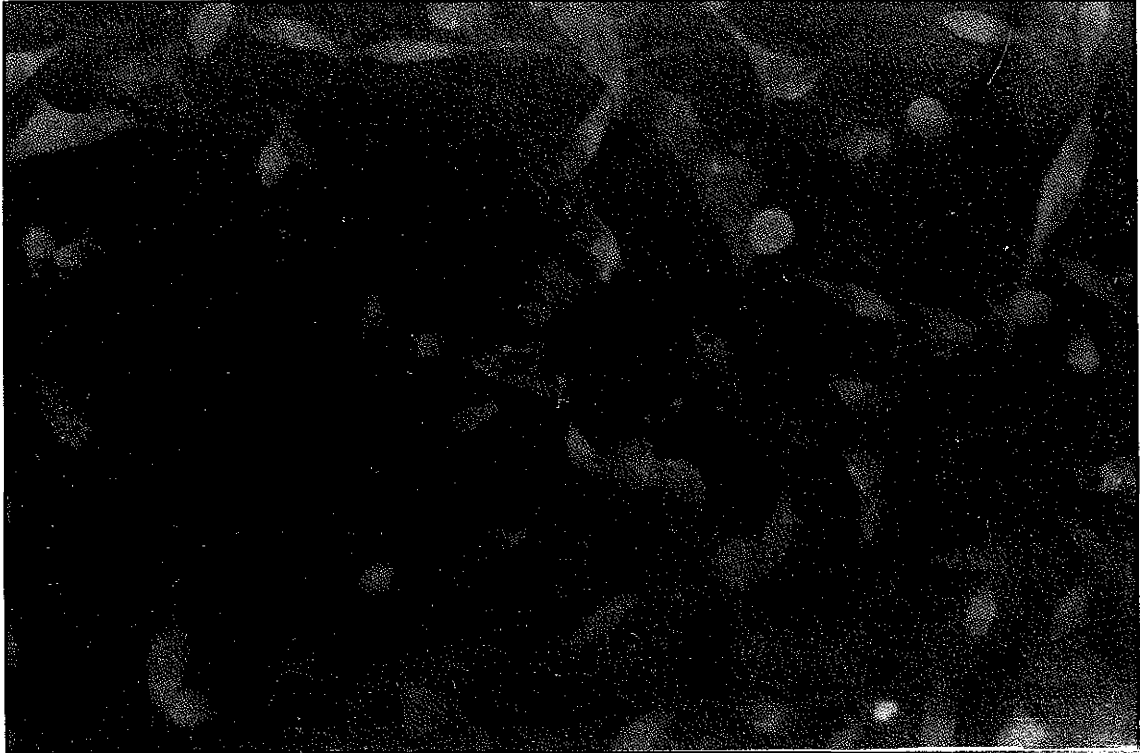
## SCHWANN HÜCRESİ MİGRASYONU

"Freeze dried" sinir greftinin hazırlanması için, donör hayvanlara intraperitoneal chloral hydrate (400 mg/100 gr) anestezisi uygulanarak siyatik sinirleri ortaya kondu. Sinire yapışık olan kas ve yağ parçacıkları temizlenerek, 5 cm uzunlukta segmentler çıkarıldı. Hemen sonra Hanks'in dengeli tuz solüsyonunda yıkandı. Yıkanan sinirler alüminyum folyaya sarılarak sıvı nitrojen tankına yerleştirildi. Donmuş greftler gece boyunca "Edward's freeze-dryer"ında bekletildi. Greftler deneyden 15 dakika önce tekrar Hanks'in dengeli tuz solüsyonuna alındı. Her bir greftin proksimal ucunun 10 mm distaline, 1 ml intraneural olarak Schwann hücresi konsantrasyonu enjekte edildi. İçine Schwann hücresi enjekte edilmiş 4 cm uzunluğundaki "freeze-dried" siyatik sinir greftleri alıcı Fischer ratlarının siyatik sinirlerinden bir segmentinin çıkarılmasıyla oluşturulan sinir defektinin proksimal güdüğüne 10/0 naylon sütür ile (Ethicon) anastomoz edildi. Anastomozdan önce, greft içine aksomal büyümeyi önlemek amacıyla alıcı siyatik siniri proksimal güdüğüne 5/0 ipek sütür materyali ile üç noktadan ligasyon uygulandı. En distal ligasyon noktası anastomoz hattından 10 mm geride idi. Greft distal ucu yine 5/0 ipek ile bağlanarak kendi üzerine kıvrılıp komşu kas içine tespit edildi. Bir ile dördüncü haftalar arasındaki periyotlarda hayvanlar derin Sagatal anestezisi ile uyutulup intrakardiyak fiksatif enjeksiyonu ile sakrifiye edildiler. İmmunohistokimyasal inceleme için fos-

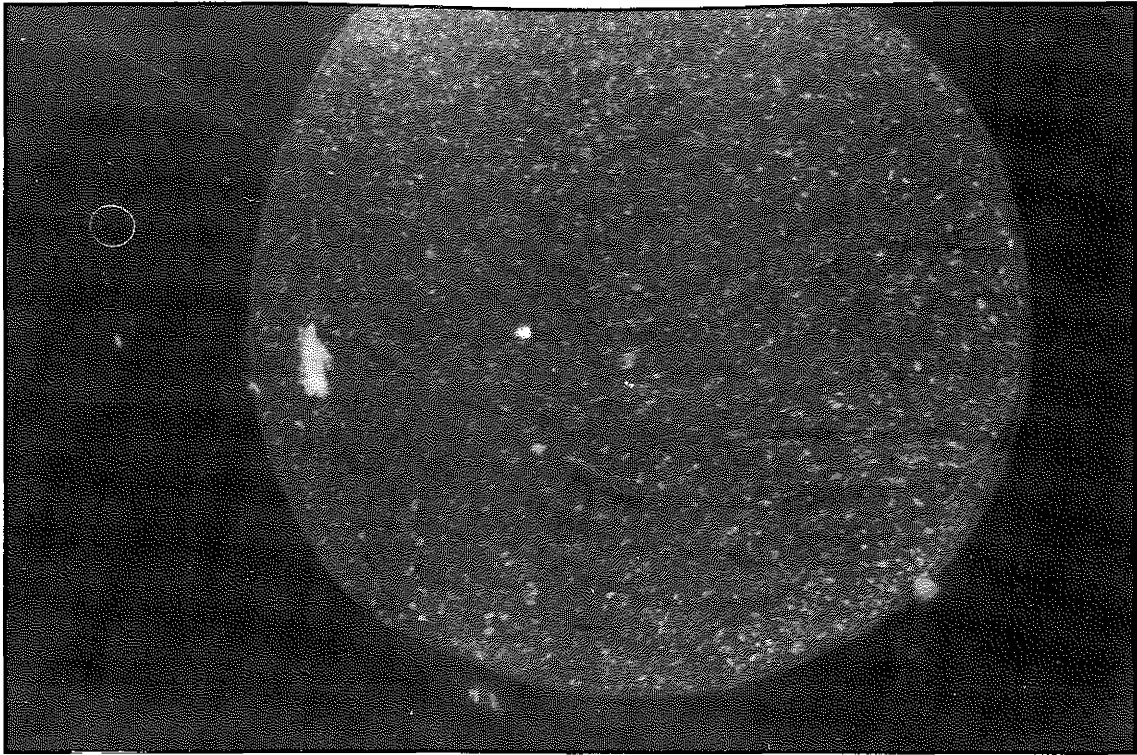
fat tamponu içinde (pH7.4) 0.1M lizin ve %2 paraformaldehit fiksatif solüsyonu kullanıldı. Greftler 3 mm lik segmentlere ayrılarak 4°C'da % 30 sukroz içeren fosfat tamponunda gece boyunca yıkandı. Daha sonra sıvı nitrojene konulan greftlerden cryostat ile 10 mm lik kesitler alındı. Kesitler lam üzerine yerleştirilerek fosfat tamponu ile yıkandı ve % 0.05 lik Triton X-100 ile muamele edilip % 10'luk normal keçi serumu ile inkübe edildi. Daha sonra gece boyunca primer antikorlar ile inkübe edildi. (S-100 proteinine karşı poliklonal tavşan antiserumu 1/750 lik dilüsyonda: S10; Serotec) (9). Kesitler tekrar yıkandı ve fluorescein isothiocyanate ile (FITC) işaretli keçi antitavşan sekonder antikorunu ile bir saat muamele edildi.

## SONUÇ

İmmunofluorescence tekniği ile Schwann hücrelerinin migrasyonu değişik zamanlarda yapılan kesitlerde incelendi. Kültür ortamındaki bütün Schwann hücreleri S-100 pozitif olarak görüldü. Bu immünoaktif hücreler füziform şekilli ve oval nükleuslu idiler (Şekil 1). Greft içinde migre olan hücrelerin çoğunun, izole hücrelerde saptanmakla birlikte, distale doğru uzanan bantlar oluşturacak şekilde dizildikleri görüldü. S-100 pozitif hücrelerin greft içine doğru penetre oldukları mesafe 8. haftada maksimuma ulaştı. Bu mesafe 11.5 cm idi (Şekil 2). Bu süreden sonra migrasyon mesafesinde herhangi bir artış gözlemlenmedi.



Şekil 1. Kültür ortamında S-100 pozitif Schwann hücreleri (10x40).



*Şekil 2. S-100 pozitif Schwann hücrelerinin freeze-dried sinir grefti içindeki migrasyonu 8. haftada 11.5 mm'ye ulaştı (10x20).*

### TARTIŞMA

Bu çalışmada, Schwann hücrelerinin aksonların bulunmadığı dondurulmuş siyatik sinir greftlerinde 11.5 mm migrasyon yapabildiklerini saptadık. Schwann hücreleri greft içinde migrasyon yaparlarken devamlı bantlar oluşturacak şekilde diziliyorlardı. Bu bulgu periferik sinir defektlerinde distal güdükten gözlenen Schwann hücresi migrasyonunun şekli ile uyumlu idi (9). Ancak kat edilen mesafe Schwann hücrelerine aksonların eşlik ettiği ortamda kat edilen mesafeden daha kısa idi (7). Bu farklılığı açıklamak için ilk akla gelen ihtimal aksonların Schwann hücresi mobilizasyonunu direkt olarak artıran madde(ler) salgılaması olabilir. Veya aksonların yüzeyi, Schwann hücrelerinin üzerinde ilerleyebilmeleri için greftin ekstrasellüler matriksinden daha uygun bir ortam oluşturabilir. Gelişen amfibiyanlarda periferik sinir gövdeleri üzerinde distale doğru ilerleyen Schwann hücrelerinin gözlemlenmiş olması bu ikinci spekülasyonu destekleyen bir bulgudur (10). Üçüncü olarak da aksonlar Schwann hücresi mitozunu stimüle ederek (11) migratuar potansiyeli olan hücre popülasyonunu artırır ve greft içinde migrasyonu artırıcı etkide bulunabilir. Bu sonuncu spekülasyonun doğruluğu Schwann hücrelerinin daima komşu hücrelerle temasını koruyarak kolonlar oluşturması şartına bağlıdır. Bu şartlar altında Schwann hücre kolonlarının greft

içine doğru ilerleyişi ortamdaki toplam Schwann hücresi sayısı ile kısıtlı olmalıdır. Daha önceki bazı araştırmalarda ortama kültür yolu ile elde edilen Schwann hücrelerinin eklenmediği yani ortamdaki Schwann hücre sayısının proksimal ve distal güdükten gelecek Schwann hücrelerinin toplamıyla kısıtlı olduğu şartlarda yapılan benzer çalışmalarda elde edilen migrasyon mesafelerinin bizim elde ettiğimizden daha kısa olması da bu saptamayı doğrular niteliktedir. Bir önemli nokta da proksimal ve distalde sinire uygulanan ligasyonla aksonal uzantıların engellenebildiği ancak birtakım diffüze olabilen kemotaktik ve trofik etkenlerin (eğer varsa) migrasyonda yönlendirici ve artırıcı etkilerinin ise devam edeceği.

**Zeki CAN**

**Ankara Tıp Fakültesi  
Plastik Cerrahi ABD**

### KAYNAKLAR

1. Anderson, P.N., Woodham, P., Turmaine, P. Peripheral nerve regeneration through optic nerve grafts. Acta, Neuropathol. 77:525-534, 1989.

## SCHWANN HÜCRESİ MİGRASYONU

2. Hall, S.M., Kent, A.B. The response of regenerating peripheral neurites to a grafted optic nerve. *J. Neurocytol.* 16:317-331, 1987.
3. Aguayo, A.J. Axon regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system. Cotman, C.W. (Ed) *Synaptic plasticity and remodelling*. Guilford press, New York, 1985. P 457-484.
4. Anderson, P.N., Turmaine, M. Peripheral nerve fibres regenerate through myenteric plexus. *Neurosci. Lett.* 76:129-131, 1987.
5. Anderson, P.N., Turmaine M. Peripheral nerve regeneration through grafts of living and freeze dried CNS tissue. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 12:389-399, 1986.
6. Hall, S.M. The effect of inhibiting Schwann cell mitosis on the reinnervation of acellular autografts in the peripheral nervous system of mouse. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 12:401-414, 1986.
7. Nadim, W., Anderson P.N., Turmaine, M. The role of Schwann cells and basal lamina tubes in the regeneration of axons through long lengths of freeze-killed nerve grafts. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 16:411-421, 1990.
8. Zalewski, A.A., Gulati, A.K. Evaluation of histocompatibility as a factor in the repair of nerve with a frozen nerve allograft. *J. Neurosurg.* 56:550-554, 1982.
9. Thomas, P.K. The cellular response to nerve injury. I. The cellular outgrowth from the distal stump of transected nerve. *J. Anat.* 100:287-303, 1966.
10. Spiedel, C.C. In-vivo studies of myelinated axons. *Int. Rev. Cytol.* 16:173-231, 1964.
11. Salzer, J.L., Bunge, B.B., Glaser, L. Studies of Schwann cell proliferation. III. Evidence for the surface localization of the neurite mitogen. *J. Cell. Biol.* 84:767-778, 1980.