



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İKİNCİL KEMİKLEŞME MERKEZİNİN OLUŞUMUNDA
ETKİLİ FAKTÖRLERİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLE İNCELENMESİ**

**Dr. Savaş AKTAŞ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülin BAYKAL**

MERSİN-2007

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İKİNCİL KEMİKLEŞME MERKEZİNİN OLUŞUMUNDA
ETKİLİ FAKTÖRLERİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLE İNCELENMESİ**

**Dr. Savaş AKTAŞ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. TÜLİN BAYKAL**

Bu tez, BAP-TF-TTB (TB) 2004-2 kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir

MERSİN-2007

TEŐEKKÖR

Asistanlık eğitimim süresince emeği geçen ve büyük katkıları olan başta Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı, tez danışmanım Prof Dr. Tölin BAYKAL'a, tezimin tüm aşamalarında katkılarından, maddi ve manevi büyük desteklerinden dolayı Doç. Dr. Banu Coőkun Yılmaz'a, Yrd. Doç. Dr. Nejat Yılmaz'a ve Yrd. Doç. Dr. Ebru Ballı'ya, tez konumun belirlenmesinde katkılarından dolayı Doç. Dr. Cengiz Yılmaz'a, tezimin istatistiksel analiz kısmında katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Bahar Taődelen ve Mehmet Ali Sungur'a, manevi desteklerinden dolayı çalışma arkadaşlarıma içtenlikle teőekkör ederim.

Dr. Savaş AKTAş

Mersin-2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ	8
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. İskelet Sistemi Gelişimi.....	10
2.2. İskelet Sistemi Gelişiminin Moleküler Düzeyi.....	11
2.3. Kemikleşme.....	12
2.3.1. İntramembranöz Kemikleşme.....	12
2.3.2. Endokondral Kemikleşme.....	14
2.4. İkincil Kemikleşme Merkezinin Oluşumu.....	17
2.5. Uzun Kemiklerde Boyuna Büyüme.....	20
2.6. Kemik Büyümesinin Düzenlenmesi.....	20
2.7. Kemik Büyüme Faktörleri.....	21
2.7.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri.....	22
2.7.2. Değişirici Büyüme Faktörü- β	25
2.7.3. Fibroblast Büyüme Faktörleri.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
3.1. Işık Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi.....	30
3.1.1. Doku Takip İşlemi.....	31
3.1.2. İmmunohistokimya Protokolü.....	32
3.2. İstatistiksel Analizler.....	33
4. BULGULAR	34
4.1. Morfolojik Bulgular.....	34
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	35
4.2.1. IGF-1R β	35
4.2.2. TGF- β R2.....	36
4.2.3. FGF-2.....	36
4.3. İstatistiksel Analiz.....	37

4.3.1.	IGF-1R β	37
4.3.2.	TGF- β R2.....	37
4.3.3.	IGF-1R β ve TGF- β R2.....	38
4.3.4.	FGF-2.....	38
5.	TARTIŞMA.....	67
5.1.	IGF-1R β	67
5.2.	TGF- β R2.....	70
5.3.	IGF-1R β ve TGF- β R.....	75
5.4.	FGF-2.....	77
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
7.	KAYNAKLAR	84
	SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	96
	ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	98
	TABLolar DİZİNİ.....	101

ÖZET

İkincil kemikleşme merkezi, postnatal dönemde endokondral kemikleşme mekanizması ile oluşur. Bu süreçte farklı sistemik hormonların ve lokal büyüme faktörlerinin etkili olduğu bilinmekle birlikte ikincil kemikleşme merkezi oluşumunda dönemsel olarak bu faktörlerin etkinliği gösterilmemiştir. Bu çalışmada, ikincil kemikleşme merkezinin oluşumunda insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptör beta (Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Beta; IGF-1R β), değiştirici büyüme faktörü-beta reseptör 2 (Transforming Growth Factor- β Receptor 2; TGF- β R2) ve bazik fibroblast büyüme faktörünün (Basic Fibroblast Growth Factor; bFGF veya FGF-2) dönemsel etkinliğini immunohistokimyasal yöntemle göstermek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, 70 adet Wistar albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, 1 (1. grup), 4 (2. grup), 7 (3. grup), 10 (4. grup), 21 (5. grup), 50 (6. grup) ve 100 (7. grup) günlük olacak şekilde 7 gruba (n=10) ayrıldı. Sıçanların femur distal uçları alındı ve bu dokular takip edilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan elde edilen kesitlerde toluidin mavisi ile histokimyasal, IGF-1R β , TGF- β R2 ve FGF-2 antikoları ile de immünohistokimyasal inceleme yapıldı.

IGF-1R β , TGF- β R2, FGF-2 antikoları ile 1. ve 2. grupta ikincil kemikleşme merkezinin oluşacağı bölgedeki kondrositlerin çoğunda işaretlenme saptanmazken, 3. grupta işaretlenmiş kondrosit sayısında belirgin artış vardı. Ayrıca IGF-1R β ekspresyonu, TGF- β R2 ekspresyonuna göre daha belirgindi. 4. grupta her üç antikorla işaretlenme 3. gruptakine benzerdi. Ancak bu dönemde TGF- β R2 ekspresyonu yapan kondrosit sayısı diğer gruplardan fazlaydı. 5. grupta her üç antikorla işaretlenen kondrositler, genişleyen kemikleşme merkezi çevresinde yerleşmişlerdi. Ayrıca yeni oluşan kemik spiküllerinde TGF- β R2 işaretlenmesi gözlemlendi. 6. ve 7. grupta osteoblastlarda, osteositlerde her üç antikorla işaretlenme varken, trabeküler kemik matrikste TGF- β R2 işaretlenmesi görüldü.

Sonuç olarak, ikincil kemikleşme merkezinin oluşumu için gerekli olan endokondral kemikleşme sinyallerinin başlamasında, matür ve fonksiyonel kemik dokusunun oluşumunda dönemsel olarak eksprese edilen IGF-1R β , TGF- β R2, FGF-2 önemli rol oynamaktadır.

Anahtar Kelimeler: İkincil kemikleşme merkezi, IGF-1R β , TGF- β R2, FGF-2.

ABSTRACT

The Immunohistochemical Investigation of the Effective Factors in The Formation of Secondary Ossification Center

Secondary ossification center, is formed by the endochondral ossification mechanism in the postnatal period. Although it is known that the different systemic hormones and local growth factors are effective in this period, the efficiency of these factors in the formation of secondary ossification center hasn't been examined at different terms. In this study, it is aimed to show the periodical effectiveness of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Beta (IGF-1R β), Transforming Growth Factor- β Receptor 2 (TGF- β R2) and the Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF or FGF-2) in the formation of secondary ossification center, with the immunohistochemical method.

In our study, 70 Wistar albino rats have been used. Animals, have been divided into 7 groups (n=10); every group was consisted of 1 (1. group), 4 (2. group), 7 (3. group), 10 (4. group), 21 (5. group), 50 (6. group) and 100 days (7. group) old rats respectively. The femur distal ends have been removed and processed and then embedded in paraffin. Sections, from these paraffin blocks, stained by toluidine blue for histochemical examination and labelled. with IGF-1R β , TGF- β R2 ve FGF-2 antibodies for immunohistochemical examination.

IGF-1R β , TGF- β R2, FGF-2 antibody expressions were not observed in most of the chondrocytes in the future secondary ossification center area in 1st and 2nd groups; while, prominent increase of labelled chondrocytes was determined in 3rd group. Furthermore, ekspresion of IGF-1R β has been much more evident than the ekspresion of TGF- β R2. The labelling with each three antibodies in the 4th. group was similar with the labelling of the 3rd. group. However, TGF- β R2 positive chondrocytes were much greater than the other groups in this period. Labelled chondrocytes with each three antibodies were localised around the growing ossification center in the 5th group. Moreover, newly formed bone spicules were labelled with the TGF- β R2 antibody. While osteoblasts and osteocytes were labelled with each three antibodies, only TGF- β R2 were positively labelled in trabecular bone matrix in the 6th and 7th groups.

Consequently, IGF-1R β , TGF- β R2 and FGF-2, which are expressed periodically, play a crucial role in the beginning of endochondral ossification signals that are required for the development of secondary ossification center and in the formation of mature and functional bone tissue.

Key words: Secondary ossification center, IGF-1R β , TGF- β R2, FGF-2.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Embriyonel gelişim sürecinde kemikleşme iki şekilde görülür. Kemiğin oluşacağı bölgede yer alan mezenşimal hücrelerin, birtakım faktörlerin etkisiyle doğrudan kemik öncül hücrelerine (osteoprogenitör hücre) ve osteoblastlara farklılaşması yoluyla meydana gelen kemikleşmeye, intramembranöz kemikleşme denir. Daha çok uzun kemiklerde izlenen ve kemiğin meydana geleceği bölgede önce bir hiyalin kıkırdak modelin geliştiği ve ondan sonra kemik dokunun oluştuğu kemikleşme tipi ise, endokondral kemikleşme adını alır. Doğumda uzun kemiklerin diyafizleri büyük oranda kemikleşmiştir. Hala kıkırdak yapıda olan epifizyal bölgede ise doğumdan sonra ikincil kemikleşme merkezleri oluşur¹⁻⁴.

Doğumdan sonra epifizde kondrositler bölünmelerini durdururlar ve Runt ailesinin transkripsiyon faktörlerinden Runx2 ve daha az oranda Runx3 etkisi ile genişleyerek hipertrofik kondrositlere farklılaşırlar^{5,6}. İkincil kemikleşmede ilk evre, kondroklastlar tarafından epifiz yüzeyinden merkezine doğru kanalların oluşması ve hipertrofik kondrositlerden sentezlenen vasküler endotelial büyüme faktörü (Vasküler Endotelial Growth Factor; VEGF) etkisiyle perikondriumdan angiogenezisin başlamasıdır^{7,8}. Epifiz merkezine ilerleyen kan damarları, ikincil kemikleşmenin başlayacağı bölgelere osteoprogenitör hücreleri ve büyüme faktörlerini getirir^{8,9}. Osteoprogenitör hücreler osteoblastları oluşturur. Osteoblastlar, kalsifiye kıkırdağın düzensiz yüzeyi üzerinde toplanarak kemik esas maddesini (kemik matriks) sentezlerler. Ayrıca bu kemikleşme sırasında gerçekleşen mitoz ve apoptozis epifizin biçimlenmesinde önemli rol oynar²⁻⁴.

Ekstremitelerde ortaya çıkan endokondral kemikleşmenin düzenlenmesinde çok sayıda büyüme faktörü işlev görür. Bu faktörler ilk olarak 1938'de Levander tarafından kemik yapan substanslar olarak tanımlanmıştır. Levander, kemik ve kallusun asit alkol ekstraktını tavşanlara intramüsküler olarak injekte ettiğinde heterotopik kıkırdak ve kemik oluşumu gözlemiş ve bazı özelleşmiş kemik yapan substansların nonspesifik mezenşimal dokuyu aktive etmesi ile kemik oluşumunun meydana geldiği sonucuna varmıştır. Bu faktörler

günümüz rekombinan DNA teknolojisiyle tanımlanabilmiş ve kemik büyüme faktörleri adını almıştır¹⁰.

Kıkırdak ve kemik doku matriksinde bulunan, otokrin ve parakrin etkili bu faktörler arasında kemik morfogenetik protein (Bone Morphogenetic Protein; BMP), değiştirici büyüme faktörü-beta (Transforming Growth Factor- β ; TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü 1, 2 (İnsulin-Like Growth Factor-1, 2; IGF-1, IGF-2), asidik fibroblast büyüme faktörü (Asidic Fibroblast Growth Factor; aFGF veya FGF-1), bazik fibroblast büyüme faktörü (Basic Fibroblast Growth Factor; bFGF veya FGF-2), trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet-Derived Growth Factor; PDGF) sayılabilir¹⁰⁻¹². Bu faktörler, işlevlerini hücrelerde bulunan reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirirler. Bu reseptörlerin büyük bir çoğunluğu kendi ligandları ile bağlandığında hücre içinde tirozin kinaz aktivasyonu yaparak büyüme faktörünün hücrenel etkilerini ortaya çıkarır.

Hücrenel aktivitenin bölgesel düzenleyicisi olarak işlev gören büyüme faktörlerinin kondrosit çoğalması, olgunlaşması, makromolekül sentezi, hücre içi kalsiyum dengesi ve matriks mineralizasyonunu etkilediği bilinmektedir. Hücre çoğalması ve biyosentetik aktiviteyi etkileyen bu faktörlerin bölgesel osteoblast ve osteoklastlar üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir^{13,14}.

IGF-1, TGF- β_1 ve FGF-2 gibi faktörlerin endokondral kemikleşmede etkili olduğu bilinmekle birlikte bu faktörlerin ve reseptörlerinin, kemik gelişim sürecinin hangi evrelerinde daha etkin olduklarını gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Çalışmamızda, gelişimin farklı evrelerinde alınacak olan sıçan femurlarında, ikincil kemikleşme merkezlerinin oluştuğu bölgelerde IGF-1R β , TGF- β R2, FGF-2 ekspresyonlarının gösterilmesi ve elde edilecek sonuçların ışığında bu moleküllerin hücre farklılaşması ve ikincil kemikleşme merkezi üzerindeki olası rollerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

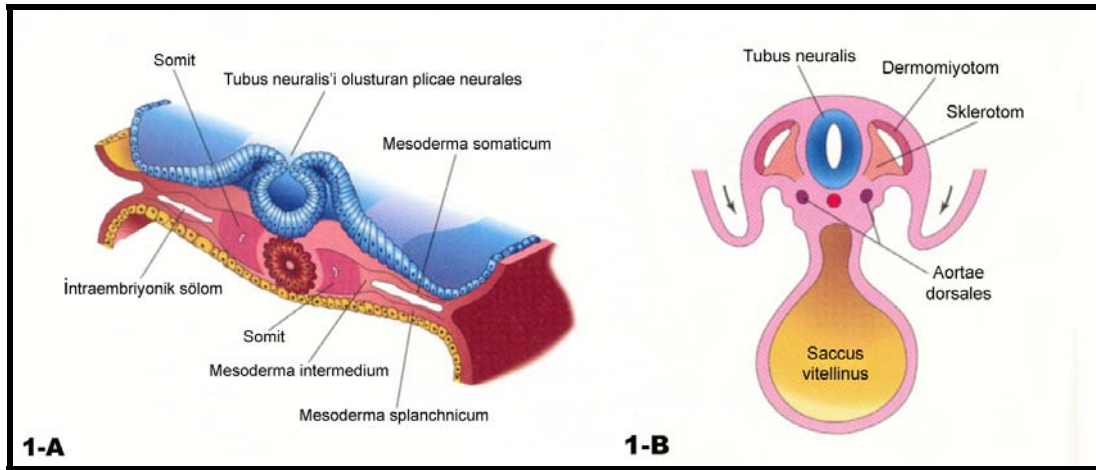
Planlanan çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde; kemik gelişiminin ve mezenşimal hücre farklılaşmasının bu faktörlerden ne zaman ve nasıl etkilendiğinin ortaya konabileceği ve böylece endokondral kemikleşmenin şu ana kadar bilinmeyen bazı yönlerinin de açıklığa kavuşturulabileceği umulmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskelet Sistemi Gelişimi

İskelet sistemi nöral krest, paraaksiyal mezoderm ve lateral mezoderm somatik tabakasından gelişir¹⁵. Nöral krest hücreleri kraniofasyal iskeleti oluştururken, paraaksiyal mezoderm hücreleri aksiyal iskeleti, lateral mezoderm hücreleri ise kol ve bacakları oluşturur¹⁶.

Notokord ve nöral tüp oluşurken, bu yapıların dış yanında bulunan intraembriyonik mezoderm, longitudinal iki paraaksiyal mezoderm sütununu oluşturmak üzere kalınlaşır. 3. haftanın sonuna doğru bu sütunlar somit adı verilen mezodermal doku parçalarına ayrılır (Şekil 1-A). Somitler dışarıdan embriyonun dorsolateral yüzü boyunca dizilmiş çıkıntılar olarak görülürler. Her somitte sklerotom ve dermomyotom ismi verilen iki parça oluşur (Şekil 1-B). Sklerotom, ventromedialde bulunur ve vertabraları, kostaları oluşturur. Dermomyotomun miyotomi bölgesindeki hücreler miyoblastları, dermatom bölgesindeki hücreler derinin dermis tabakasını oluşturur^{15,17}.



Şekil 1. Somitlerin oluşumu ve farklanması. A, yaklaşık 22 günlük bir embriyoda erken somitlerin görüldüğü transvers kesit. B, 24 günlük embriyoda somitin dermomyotom bölgesinden dermatom ve miyotomun oluşması¹⁷.

Embriyonik gelişmenin 4. haftasında ventrolateral vücut duvarında kabartılar şeklinde ekstremiter tomurcukları belirir. Üst ekstremiter tomurcukları

26. veya 27. günde belirginleşirken, alt ekstremite tomurcukları 28. veya 29. günde belirginleşirler. Her bir ekstremite tomurcuğu ektoderm ile çevrili bir mezenşim kitlesi içerir, daha sonra ektoderm tabakası kalınlaşarak apikal ektodermal kabartıyı (Apical Ectodermal Ridge; AER) oluşturur. AER ile mezenşimal hücreler arasındaki etkileşim ekstremite gelişimi için çok önemlidir. AER, ekstremitelerin gelişmesini ve büyümesini başlatan ekstremite mezenşiminde indüksiyon etkisi gösterir. AER'ye komşu olan mezenşim, hızlı çoğalan farklanmamış hücre grupları halinde kalırken, AER'ye uzak bölgelerdeki mezenşim kıkırdak kemik modellere ve kan damarlarına farklanmaya devam eder. 6 haftalık bir embriyoda ekstremite tomurcuklarının uç bölümleri yassılaşılarak el ayak plaklarını oluştururlar^{15,17,18}.

Üst ve alt ekstremitelerin gelişim süreçleri, morfogenezde alt ekstremitelerin üst ekstremiteleri yaklaşık 1-2 günlük bir gecikmeyle izlemeleri dışında çok benzer^{15,17,18}.

2.2. İskelet Sistemi Gelişiminin Moleküler Düzeyi

İskelet morfogenezinde ilk olay, mezenşimal hücrelerin, gelişimin olacağı bölgelere göçü ve bu bölgelerde yoğunlaşmalarıdır¹⁶. Hücrelerin uygun bölgelere yönelmesinden düzenleyici genler sorumlu tutulmaktadır. Bu genler sıklıkla HOX (Homeobox), PAX (Paired Box) genleri gibi transkripsiyon faktörlerini ve hücre-hücre iletişimde, hücre içi uyarımda rol alan proteinleri kodlar^{15,16}.

HOX genleri, segmentasyon ve vücut eksenlerinin oluşumunu düzenleyen bir seri genin transkripsiyon faktörlerini kodlarlar. İnsanlarda bu genler HOXA, HOXB, HOXC, HOXD olarak 4 kopya halinde korunur ve Drosophila'da olduğu gibi dizilir, eksprese olur. Bu genlerin sentezlenme biçimi, her üç germ tabakasına ait türlerin kraniyokaudal yönde biçimlenmesine neden olur^{13,15,19}.

PAX genleri nöral tüp ve sklerotomda sentezlenir. PAX1'den PAX9'a kadar 9 farklı PAX geni tanımlanmıştır. Bunlar transkripsiyon faktörleri gibi davranış gösterip DNA'nın özel bölgelerine bağlanırlar. Ayrıca bu genlerin somitlerin ve santral sinir sisteminin farklı bölgelerinin özelleşmesi üzerinde rolü olduğu bulunmuştur^{19,20}.

İskelet gelişiminde sırasıyla şu aşamalar gerçekleşir; epitelyal mezenşimal etkileşimler, mezenşimal hücre yoğunlaşması ve hücre farklanması²². Bu aşamalardan en önemlisi yaklaşık olarak dördüncü haftada meydana gelen mezenşimal hücrelerin yoğunlaşmasıdır^{15,16,21,22}. İskelet elemanlarının oluşmaya başlaması hem kondrojenik hem de osteojenik yoğunlaşmaya bağlıdır. Her iki yoğunlaşma tipi yüksek hücre yoğunluğu ve farklı molekülleri kodlayan genlere sahiptir. Genellikle bu genler reseptörler, hücre adhezyon proteinleri, matriks proteinleri ve hücre adhezyonunu başlatan, yoğunlaşmanın büyüklüğünü kontrol eden transkripsiyon faktörlerini kodlar^{22,23}.

Kondrojenik yoğunlaşmadan, gelecekte iskeleti oluşturacak kıkırdak şablona geçiş proksimalden distale doğru yayılırken, anterior bölgede posterior bölgeye göre daha erken yer alır. Bu geçişte ileride gelişecek kemik ve eklem biçimini oluşturacak yapının bifurkasyonu ve segmentasyonu gibi değişiklikler eşlik eder¹⁶.

2.3. Kemikleşme

Embriyonik gelişim süresince kemikleşme iki farklı yolla meydana gelir. Biri mezenşimin doğrudan kemik dokuya dönüştüğü “intramembranöz kemikleşme” dir. Diğeri mezenşim dokusunun kıkırdak taslağa dönüşmesi ve bu kıkırdak dokunun yerini kemik dokuya bırakması ile meydana gelen “endokondral kemikleşme” dir¹⁻³. Her iki yolla oluşan kemik matriksi birikimi, temel olarak benzer özelliklere sahiptir, fakat endokondral kemikleşmede kıkırdak matriks, kemik matriks birikiminden önce kaldırılmalıdır. İlk ortaya çıkan kemik dokusu, trabeküler yapıya sahip birincil veya olgunlaşmamış kemik dokusudur. Buna “birincil trabeküler kemik” (primer spongiyöz kemik) denir. Bu tip kemik dokusunda kollajen lifler düzensiz dizilimli olduğundan lameller belirgin değildir. Birincil trabeküler kemik dokusu geçicidir ve daha sonra yerini “ikincil kemik” (lamelli kemik) dokusuna bırakır. Bu yapı sonradan yeniden şekillenme sırasında kompakt kemik haline dönüşür^{3,4}.

2.3.1. İntramembranöz Kemikleşme

İntmembranöz kemikleşme yaklaşık olarak gebeliğin 8.haftasında başlar¹. Mezenşim hücreleri kemiğin oluşacağı bölgelerde bir araya gelerek gruplar yaparlar. Mezenşim dokusu içinde hücrelerin yoğunlaşarak oluşturduğu

alanlar membrana benzetildiği için bu tür kemikleşmeye İntmembranöz kemikleşme denir^{1,3}. İntramembranöz kemik dokusuna dönüşecek mezenşim bölgesinde kemikleşmenin ilk belirtisi, dokunun kan damarlarından zenginleşmesidir. Böylece mezenşim dokusu içinde bol miktarda kapillerler belirir^{1,24,25}. Mezenşimal hücreler kapillerler çevresinde yoğunlaşarak, sitoplazmik devamlılık göstermeksizin birbirleriyle uzantıları yardımıyla ilişki kurarlar^{4,25}. İğ şeklindeki bu hücreler genişler, yuvarlak bir şekil alır ve sitoplazmasındaki düz endoplazma retikulumu miktarı artarak osteoprogenitör hücrelere dönüşür^{4,24}. Daha sonra osteoprogenitör hücreler kübik veya prizmatik bir şekil alır, sitoplazmalarında yapısal değişikliklerin meydana gelmesi sonucunda bazofilik görünüm kazanarak osteoblastlara farklanır. Osteoblastlar kemik matriksini sentezleyip ve bu yapının kalsifikasyonunu sağlarlar^{1,4}.

İntramembranöz kemik oluşumunun erken döneminde kan kapillerleri çevresinde bulunan mezenşimal hücrelerin farklanarak 2-3 tabakalı durağan osteoblast kümesini yapması ve osteoblastların bazı bölgelerde osteositlere dönüşerek, kemik hücreler arası madde birikimi sonucunda birincil kemik trabekülleri oluşturmaya "durağan (statik) kemik oluşumu" da denmektedir²⁶.

Kemikleşmenin başladığı bu bölgelere birincil kemikleşme merkezi denir. Osteoblastlar, oluşan kemik spikülleri ve trabeküllerin yüzeylerinde bir sıra halinde dizilirler Birincil kemik dokusunda bulunan kemik spikülleri ve trabeküllerdeki kollajen lifler gelişigüzel dağılmış olarak görülür. Kemik oluşumunun başlangıç safhasından sonra kemik yüzeyinde bulunan osteoblastlar hücreler arası madde ve kollajen liflerinin üretimini artırarak osteositlere dönüşüp lakünelara dahil edilirler. Böylece kemik kalınlığını artırmış olur. Yüzeydeki osteoblastların miktarı, bu hücrelerin mitoz ile bölünmeleri ve çevre bağ dokusunda bulunan mezenşimal hücrelerin farklanması ile sağlanır^{1,2,4}. Durağan kemik oluşumundan sonra birincil kemik trabekülleri yüzeyi boyunca hareketli osteoblastların tek tabaka olarak dizilmesi ve birincil kemik trabeküllerinin kalınlığını artırması "dinamik (aktif) kemik oluşumu" olarak bilinmektedir²⁶.

Kan damarları çevresinde oluşmaya başlayan kemik trabekülleri giderek büyür ve birbirleriyle birleşerek ağ şeklindeki spongiyöz kemik dokusunu yapar. Bu yapı çevreye doğru ışınşal tarzda yayılırken, kemik trabekülleri arasındaki

boşlukları dolduran farklanmamış mezenşim hücreleri kemik iliği hücrelerini yapar. Spongyöz kemik yeterli büyüklüğe ulaştınca, içinde kemikleşmenin olduğu mezenşim membranın periferik kısmı spongyöz kemiği dıştan sararak periosteuma dönüşür. Periosteumdaki osteoprogenitör hücreler spongyöz kemik etrafında dizilir ve osteoblastları yaparlar. Bunlar hücreler arası maddeyi salgılayıp osteositlere dönüştükçe, yerleri periosteumun bağ dokusu hücrelerinden farklı olan yenileri ile doldurulur, sonunda spongyöz kemik kitlesi etrafında, periosteum tarafından tabaka tabaka birbiri üzerine yığılmış kompakt kemik dokusu yapılmış olur²⁵.

Intramembranöz kemikleşme genel olarak kısa kemiklerin gelişmesinde ve uzun kemiklerin kalınlaşmasında rol alır. Kafatası kemiklerinden frontal ve pariyetal kemiklerin tamamı, oksipital ve temporal kemiklerinin bir kısmı, yüz kemiklerinden ise mandibula ve maksillanın bir kısmı intramembranöz kemikleşme ile gelişir^{3,4,24}.

2.3.2. Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşme gebeliğin yaklaşık olarak 12.haftasında başlar¹. Fetal gelişim süresince ve büyüme duruncaya kadar puberte öncesi dönemde kemiğin kalınlaşması ve uzaması endokondral kemikleşme ile sağlanır^{1,24}. Kemiğin oluşacağı bölgede ilk olarak mezenşimal hücrelerin yoğunlaşması meydana gelir. Bu görünüm zamanı kemikten kemiğe değişmekle birlikte yaklaşık olarak gebeliğin 40. gününde ortaya çıkar²⁷. Mezenşimal hücreler kondroblastlara farklanır, oluşan kondroblastlar yetişkin kemiğin kabaca şeklini belirleyen hyalin kıkırdak modeli oluşturur^{1,2,24,27}. Kemiğe öncülük eden kıkırdak model embriyoda kemik oluşmasından önce farklı olan yumuşak doku ve kaslara destek, tutunma görevi görür²⁵.

Dıştan farklanmamış mezenşim ile çevrelenmiş hyalin kıkırdak model mezenşimal hücrelerin kondroblastlara farklılaşması sonucunda kalınlığını appozisyonel büyüme ile sağlar. Hyalin kıkırdak modelin uzunlamasına büyümesi ise interstisyel büyüme ile olur. Bu tip büyüme kondrositlerin mitoz bölünmeyle çoğalması ve sıklıkla tip 2 kollajen olmak üzere tip 9, tip 10, tip 11, tip 13 kollajen ve proteoglikanlardan oluşan hücre dışı esas maddenin (ekstrasellüler matriks) üretilmesi ile sağlanır^{1,27}.

Kıkırdak şablon yapılandığında, kıkırdak şablonun dış kısmındaki kondrositler nonhipertrofik kondrosit grubunu oluştururken iç kısmındaki kondrositler daha sonra hipertrofik kondrositlere farklanır. Nonhipertrofik kondrositler, dinlenen ve çoğalan kondrositleri içerir. Bu hücreler kıkırdak yapılandıran hücreler olarak kabul edilir, çünkü kıkırdak ekstrasellüler matriksi, agreganı, tip 2 kollajeni sentezlerler ve hipertrofik kondrosit farklanma oranını kontrol ederler⁵.

Nonhipertrofik kondrositler daha sonra bölünmelerini durdururlar ve ürettikleri ekstrasellüler matriks değişir, tamamen genişleyerek hipertrofik kondrositlere farklanır⁵. Kondrositlerin bölünmelerini durdurup hipertrofik şekle gelmesinde, Runt ailesinin transkripsiyon faktörlerinden Runx2 ve daha az oranda Runx3 önemli rol oynar⁶. Hipertrofik kondrositler iki alt hücre grubunu kapsar. İlki prehipertrofik kondrositler olup, bu hücreler çoğalan kondrositlerin altında bulunur ve tamamen hipertrofiye kondrositlere farklanır⁵. Kondrositlerde görülen hipertrofi nedeni, sitoplazmalarında glikojen ve lipit birikiminin artması ile çekirdeğin şişmesidir²⁸. Bu hücrelerin sitoplazmalarında ribonükleik asit ve kalsifikasyonda rol alan alkalın fosfataz enzimi de artmış durumdadır²⁵. Hücrelerdeki hipertrofi sonucunda lakünaları da hipertrofiye uğrar²⁸. Hipertrofiye kondrositler az miktarda tip 2 kollajen eksprese ederken, yoğun olarak tip 10 kollajeni eksprese etmeye başlarlar^{5,27}. Hipertrofiye kondrositlerin zamanla sitoplazmalarının vakuolleştiği, çekirdeklerinin piknotikleştiği ve çevrelerindeki kıkırdak esas maddenin (kıkırdak matriksi) ise giderek azalıp düzensiz şekilli içciklere dönüştüğü görülür^{3,28}. Hipertrofik kondrositlerdeki alkalın fosfataz enzimi hücre dışına çıkarak kıkırdak matrikse kalsiyum fosfat kristallerinin çökmesini sağlar ve böylece kalsifikasyon süreci başlamış olur. Hipertrofiye kondrositlerde geriletici değişikliklerin başlaması ve kıkırdak matriksin kalsifiye olması ile besin maddelerinin diffüzyonunu azaltarak kondrositlerin ölümü meydana gelir^{1,3}.

Uzun kemikler, her iki ucu genişlemiş (epifiz) silindirik bir şafttan (diafiz) oluşmuş hyalin kıkırdak modellerden meydana gelir. Kondrositlerde meydana gelen tüm bu değişikliklerle birlikte, kıkırdak taslağı çevreleyen perikondriumun iç kısmındaki osteoprogenitör hücreler, diafiz orta bölgesinde osteoblastlara farklanır^{1,3,24}. Osteoblastlar bu bölgede intramembranöz kemikleşme yoluyla 'kemik halkası' veya 'kemik yaka' adı verilen silindirik bir kemik tabakasını

meydana getirir. Kemik yaka diafiz boyunca her iki yöne doğru uzamaya ve kalınlaşmaya başlayarak diafizin kalınlığını artırır. Yeni oluşan kemik dokuyu sardığı için perikondriyuma da periosteum denir²⁴. Yeni oluşan kemik yaka besin maddelerinin difüzyonuna engel olur, bu bölgedeki hipertrofik kondrositler dejenere oldukça kıkırdak matriksinin devamlılığını sağlama yetenekleri ortadan kalkar ve kalsiyum fosfat çökmesi ile kıkırdak matriksi kalsifiye olur^{3,4}.

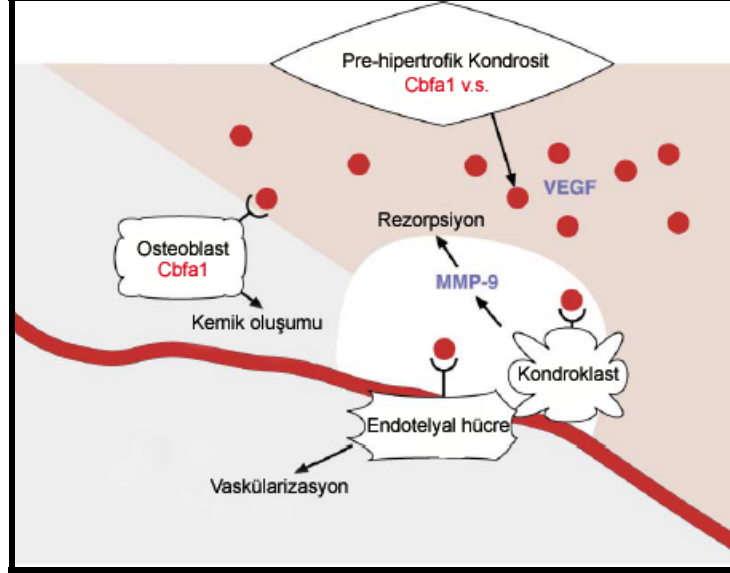
Kemik yaka, kıkırdak taslakta sonradan meydana gelecek damar invazyonu için başlama bölgesi olur. Kıkırdak taslağın merkezindeki hipertrofik kondrositlerden damarlanmayı uyaran VEGF ve damarlanmayı kısmen düzenleyen, kondrosit yaşamı için gerekli olan hipoksiyi indükleyen faktör-1 alfa (Hipoxy-Inducible Factor 1 α ; HIF1 α) gibi faktörlerin sentezlenmesi periosteumdan angiogenezisi başlatır^{5,7,29}. Kondrositlerin hipertrofiye olmasını sağlayan transkripsiyon faktörlerinden Runx2'nin, hipertrofik kondrositlerden VEGF sentezini düzenlediği saptanmıştır³⁰.

Periosteumdan kaynaklanan osteojenik tomurcuğun kan damarları, osteoklastlar tarafından kemik yakada açılan deliklerden geçerek, hipertrofik kondrositleri çevreleyen kalsifiye kıkırdak matriks içine yayılır¹⁸. Proteaz enzimlerinden matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) salınması ile kıkırdak matriks parçalanır. Hipertrofik kondrositlerden sentezlenen VEGF ortama salınır ve kondroblast, damar endotel hücreleri, osteoblastlar üzerindeki reseptörlerine bağlanarak damar invazyonunu kolaylaştırır⁵ (Şekil 2). Kondroblastlar MMP-9 sentezleyen hücreler olup kemik iliği kökenlidir. Bu hücrelerin fonksiyonu kıkırdağı parçalamak olduğundan bu isimlendirme yapılmıştır. Kıkırdak-kemik bileşkesinde olan kondroblastlar osteoklastlardan farklı olarak, daha az tartrata direçli asit fosfataz enzimi (Tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) sentezlerken, çok daha az MMP-9 sentezlerler³¹.

Kan damarları, ileride oluşacak kemiğin merkezine doğru ilerler ve bu bölgeye osteoprogenitör hücrelerin, kan öncül hücrelerinin getirilmesini sağlar^{2,3}. Osteoprogenitör hücreler osteoblastları oluşturur. Osteoblastlar, kalsifiye kıkırdağın düzensiz yüzeyi üzerinde toplanarak kemik matriksini sentezlerler. Böylece birincil kemik sentezi kalsifiye olmuş kıkırdak artıkları üzerinde başlar^{2,3,4,24}.

Diafiz merkezindeki bu kemik birikimine 'birincil kemikleşme merkezi' denir. Bu olay kemiğin her iki ucuna doğru genişler. Kıkırdağın kalsifikasyonu,

buna eşlik eden hücresel değişikliklerle birlikte birincil kemik iliği boşluklarının oluşumu ile sonuçlanır. Bunlar daha sonra birleşerek diafiz içerisinde ikincil kemik iliği boşluğu olarak adlandırılan tek bir boşluğu meydana getirirler⁴.



Şekil 2. Vasküler invazyon oluşum süreci. Prehipertrofik kondrositlerden Cbfa1 (Runx2) ve diğer faktörlerin salınımı, hipertrofik kondrositlerde VEGF salınımını uyarır. VEGF matrikste tutulur. Vasküler invazyon süresince kondroklastlar tarafından sekrete edilen MMP-9, matriksten VEGF salınmasına neden olur. VEGF endotelial hücrelerdeki reseptörlerine bağlanabilir ve osteoblastlarda, muhtemelen kondroklastlarda vasküler invazyonu başlatır⁵.

2.4. İkincil Kemikleşme Merkezinin Oluşumu

Endokondral gelişimin bir diğer parçası, birçok kemikte bulunan ikincil kemikleşme merkezleri oluşumudur³². İkincil kemikleşme merkezi, kemik uçlarında epifizlerin düzgün sferikal şekilli olmalarını sağlar. Epifizyal şekil ve büyüklük, kemikler arasındaki bağlantıda önemli rol alıp, fonksiyonel iskelet oluşumu için gereklidir⁸. Tamamlanma süreleri farklı genişliktedir ve insanlarda uzun kemiklerde doğumdan sonra başlar. Epifizlerin hyalin kıkırdağı içinde, diafizlerin birincil kemikleşme merkezlerinin oluşması sırasında görülen aynı olaylar zinciri sonucunda önce üst epifizde, sonra alt epifizde ikincil kemikleşme merkezi meydana gelir. Ancak ikincil kemikleşme merkezinin oluşması

sırasında, birincil kemikleşme merkezinden farklı olarak kemik halkası meydana gelmez²⁵.

İkincil kemikleşme merkezinin oluşumunda, epifizin periferinden merkezine doğru damarların ilerlediği gözlenir. Merkezden periferine doğru, kalsifiye kıkırdak doku ortamdandır kaldırılır. Daha sonra kıkırdak artıkları üzerinde osteoblastlar tarafından kemik dokusunun depolanması ile bu bölge ışınal olarak genişler. Costales ve ark.³³ 7 günlük sıçan epifizlerinde, epifiz periferinden merkezine doğru ilerleyen damarlar çevresinde çoğalan kondrositlerin arttığını saptamışlardır. Bu hücrelerin, epifizyal kıkırdakta damarların değişik yönlere ilerlemesi ve kemik dokuyu oluşturan hücrelerin yönlendirilmesi için gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

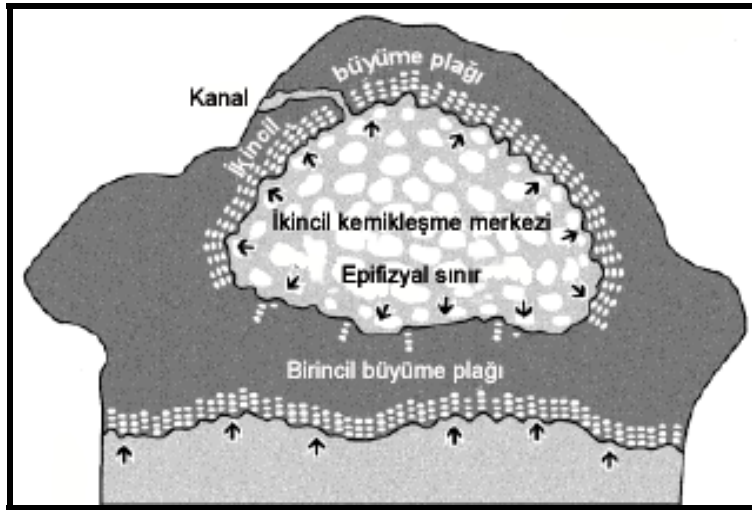
Epifizde ikincil kemikleşme bölgesi genişlerken epifizin periferinde kalan kıkırdak bölge ikincil büyüme plağı ismini alır (Şekil 3). İkincil büyüme plağında bulunan kondrositler tabakalar (zonlar) şeklinde şöyle sıralanır⁸:

- Dinlenme veya yedek zon: Bu zon yoğun matriks içerisinde seyrek dağılmış tek veya çift yuvarlak hücrelerle karakterizedir. Hücreler iyi gelişmiş endoplazma retikulumları nedeniyle aktif protein sentezi yaparlar. İstirahat zonunda hücreler çoğalma seyrek görülür, bu alanda matriksin tip 2 kollajen içeriği çok yüksektir. Ayrıca matrikste mineralizasyon işlemine katılmayan çok sayıda matriks vezikülü bulunur. Matrikste proteoglikanların toplu şekilde bulunması matriksin mineralizasyonunu engeller^{2,13}.
- Çoğalma zonu: Kondrositler hızla çoğalır, bu hücrelerin sitoplazması yaygın endoplazma retikulumu ve glikojen depoları içerir. Hücrelerin protein sentez kapasiteleri yüksektir. Diğer zonlara göre proteoglikan sentezi yüksektir. Çoğalma zonunun matriksinde kollajen fibrillerin ve matriks veziküllerinin dağılımı düzenli değildir. Matriks veziküllerinin miktarı, çoğalma zonunun alt kısmında ve hipertrofi zonunun üst kısmında fazladır. Bu veziküller hipertrofi zonunun aşağı kısımlarında mineralizasyona katılır. Çoğalma zonunda da proteoglikanlar toplu halde bulduklarından mineralizasyonu engellerler¹³.
- Hipertrofi veya olgunlaşma zonu: Bu zon çok genişlemiş kıkırdak hücrelerini içerir. Bu hücreler, sitoplazmalarında yoğun olarak

glikojen depoladığından parlak, şeffaf görünümündedir¹. Yapılan biyokimyasal incelemeler, bu zondaki hücrelerin metabolik olarak aktif olduğunu ve diğer hücrelere göre en yüksek glikolitik enzim içeriğine sahip olduğunu göstermiştir¹³. Kıkırdak matriks, hipertrofiye kıkırdak hücre sütunları arasında uzunlamasına bantlar şeklinde sıkışır¹.

- Kalsifikasyon zonu: Lakünalar birleşmeye başlar. Hipertrofiye kondrositler ölmeye başlar ve kıkırdak matriks kalsifiye olur¹⁻³.
- Kemikleşme zonu: Bu zondaki kalsifiye kıkırdak, kemik iliğinin bağ dokusu ile direkt temastadır. Kalsifiye kıkırdağın düzensiz yapısı üzerinde osteoprogenitör hücreler sıralanır ve spiküller üzerinde ince bir kemik matriksi çöker^{1,2}.

Böylece epifizler, yüzeyinde ince bir eklem kıkırdağı tabakası ve diafizle epifiz arasında yatay bir disk şeklindeki epifiz plağı kalacak biçimde kemik dokusu ile yer değiştirir¹⁻³.



Şekil 3. Büyüme plaklarının tamamlanmış görünümü. Küçük beyaz elips sütunları endokondral kemikleşmenin göstergesi olan hipertrofik kondrositleri göstermektedir. Oklar ile kıkırdak rezorpsiyon yönü ve rezorpsiyon alanları gösterilmiştir⁸.

2.5. Uzun Kemiklerde Boyuna Büyüme

Kemiğin boyuna büyümesi, birincil büyüme plağına (epifizyal plak) bağlıdır. Epifizyal plağın kondrositleri çoğalıp endokondral kemik oluşumu işlemine katılırlar. Çoğalma epifizyal tarafta olurken, kıkırdak dokunun kemik doku ile yer değiştirmesi diafizyal tarafta meydana gelir². Kıkırdak çoğalması ve kemiğe değişme hemen hemen aynı hızla meydana geldiğinden epifiz plağı kalınlığı sabit kalır. Büyüme durduğunda kıkırdak çoğalması olmaz ve epifiz plağı kemikleşir, epifiz ve diafiz kemik ile birleştirilir. Bu kısımdaki kemik oldukça dens olup, epifizyal çizgi adını alır. Bundan sonra boyuna büyüme görülmez^{1,4}. Histolojik olarak epifizyal plakta ikincil büyüme plağında görülen zonlar gözlenir. Bu zonlar epifizyal taraftan başlar sırasıyla devam eder^{1,3}.

2.6. Kemik Büyümesinin Düzenlenmesi

İskelet sisteminin büyüme fazından sorumlu olan büyüme plağının düzenlenmesi kompleks bir şekilde gelişir. Büyüme hormonu, tiroid hormonu ve steroid hormonlar gibi farklı sistemik faktörler büyüme plağının fonksiyonunu etkiler. Bu faktörlerin etkinliğini, kondrosit çoğalması, terminal farklanma, vasküler invazyon ve kemik dokusu oluşumunu koordine eden düzenleyici döngü aracılığıyla yaptığı görülmüştür¹⁸.

Düzenleyici döngüde etkili olduğu bilinen en iyi tanımlanmış faktörler, Ihh (Indian Hedgehog) geni ve paratiroid hormonla ilişkili protein (parathyroid hormon-related protein; PTHrP) dir³⁴.

PTHrP birçok dokuda bulunmasına karşın dolaşımda bulunmaz, bu nedenle otokrin ve parakrin etkili bir sitokindir¹³. Kondrositlerde çoğalmayı baskılar ve tip 10 kollajen, alkalın fosfataz, kemik morfogenetik protein-6 (Bone Morphogenetic Protein-6; BMP-6), Ihh gibi olgunlaşma ile ilişkili genleri baskılar. PTH-PTHrP reseptörleri, Ihh aracılığıyla küçük kondrositlerin hipertrofik kondrositlere değişim oranını düzenleyerek kıkırdak ve kemik doku değişiminde önemli rol oynar^{11,13}.

Ihh, hipertrofik hücrelerden sentezlenir, kondrosit çoğalmasını başlatır ve PTHrP ile negatif feedback dönüşünün kolaylaşmasını aktive eder³⁵. Ihh, reseptörlerine bağlanır ve prehipertrofik kondrositlere komşu perikondral hücrelerde, transkripsiyon faktörlerinden GLI ailesinin üyelerini aktive eder. Bu uyarı daha sonra bu hücreler ile kemik uçlarındaki perikondral hücrelere,

artiküler yüzeye iletilir. Periartiküler kondrositlerden sekrete edilen PTHrP büyüme plağında çoğalan kondrositler ile prehipertrofik kondrositler arasındaki sınırdaki bulunan hücrelere yayılır ve prehipertrofik kondrosit terminal farklanmasını durdurur^{35,36}.

İskelet büyümesi devam ederken büyüme plağında PTHrP sekrete eden hücreler ve PTHrP'nin artiküler perikondral kaynağı arasında ikincil kemikleşme merkezi oluşur ve bu süreçte düzenleyici döngü değişir. Muhtemelen büyüme plağının üst çoğalma zonundaki hücreler, perikondral hücrelerin Ihh uyarısına cevabında rol aldığı ve PTHrP ürettiği düşünülmektedir. Böylece büyüme plağında çoğalan hücreler ve prehipertrofik hücreler arasında yeni feedback yolu kurulur¹⁸.

Büyümede etkili olduğu bilinen bir diğer faktör, fibroblast büyüme faktörü-3 (Fibroblast Growth Factor-3; FGF-3)'tür. FGF-3 uzunlamasına büyümede negatif düzenleyici olarak anahtar rol alır^{37,38}. Sıklıkla çoğalan kondrositler ve büyüme plağındaki prehipertrofik kondrositlerden sentezlendikten sonra, buradaki hücrelerin çoğalmalarını antimitotik faktör P21 etkisi ile durdurur. Çoğalma zonunda FGF-3 promitotik Ihh uyarılarına karşı işlev görür. FGF-3 ile Ihh uyarıları arasında bir ilişki olduğu düşünülmesine karşın bu mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır³⁹.

2.7. Kemik Büyüme Faktörleri

Osteoblastik kemik oluşumu ve osteoklastik kemik yıkımı, kemiğin hacmini belirleyen ince dengeyi gerektirir. Kemik dokunun oluşumu ve geri emilimi, hormonlar (kalsitonin, parathormon gibi) ve bölgesel kemik büyüme faktörlerinin etkileriyle meydana gelmektedir¹².

Bölgesel büyüme faktörlerinin, kondrosit çoğalması, olgunlaşması, makromolekül sentezi, hücre içi kalsiyum dengesi ve matriks mineralizasyonunu etkilediği bilinmektedir. Hücre çoğalması ve biyosentetik aktiviteyi etkileyen bu faktörlerin bölgesel osteoblast ve osteoklastlar üzerinde de hem parakrin, hem de otokrin etkili olduğu düşünülmektedir^{12,13}.

Hücresel aktivitenin bölgesel düzenleyicisi olarak işlev gören büyüme faktörleri, doku spesifik polipeptidler olarak tanımlanabilir. Büyüme faktörleri, biyolojik fonksiyonlarını hedef hücre yüzeyinde bulunan transmembran reseptörlerine bağlanarak yerine getirirler. Transmembran reseptörlerinin hücre

dışı kısmına bağlanınca, bu reseptörün hücre içi kısmı uyarılır ve protein kinaz aktivasyonu meydana gelir. Kinaz kaskatı, mRNA transkripsiyonunu aktifleştirir. Daha sonra hücre içinde kullanılan veya hücreden taşınan proteinin translasyonu olur^{10,12}.

IGF-1, IGF-2, TGF- β , FGF-1, FGF-2 gibi faktörler kemik doku matriksinde bulunurlar ve normal kıkırdak dokunun sentez işleminde rol alırlar^{10,11,12}.

2.7.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri

IGF düzenleyici sistem, kemik dokuda major büyüme düzenleyici sinyal ağını oluşturur. Bu düzenleyici sistem; 2 ligand (IGF-1, IGF-2), bu ligandların reseptörleri (IGF-1R, IGF-2R), asit değişken subunit (acid-labile subunit-ALS), 6 tane yüksek affiniteli insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein;IGFBP) gibi düzenleyici proteinleri içerir^{40,41}. Bu komponentler hep birlikte hücrel farklanma, büyüme, çoğalma, migrasyon ve hücrenin apoptozise karşı yaşamsal etkilerini içeren önemli biyolojik sonuçları kontrol eder⁴².

IGF-1 ve IGF-2'nin her ikisi de küçük tek zincirli polipeptitler olup insüline benzer olarak pre-pro moleküller olarak sentezlenirler⁴³. İnsülin ve diğer peptit hormonlar gibi spesifik dokudaki hücrelerde üretilip depolanmazlar, bunun yerine vücuttaki hemen hemen tüm hücreler tarafından üretilirler. Kan akımındaki konsantrasyonları sıklıkla diğer peptit hormonların yaklaşık olarak 1000 katıdır ve biyolojik aktiviteleri birkaç yüksek affiniteli bağlayıcı proteinler tarafından düzenlenir⁴².

IGF-1 ve IGF-2 ligandları hedef hücrelerde çeşitli kombinasyonlarda veya tek başına bulunabilen farklı hücre yüzey reseptörleri ile etkileşir. IGF-1 ve IGF-2'nin her ikisinde temel biyolojik etkiler IGF-1R ile olur⁴¹. IGF-1R'ü hücre dışı bölgede glikozillenmiş prekürsörler olarak sentezlenen transmembran tirozin kinaz reseptörleridir. Bu reseptörler 2 tane hücre dışı α subunit ve bunlara disülfid bağları ile bağlanmış 2 tane transmembran β subunitin, β - α - α - β şeklinde düzenlenmesiyle oluşan heterotetramerik glikoproteinlerdir⁴⁴. IGF-1'in, kendi reseptörünün α subunitindeki spesifik ligand bağlayıcı bölgelere tutunması ile reseptörün β subunitinin tirozin fosforilasyonunda yapısal değişiklik meydana

gelir. Bunun sonucunda β subunitin hücre içi kısmında bulunan intrinsik tirozin kinaz enziminin aktivasyonu meydana gelir^{45,46}.

IGF-1 yaklaşık olarak 7,5 kDa'luk moleküler ağırlığı ile 70 aminoasit dizisinden oluşan molekül olup A, B, C, D olmak üzere 4 organize peptit bölümlerinden oluşur. IGF'nin major üretim alanı karaciğer olmasına rağmen vücutta hemen hemen tüm dokularda sentezlendiği bilinmektedir⁴⁷. Serum IGF düzeyi birçok faktörden etkilenir, fakat büyüme hormonu (growth hormone; GH) IGF'nin karaciğerde üretilmesinin ve kana verilmesinin en önemli düzenleyicisidir⁴⁸.

Önceleri kemirgenlerde üretilmiş IGF'nin tüm paternlerine bakılarak, IGF-2'nin fetal büyüme için işlevsel olduğu, IGF-1'in ise postnatal ve yetişkin büyüme faktörü olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür. Oysaki insanlarda yaşamları boyunca çeşitli dokularda üretilen IGF-1 ve IGF-2'nin farklı paternlere sahip olduğu gözlenmiştir. İnsanlarda, tüm yaşlarda IGF-2'nin serum konsantrasyonu IGF-1'e göre önemli oranda yüksek olup puberteden sonra sabit kalır ve GH tarafından düzenlenmez. Bununla birlikte IGF-2 embriyonik ve fetal gelişimde önemli rol alırken, postnatal dönemde işlevsel önemi azalarak büyük oranda IGF-2'nin etkisi IGF-1 ile yer değiştirebilir⁴¹. IGF-1 eksik farelerde, IGF-2 eksik farelere göre perinatal mortalitenin artması ve ağır postnatal büyüme geriliğinin gözlenmesi, postnatal gelişimde IGF-1'in daha önemli olduğunu göstermiştir. IGF-1, IGF-2 ve IGF-1R'ün işlevsel etkileri, bu faktörler tek tek veya kombine olarak knockout edilerek fare modellerinde gösterilmiştir⁴⁸. Bununla birlikte IGF-1 ve IGF-2'nin her ikisinin etkilerinin oluşmasında aracılık eden IGF-1R delesyonunun diğerlerine göre daha ağır fenotiplere neden olduğu saptanmıştır⁴⁹. Ayrıca IGF-1 gen defekti oluşturulan farelerde organogenezin bozulduğu görülmüştür, ancak karaciğer kökenli IGF-1 gen defekti oluşturulan farelerde serum IGF düzeyi %75 azalmış, ilginç olarak postnatal büyüme çok az etkilenmiştir⁵⁰. Böylece yapılan çalışmalarla bu hormonun organogenez için de temel rol aldığı ileri sürülmüştür.

IGF'ler kemik dokunun gelişmesinde ve onarımında önemli rol oynamakla birlikte bu mekanizmalar günümüzde kesin olarak anlaşılamamıştır. IGF-1 ve IGF-2 iskelet hücreleri tarafından sentezlenen en yaygın büyüme faktörleri arasındadır⁵¹. IGF-1 ve IGF-1R kondrositler, osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından sentezlenmektedir. IGF-1 kondrosit çoğalmasını ve

matriks sentezini düzenlerken osteoblastik hücre fonksiyonunun otokrin düzenlenmesini sağlar ve kemik oluşumunu uyarır^{52,53}.

Longitudinal kemik büyümesinde ve kemik kitlesinin korunmasında, dolaşımdaki ve lokal sentezlenen IGF-1 önemli rol oynamaktadır. Osteoblastlar tarafından sentezlenen IGF-1'in hormonal düzenlenmesi, lokal olarak kemik yeniden şekillenmesinde önemli role sahiptir. Parathormon osteoblastlar tarafından IGF-1'in de novo sentezini güçlü bir şekilde uyarır. Böylece yeni sentezlenmiş IGF-1 direkt olarak osteoblast replikasyonunu ve kollagen sentezini artırır⁵⁴.

IGF-1 eksik transjenik farede kemik uzunluğunun normalden kısa ve kemikleşmenin gecikmiş olduğu gözlenmiştir^{55,56}. Oysaki transjenik farelerin osteoblastlarında IGF'nin aşırı üretimi, kemik oluşumunda artışla sonuçlanmıştır⁵⁷. Buna zıt olarak IGF-2 gen eksikliği olan farelerde kemik uzunluğu normal olduğu ve kemikleşmede gecikmenin olmadığı saptanmıştır. IGF-2'nin aşırı üretiminin ise kemik boyutlarında ve yapılan kemik doku miktarında belirgin etki göstermediği bildirilmiştir⁵⁸.

IGF-1 reseptörünün büyüme plağının tüm hücrelerinde yoğun olarak sentezlendiği gösterilirken, IGF-1'in kondrosit farklanması, çoğalması ve hipertrofisi üzerindeki etkisinin bu reseptör aracılığıyla meydana geldiği ileri sürülmüştür⁵⁹. Ayrıca IGF-1R eksikliği olan farelerde organ hipoplazisi ve kemikleşmenin geciktiği göze çarpmıştır⁴⁸. Zang ve ark.⁶⁰ tarafından matür osteoblastlarda IGF-1R delesyonu yapılarak, mineral eklenmesinde IGF-1'in kritik önemi olduğu gösterilmiştir. Benzer olarak osteoblastlarda IGF-1'in sentezlenmesini artırarak artmış osteoblast aktivitesi saptanırken, osteoblast öncüllerinin sayısında değişiklik gözlenmemiştir. Bu bilgiler IGF-1'in az farklanmış kemik hücreleri için mitojenik olduğunu, osteoblastlarda osteokalsin üretimini, alkalin fosfataz aktivitesini ve tip 1 kollajen sentezini artırabileceğini gösteren in vitro çalışmalar ile desteklenmiştir⁶¹. Osteoblastların fonksiyonlarını düzenlemesine ek olarak bazı araştırmacılar tarafından osteoklast farklanmasının ve işlevlerinin artmasının, nükleer faktör kappa B reseptör aktivitesi (Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand; RANKL) aracılığıyla olduğu kadar, IGF-1R aracılığıyla da direkt olarak gerçekleştiği gösterilmiştir⁶². Osteoklast oluşumunda ve diğer düzenleyici faktörler tarafından osteoklastların aktivasyonlarının düzenlenmesinde de rol almaları nedeniyle kemik oluşumu ve

rezorbsiyonunda kompleks etkisi olan büyüme faktörüdür^{63,64}. Birçok büyüme faktörü gibi IGF-1 de kemiğin kalsifiye matriksinde bulunur. Rezorbsiyon işlemi süresince ortama salınır ve bu yolla lokal osteoblastların tekrar aktifleşmesi sağlanarak, osteoklastlar tarafından oluşturulmuş rezorbsiyon oyuklarının doldurulması sağlanmış olur⁶⁵.

IGF-1 ve GHR (Growth Hormon receptor) mutasyonu yapılan sıçanlarda; kondrositlerin çoğalmasının azaldığı, aktif olarak bölünen kondrosit zonunda çoğalmanın azalması ile üretim oranının düştüğü saptanmıştır. Ayrıca hipertrofik kondrosit zonundaki olgunlaşma yetersizliğine ve hipertrofik kondrositlerin büyüklüklerinde azalmaya bağlı olarak gelişimin geciktiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada IGF-1 mutant sıçanlarda, epifizin periferinden ikincil kemikleşme merkezinin oluşacağı bölgeye doğru, damarların ilerlemesinde yetersizlik olduğu ve böylece ikincil kemikleşme merkezinin geç olduğu saptanmıştır⁶⁶.

IGF-1'in kemik iliğindeki multipotansiyel öncül hücrelerin osteoblastlara ve adipositleri içeren diğer mezenşimal tip hücrelere farklanmasını nasıl etkilediği konusundaki bilgiler çok azdır. Bununla birlikte insan kemik iliği hücreleri üzerinde mitojenik etkili olduğu, farklanma üzerindeki etkisinin hücrelerin olgunlaşma evresine bağlı olduğu bilinmektedir⁶⁷.

2.7.2. Değiştirici Büyüme Faktörü- β

Kemik dokuda en sık bulunan büyüme düzenleyici faktörler olup, fetal ve neonatal gelişim süresince hem immunoregülatör düzenleyici hem de morfogenetik büyüme faktörü olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir⁶⁸. TGF- β ailesinin tanımlanmış 5 alt tipi (TGF- β_1 -TGF- β_5) benzer yapı ve fonksiyona sahip proteinler içerir. Memeli türlerde bunların üç izoformu (TGF- $\beta_{1,2,3}$) bulunmaktadır^{12,69}. Tip 1, 2, 3 olarak bilinen 3 reseptörü bulunmaktadır. Tip 1 ve tip 2 reseptör hücre membranında bulunur ve birbirine benzer özelliktedir. Yapısal olarak sisteinden zengin küçük bir hücre dışı kısım, bir tane transmembran kısım ve tamamı serin/treonin kinaz bölgesinden oluşan hücre içi kısımdan meydana gelir⁷⁰. Hücre membranında 2 tane tip 1 ve 2 tane tip 2 reseptör, heterotetramerik kompleks şekilde bulunur. Tip 2 reseptör, tip 1 reseptörün aktifleşmesini sağlar. Tip 1 reseptörü daha sonra hücre içi uyarı kaskatını başlatan SMAD reseptörünün transfosforilasyonunu sağlar ve bu proteinin hücre çekirdeğine taşınması ile gen transkripsiyonu düzenlenir^{11,71}. Tip

3 reseptörü, betaglikan olarak isimlendirilir, heterodimerik serin/treonin kinazlar olarak bilinen tip 1 ve tip 2 reseptörü aracılığı ile biyolojik etkilerini yapar. TGF- β izoformlarının reseptörlerine bağlanmasını etkiler, bu protein vasküler endotel hücreler ve hemopoetik hücreler için önemlidir^{11,72}.

Birçok hücrede ve dokuda bulunan TGF- β 'lar, inaktif kompleksler olarak sentezlenirler, etkilerinin ortaya çıkabilmesi vücutta yaygın olarak dağılan reseptörleriyle etkileşmelerine bağlıdır⁶⁹. Yapılan çalışmalar TGF- β 'nın kalsifiye kıkırdak ve kemiğin mineralize matriksine sıkıca tutunduğunu göstermiştir. Endokondral kemikleşme süresince kondroblastların, kemik yeniden şekillenmesinde ise osteoklastların aktivitesi ile ortama salınan proteazlar ve asidik çevre, inaktif olarak sentezlenen TGF- β 'yı aktifleştirerek reseptörlerine bağlanmasını sağlar^{73,74}. Carrington ve ark.⁷⁵ endokondral kemikleşme süresince TGF- β 'nın kıkırdak dokuda tamamen dağılmayıp kalsifiye olan kıkırdak bölgelerinde yoğunlaştığını ve kemikleşmede rol alacak TGF- β miktarındaki artışın, kıkırdak dokuda meydana gelen vasküler invazyonla uyumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

TGF- β ailesinin birçok hücrede; çoğalma, farklılaşma, migrasyon, apoptozis ve ekstrasellüler matriks üretimini düzenlediği gösterilirken, bu faktörlerin organogenezde de etkili olduğunu ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır^{76,77}. Fare embriyolarının organogenezis döneminde, vertebral kolonda ve gelişen ekstremitelerde, farklılaşmamış hücrelerin tip 2 reseptörü sentezledikleri ve TGF- β 'nın bu reseptörler aracılığıyla etkilerini gerçekleştirdikleri gözlenmiştir^{77,78}.

Tip 1 ve tip 2 reseptörler, dağılım oranı, ekspresyon düzeyine bağlı olarak endokondral kemikleşmenin farklı evreleri süresince kondrositlerin çoğalma ve farklılaşmasını düzenlerler⁸⁰. Kıkırdak dokuda tüm reseptörlerin sentezlendiği saptanırken, olgunlaşma süresince bu reseptörlerin sentelenmelerinde değişiklikler gözlenmiştir. Neonatal kıkırdakta tip 2 reseptörün tip 1 reseptöre göre daha yaygın ekspresyon paterni gösterdiği, bu reseptörün aktivitesi ile, osteoblastlar ve diğer hücrelerde, TGF- β /reseptör kompleksinin farklılaşma düzenleyici etkilerinin meydana geldiği gösterilmiştir^{81,82}.

Yapılan bir çalışmada gelişmekte olan sıçanların büyüme plaklarında, kondrositlerin çoğalma zonunun alt bölgelerinde, olgunlaşma ve hipertrofik

zonlarında bulunan hücrelerde tip 2 reseptör proteini ve mRNA sentezinin yapıldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada olgunlaşma zonu ve hipertrofik zondaki kondrositlerde yoğun immun işaretlenme saptanmıştır⁸³. Bu çalışmayla uyumlu olarak Horner ve ark⁸⁴. büyüme plağında kondrositlerin tüm zonlarında tip 2 reseptörün sentezlendiğini göstermişlerdir. Ayrıca fonksiyonel reseptör kompleksinin her iki komponentinin de, hipertrofik kondrosit zonunda yoğun olarak sentezlendiği saptanmıştır. İntramembranöz kemikleşme süresince oluşan osteofitlerin kıkırdak dokusunda, çoğalan kondrositlerde ve hipertrofik kondrositlerde, tip 2 reseptör daha yoğun olmak üzere tip1 ve tip 2 reseptörün sentezlendiğini göstermişlerdir. Bu nedenle kondrosit olgunlaşması süresince tip 2 reseptörünün sentezlenmesinin devam ettiği ve mitojenik uyarıları azaltarak hücrelerin hipertrofiye olmasında etkili olabileceği ileri sürülmüştür¹¹.

Kondrosit kültürlerinde TGF- β 'nin ekstrasellüler matriks sentezinde rol aldığı, proteoglikanların sentezlenmesini, bunların büyüklüklerini ve sülfatlanmasını artırdığı saptanmıştır⁸⁵. Rosado ve ark.⁸⁶ sıçan kostakondral kıkırdak hücrelerinde tip 2 reseptör blokajı uygulamışlar ve bunun sonucunda kondrositlerde proteoglikan sentezinin azaldığını göstermişlerdir. Ortama TGF- β_1 eklenmesinin proteoglikan sentezini değiştirmedeğini de ortaya koymuşlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre de kıkırdak hücrelerinden proteoglikan sentezinin tip 2 reseptör aracılı olduğu öne sürülmüştür. Başka bir çalışmada ise, TGF- β 'nin, olgunlaşan kondrositlerde tip 2 kollajen mRNA sentezini arttırdığı gösterilmiştir⁸⁷.

İn vivo ve in vitro çalışmalar TGF- β 'nin kemik yeniden şekillenmesinde önemli olduğunu göstermiştir⁸⁸. TGF- β 'nin immunoreaktivitesi osteoblastlarda ve kemik matriksinde gözlenmiştir⁸⁹. Kemik matriks proteiniyle ilgili olarak, kültüre osteoblastik hücrelerde osteopontin, osteonektin ve tip 1 kollajen sentezini düzenlediği saptanmıştır⁹⁰.

TGF- β osteoprogenitör hücrelerin çoğalmasını artırırken, bu hücrelerin kondrositlere ve osteoblastlara farklanmasını uyarır²⁸. Normal kemik dokuda, ekstrasellüler matriks üretimi ve hücre farklanması konusunda, farklanmış osteoblastlara göre farklanmamış preosteoblastik hücreleri etkilemeyi tercih eder. Sıklıkla preosteoblastların düzenlenmesinde TGF- β yanıtı, tip 2 reseptör aracılığıyla olabilir ve hızlı kemik yeniden şekillenmesi için tip 2 reseptör upregülasyonundan sözedilebilir⁸³.

2.7.3. Fibroblast Büyüme Faktörleri

Endokondral ve intramembranöz kemikleşmede etkili olduğu bilinen bu protein ailesinin bilinen 23 üyesi vardır. Bunların tümü %50'ye yakın oranda benzer diziyi paylaşırlar. FGF-1 ve FGF-2 prototip olup en sık çalışılan proteindir^{91,92}.

Tirozin kinaz superfamilyasına ait 4 ayrı FGF reseptörü (FGFR1-4) tanımlanmıştır. Bu reseptörler hücre dışı ligand bağlayıcı kısım, transmembran kısım ve hücre içi tirozin kinaz bölgesi olmak üzere 3 komponentten oluşur¹¹. Kendi ligandlarına bağlanan reseptörlerin tümü tirozin kinaz aktivitesi gösterir⁹³. Dimerize reseptör-ligand kompleksleri kümeleşir ve hücre tarafından endosite edilirler. Bu kompleksler DNA transkripsiyonunun düzenlenmesine giden özelleşmiş hücre içi proteinler için selektif bağlayıcı alanlar olarak işlev görürler¹².

Yapılan çalışmalarla FGF'lerin embriyonik dönemde ve postnatal dönemde kemik oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir⁹⁴⁻⁹⁶. Özellikle kök hücreler ve farklılaşmış hücrelerde etkili olan bu faktörler, hücrelerin migrasyonu, çoğalması, farklılaşması, morfoloji ve fonksiyonel değişikliklerinde etkilidir. Ayrıca bu faktörlerin mezenşimal hücrelerin kondrosit ve osteoblasta farklılaşmasını etkilediği, kondrosit çoğalmasını ve kondrositlerin terminal farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir^{11,97-100}.

FGF'ler kemikte ve kıkırdak matrikste bulunur, IGF-1 ve TGF- β ile kondrosit çoğalmasının uyarılmasında sinerjik etki gösterebilir. Yapılan doku kültürü çalışmalarında diğer faktörlere göre FGF'lerin daha mitojen olduğu saptanmıştır. Ortama eklenen FGF-2'nin kondrosit farklılaşmasının terminal fazını inhibe ettiği, alkalen fosfataz aktivitesini ve kalsiyum birikimini artırdığı saptanmıştır¹⁰¹.

Kemikleşme sürecinde kıkırdak şablondan kemik dokuya geçişte, vasküler invazyon ve kemikleşme için gerekli olan sinyallerin hipertrofik kondrositlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Bununla birlikte FGF-2'nin endotelial hücreler için kemotaktik ve mitojen olduğunu gösteren çalışmalarda bulunmaktadır¹⁰². Baron ve ark.¹⁰³ büyüme plağının metafizyal sınırına FGF-2 infüzyonu yaparak bu bölgede vasküler invazyonun ve kemikleşmenin arttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda bu faktörün birincil ve ikincil kemikleşmenin erken dönemlerinde, angiogenezis için gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Moncilla ve ark.¹⁰⁴ büyüyen sıçanlarda sistemik FGF-2 uygulamasının bifazik etkili olduğunu göstermişlerdir. FGF-2'nin düşük dozda verilmesi ile sıçanlarda büyüme plağı kondrositlerinde çoğalmanın ve uzunlamasına kemik büyümesinin arttığı gözlenirken, yüksek dozda verilen FGF-2'nin kondrosit çoğalmasını ve uzunlamasına kemik büyümesini azalttığı saptanmıştır. Bu sonuçlara benzer olarak Coffin ve ark.¹⁰⁵ FGF-2 üretimi artırılmış transjenik farelerde, uzun kemiklerin normal farelere göre aşırı kısalıldığını gözlemişlerdir. Aynı zamanda bu farelerin büyüme plağındaki istirahat ve çoğalma zonundaki kondrositlerin arttığını, hipertrofik kondrositlerin azaldığını bulmuşlardır.

FGF-2 kemik dokunun oluşmu için gerekli olan osteoblast fonksiyonlarını düzenler. Debiasis ve ark.¹⁰⁶ osteoblast kültürü çalışmalarında FGF-2 ile osteoblastların terminal farklanmasında ortaya çıkan apoptozis kaskadının engellendiğini bulmuşlardır. Bu faktörün antiapoptotik olarak çalıştığını ileri sürmüşlerdir.

FGF-2'nin kırık iyileşmesini arttırdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir. Kırık çalışmalarında FGF'nin insan rekombinant şeklinin kemiğe uygulanması, bu bölgede mezenşimal hücrelere farklanmasını, osteoblast sayısını, kallus hacmini ve yoğunluğunu arttırdığı saptanmıştır^{107,108}.

Tavşanlarda oluşturulan metafizyal kırık modellerinde eksojenöz verilen FGF-2'nin kırık iyileşmesini hızlandırdığı saptanmıştır¹⁰⁹. Başka bir çalışmada kırık onarımının erken evresinde periosteum ve yumuşak kallusta FGF-2'nin geniş oranda dağıldığı gözlenmiştir¹¹⁰.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Araştırmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Birimi'nde üretilen 70 adet erkek Wistar albino cinsi sıçan kullanıldı. Denekler, sıcaklığı 21 ± 1 °C, nem oranı %45–65 ve 12 saat gece, 12 saat gündüz koşulları sağlanan laboratuvar ortamında, 35cmX45cmX25cm boyutlarında plastik kafeslerde barındırıldı. Deneklerden 0-21 gün arasındakiler anne sütüyle beslenirken, diğerleri hazır pellet yem ve çeşme suyu ile beslendi.

Daha önce yapılmış çalışmalarda sıçan tibia proksimal epifiz⁸ ve humerus proksimal epifizinde¹¹ ikincil kemikleşme merkezi gelişim evreleri günlere göre sınıflandırıldı. Buna göre;

Evre 0: Doğumdan sonraki 0-4. gün arası olup, bu evrede epifizde herhangi bir değişiklik olmadığı gösterildi.

Evre 1: 6. gün (4-7. gün). Epifiz yüzeyinde kanal oluşumu.

Evre 2: 7. gün (6-8. gün). Gelişen kanalların birleşmesi ve kemik iliği alanının oluşması.

Evre 3: 9. gün (8-10. gün). Kemik iliği alanının genişlemesi, kemik iliği proksimal duvarında hipertrofik kondrositlerin artması, kemikleşme merkezinde kemikleşmenin başlaması.

Evre 4: 21. gün. Kemikleşme merkezinin genişlemesi ve ikincil büyüme plağı oluşumunun tamamlanması olarak belirtildi.

Çalışmamızda, tanımlanmış gelişim evrelerine göre, her grupta 10 hayvan olmak üzere 7 grup oluşturuldu. 1. grup 1. günde, 2. grup 4. günde, 3. grup 7. günde, 4. grup 10. günde, 5. grup 21. günde sakrifiye edildi. Literatürde 21. günden sonra ikincil kemikleşme merkezindeki değişiklikleri gösteren herhangi bir sınıflamaya rastlanmadı. Bu nedenle yukarıdaki gruplara ek olarak 6. grup 50. günde ve 7. grup 100. günde sakrifiye edilerek femur distal uçları alındı.

3.1. Işık Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi

Her denekten tibianın proksimali ve femurun distalini içerecek şekilde alınan diz eklemleri, %10'luk tamponlanmış formalin (pH:7.4)¹² içinde 48 saat

tespit edildiler. Daha sonra yumuşak doku kısımları uzaklaştırıldı ve dekalsifikasyon işlemi için 0.1 M Tris-HCl tamponunda hazırlanmış %10 EDTA (pH:7.4)⁸ solüsyonuna alındı. Dekalsifikasyon solüsyonu günlük olarak değiştirildi. Dokuların dekalsifikasyonu, deneklerin farklı yaşları nedeniyle kemik kalınlığına bağlı olarak 2-15 gün sürdü. Dekalsifikasyonun tamamlandığı kalsiyum okzalat testiyle anlaşıldıktan sonra dokular 2 saat akar suda yıkandı ve rutin olarak uygulanan doku takip yöntemi ile takip edildi.

3.1.1. Doku Takip İşlemi¹¹²

1. Etil Alkol (%80)	30 dk
2. Etil Alkol (%95)	2 saat
3. Etil Alkol (%95)	1 saat
4. Etil Alkol (%100)	1 saat
5. Etil Alkol (%100)	1 saat
6. Etil Alkol (%100)	1 saat
7. Ksilol	1 saat
8. Ksilol	1 saat
9. Ksilol	2 saat
10. Parafin	2 saat
11. Parafin	2 saat
12. Parafin	2 saat
13. Bloklama	

Blok haline getirilen dokulardan, Leica[®] RM2125RT marka rotary mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler adheziv lamlara (Superior Marienfeld-HistoBond[®]) alındı. Alınan kesitlerin histokimyasal incelemesi için, yaşa bağlı ikincil kemikleşme merkezinin oluşumu ve gelişimini değerlendirmek üzere toluidin mavisi ile boyandı. Femur distal epifizinde, ikincil kemikleşmenin olacağı merkezi bölge ve bu alanın çevresinde bulunan perifer bölgede ayrı ayrı inceleme yapıldı. İmmunohistokimyasal incelemeler için; IGF-1R β tavşan poliklonal IgG primer antikoru (SANTA CRUZ[®], sc-9038), TGF- β 2 R β tavşan poliklonal IgG primer antikoru (SANTA CRUZ[®], sc-400), FGF-2 tavşan poliklonal IgG primer antikoru (SANTA CRUZ[®], sc-7911) ile işaretleme yapıldıktan sonra, hücrelerin işaretlenme özellikleri ve işaretlenen hücre sayıları

değerlendirildi. Sayısal değerlendirme için, 1, 2, 3 ve 4. gruplarda ikincil kemikleşme merkezi bölgesinde, her alandan toplam 100 hücre sayıldı. İşaretlenen hücrelerin yüzdeleri hesaplanarak her grubun ortalaması bulundu.

IGF-1R β ve TGF- β R2, reseptör proteini oldukları için, pozitif hücre ortalamaları birbirleriyle karşılaştırıldı. Ayrıca bu antikolar ve FGF-2 antikoru da kendi içlerinde günlere göre de karşılaştırıldı.

5. grupta ikincil kemikleşme bölgesinin genişlemesi ve artiküler kıkırdağın oluşmaya başlaması, 6. ve 7. gruplarda ise ikincil kemikleşme bölgesinin tamamlanıp matür epifiz görünümünde olması nedeniyle (+) boyanan hücre sayımı yapılmadı. Bu gruplarda artiküler kıkırdağındaki kondrositlerde ve ikincil kemikleşme bölgesindeki osteoblastlarda, kemik trabeküllerinde yer alan osteositlerde IGF-1R β , TGF- β R2 ve FGF-2 immünoreaktivitesi değerlendirildi.

3.1.2. İmmunohistokimya Protokolü^{113,114}

1. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 °C etüvde 1 saat bekletildiler, daha sonra oda ısısında 3 kez 5'er dakika ksilolden geçirildiler.

2. Rehidratasyon işlemi için derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirildiler ve saf suya alındılar.

3. Fiksasyondan ve parafine gömülmeğe kaynaklanan antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için sitrat tamponu (pH: 6) içinde mikrodalgada 750 W' ta 5 dakika muamele edildiler.

4. Bu işlemde sonra dokular aynı sitrat tamponu içinde 20 dakika soğumaya bırakıldılar.

5. Taze hazırlanmış fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3 kez 5'er dakika yıkandılar.

6. Distile suda % 3'lük hazırlanmış hidrojen peroksit (H₂O₂) ile endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi için 20 dakika inkübe edildiler.

7. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandılar.

8. Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı olabilecek istenmeyen zemin boyanmasını engellemek için, PBS içinde %2'lik sulandırılmış sekonder antikorun elde edildiği hayvanın normal serumu ile 1 saat inkübe edildiler.

9. Dokuların üzerindeki normal serum pipetle çekildi, yıkama yapılmadan dokular üzerine PBS içinde hazırlanmış %0.5'lik sığır serum

albumini (PBS-BSA) ile aşağıdaki gibi sulandırılmış primer antikorlar damlatıldı. Tüm antikorlar 1/100 oranında sulandırıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde +4 °C'de buzdolabında bir gece inkübe edildiler.

10. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandılar.

11. Biotin ile bağlanmış sekonder antikor solüsyonundan damlatılarak oda ısısında 1 saat inkübe edildiler. Tüm antikorlar için keçiden elde edilmiş anti-tavşan (CHEMICON®) sekonder antikorunu %0.5 PBS-BSA içinde 1/500 oranında sulandırıldı.

12. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandılar.

13. Streptavidin-biotin-peroksidaz enzim reagenti ile 20 dakika inkübe edildiler.

14. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandılar.

15. Peroksidaz substratı olan diaminobenzidin (DAB) damlatıldı ve boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 3-5 dakika inkübe edildi.

16. Distile suda 5 dakika yıkandılar.

17. Hematoksilen ile zıt boyama (3-5 saniye) yapıldı.

18. Akar suda berraklaşana kadar yıkandı.

19. Kesitler derecesi artan alkollerden geçirilerek dehidrate edildiler.

20. Ksilolden 3 kez 5'er dakika geçirildiler.

21. Entellan ile kapatılan dokular, Olympus® BX50 ışık mikroskobu ile incelendi ve aynı mikroskoba eklenmiş Nikon® coolpix5000 digital kamera ile resimleri çekildi.

Negatif kontrol amacıyla ayrılan kesitlere primer antikor içermeyen %0.5 PBS-BSA damlatıldı. Daha sonra protokole aynı şekilde devam edildi.

3.2. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel Analizler, SPSS 11.5 ve Statistica 6.1 paket programlarında yapıldı. Faktör, grup değişkenlerinin pozitif hücre sayısı üzerine etkisinin test etmek amacı ile iki yönlü varyans analizi kullanıldı. FGF2 faktörünün gruplara göre pozitif hücre sayısı üzerine etkisi tek yönlü varyans analizi ile test edildi. Alt grup karşılaştırmalarında Tukey HSD çoklu karşılaştırma testinden yararlanıldı. Sonuçlarda $p < 0,050$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Morfolojik Bulgular

Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde yaşla ilişkili olarak epifizde, aşağıdaki morfolojik değişiklikler tanımlandı.

Doğumdan sonraki 1. günde (1.grup) perikondriumla çevrili femur distal epifizinin tamamen hyalin kıkırdak yapısında olduğu, epifizde bulunan kondrositlerin ise dinlenme ve çoğalma evresinde olduğu izlendi (Resim 1).

4. günde (2. grup), epifizin 1. gündeki hyalin kıkırdak yapısını devam ettirdiği ancak yüzeyinde küçük çöküntülerin meydana geldiği belirlendi. Perikondriumdan kaynaklanan kapillerlerin bu alanlara doğru ilerlediği gözlemlendi (Resim 2).

7. günde (3. grup), epifiz yüzeyinde kazınma işlemlerinin arttığı, oluşan kanallarla kan damarlarının ikincil kemikleşmenin oluşacağı bölgeye doğru ilerlediği, bu bölgedeki kondrositlerin ise çoğunluğunun hipertrofik kondrosit olduğu saptanırken, primer büyüme plağının oluşmaya başladığı izlendi (Resim 3).

10. günde (4. grup), kemik iliği alanının genişlediği, osteoprogenitör hücrelerden farklı osteoblastların kemik matriks üretimini başlattığı ve yer yer immatür kemik spiküllerinin oluşmaya başladığı saptandı (Resim 4).

21. günde (5.grup), endokondral kemikleşme sürecindeki evreler belirgin olarak gözlemlendi. İkincil kemikleşme merkezinin genişlediği, bu alanda kemik spiküllerinin oluştuğu ve epifiz periferinde ikincil büyüme plağının oluştuğu izlendi. (Resim 5)

50. (6. grup) ve 100. (7. grup) gündeki morfolojik değişiklikler benzerdi. Ancak 50 günlük grupta endokondral kemikleşmenin azalmış olsa da devam ettiği, kemik dokudan artiküler kıkırdağa geçiş bölgesinde çok sayıda hipertrofik kondrositlerin bulunduğu saptandı. 100 günlük grupta ise ikincil kemikleşme merkezinin tamamlandığı ve epifizin, artiküler kıkırdak bölgesi dışında hemen tamamen trabeküler kemik yapısı ile yer değiştirdiği gözlemlendi. Her iki grupta bazı kemik trabekülleri içerisinde az miktarda kıkırdak dokusuna rastlandı (Resim 6,7)

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Primer antikoru içermeyen negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi (Resim 8).

4.2.1. IGF-1R β

1. grubun immunohistokimyasal incelenmesinde, epifizi çevreleyen perikondriumda bulunan farklanmamış mezenşimal hücrelerde IGF-1R β işaretlenmesi saptanmazken (Resim 9), epifiz periferinde bulunan kondrositlerin çoğunda işaretlenme vardı (Resim 10). Epifiz merkezinde ise IGF-1R β (-) kondrositler, IGF-1R β (+) kondrositlere göre daha fazlaydı (Resim 11). 2. gruptaki IGF-1R β işaretlenmesi 1. gruptakine benzerdi (Resim 12, 13). 3. grupta kemikleşme merkezine doğru oluşan kanal çevresindeki kondrositlerde ve kanal içerisindeki osteoprogenitör hücrelerde yoğun IGF-1R β işaretlenmesi gözlemlendi (Resim 14).

3. ve 4. grupta ise farklanmamış mezenşimal hücre tabakasının oldukça incelendiği bu hücrelerin çoğunun sitoplazmasının da IGF-1R β işaretlendiği görüldü. Ayrıca, periferik ve merkezi bölgedeki kondrositlerin çoğunluğunda önceki iki gruptakine benzer şekilde sitoplazmik olarak işaretlenme bulunmaktaydı (Resim 15, 16, 17, 18). Bunlara ilaveten 4. grupta epifiz merkezindeki hipertrofik kondrositlerin tamamına yakınında IGF-1R β işaretlenmesi saptandı (Resim 19).

5. grupta, epifiz periferinde, hücre farklanmasının olduğu bölgelerde ve genişleyen ikincil kemikleşme merkezinin çevresindeki hemen hemen tüm hipertrofik kondrositlerde, IGF-1R β ile belirgin işaretlenme gözlemlendi (Resim 20). 6. grupta ikincil kemikleşme merkezinde oluşan trabeküler kemik bölgesindeki osteoprogenitör hücrelerde ve osteoblastlarda, ayrıca kemik matrikste bulunan osteositlerin bir kısmında da IGF-1R β işaretlenmesi gözlemlendi. Oluşan artiküler kıkırdakta ise, yüzeysel ve ara tabakalardaki kondrositlerin çoğunda pozitiflik saptandı (Resim 21, 22). 7. grupta ise, ikincil kemikleşmenin tamamlandığı, işaretlenme özelliklerinin 6. gruptakine benzer olduğu gözlemlendi (Resim 23).

4.2.2. TGF- β R2

1. ve 2. grupta epifizlerin periferindeki kondrositlerin çoğu TGF- β R2 işaretlenmesi gösterirken, epifizlerin merkezindeki kondrositlerin çoğunda TGF- β R2 işaretlenmesi gözlenmedi (Resim 24, 25, 26, 27).

3. ve 4. gruplarda benzer bulgular gözlemlendi. Epifizlerin periferindeki kondrositlerin çoğunda TGF- β R2 işaretlenmesi vardı (Resim 28,30). Her iki grupta kemikleşmenin oluşacağı alanlardaki hipertrofik kondrositlerde TGF- β R2 işaretlenmesi saptandı (Resim 29,31).

5. grupta epifizlerin merkezinde ikincil kemikleşme merkezinin genişlediği ve bu alanın çevresindeki matür ve hipertrofik kondrositlerin TGF- β R2 (+) işaretlenme gösterdiği gözlemlendi (Resim 32). Ayrıca kemikleşme alanında yeni oluşan kemik spikülerinde de TGF- β R2 işaretlenmesi saptandı. (Resim 33).

6. ve 7. grupta ikincil kemikleşme merkezindeki trabeküler kemikte, bazı osteositlerde TGF- β R2 işaretlenmesi gözlenirken, artiküler kıkırdakta yüzeyel ve ara tabakalardaki kondrositlerde TGF- β R2 işaretlenmesi saptandı (Resim 34, 35, 36). Her iki grupta da oluşan kemik matriksin TGF- β R2 ile (+) işaretlendiği göze çarptı (Resim 35, 37).

4.2.3. FGF-2

1. ve 2. grupta epifizlerin periferindeki kondrositlerde belirgin FGF-2 işaretlenmesi vardı (Resim 38, 40). Ancak epifizlerin merkezindeki kondrositlerin çoğunda FGF-2 işaretlenmesi saptanmadı (Resim 39, 41).

3. grupta oluşan kanalların çevresindeki kondrositlerde belirgin FGF-2 işaretlenmesi saptandı (Resim 42). 3. ve 4. gruptaki FGF-2 işaretlenmesi benzer dağılım gösterirken (Resim 43, 44, 45), bunlara ek olarak hipertrofik kondrositlerin hepsinde FGF-2 işaretlenmesi saptandı (Resim 46).

5. grupta oluşan kemikleşme merkezi çevresindeki kondrositlerde belirgin FGF-2 işaretlenmesi gözlemlendi (Resim 47). 6. ve 7. grupta FGF-2 işaretlenmesi benzer dağılım gösterdi. Trabeküler kemikteki bazı osteositlerde FGF-2 işaretlenmesi varken, artiküler kıkırdakta da yüzeyel ve ara tabakadaki kondrositlerde belirgin FGF-2 işaretlenmesi saptandı (Resim 48, 49, 50).

4.3. İstatistiksel Analiz

IGF-1R β , TGF- β R2, FGF-2 antikoru için tüm gruplarda merkezi bölgelerde pozitif boyanan hücre sayımları yapıldı. Elde edilen sonuçlar tablo.1 de verildi. Bu sonuçlar gruplar arası değişimi belirlemek üzere istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

4.3.1. IGF-1R β

1. grup ile 2. grup karşılaştırıldığında, 2. grupta pozitif hücre sayısında artış vardı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,999).

1. grup ile 3. grup karşılaştırıldığında, 3. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı (p=0,000).

1. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında, 4. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı (p=0,000).

2. grup ile 3. grup karşılaştırıldığında, 3. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı (p=0,000).

2. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında, 4. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı (p=0,000).

3. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında, 4. grupta pozitif hücre sayısında artış vardı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,999).

4.3.2. TGF- β R2

1. grup ile 2. grup karşılaştırıldığında, 2. grupta pozitif hücre sayısında artış vardı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,999).

1. grup ile 3. grup karşılaştırıldığında, 3. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı (p=0,000).

1. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında, 4. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı (p=0,000).

2. grup ile 3. grup karşılaştırıldığında, 3. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı (p=0,000).

2. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında, 4. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı (p=0,000).

3. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında, 4. grupta pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış vardı (p=0,020).

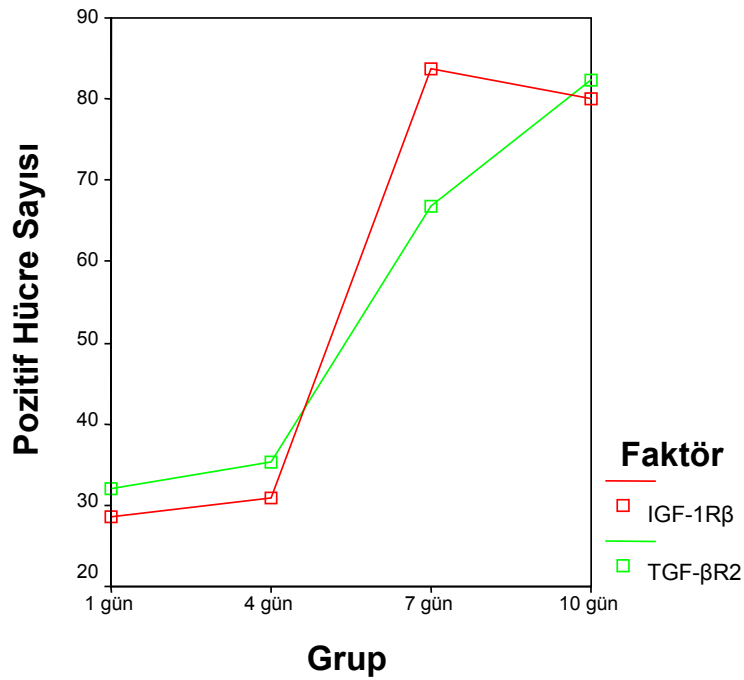
4.3.3. IGF-1R β ve TGF- β R2

IGF-1R β 1. grup ile TGF- β R2 1. grup karşılaştırıldığında, TGF- β R2 ile işaretlenen hücre ortalaması daha yüksekti ancak bu fark anlamlı değildi ($p=0,997$).

IGF-1R β 2. grup ile TGF- β R2 2. grup karşılaştırıldığında, TGF- β R2 ile işaretlenen hücre ortalaması daha yüksekti ancak bu fark anlamlı değildi ($p=0,994$).

IGF-1R β 3. grup ile TGF- β R2 3. grup karşılaştırıldığında, IGF-1R β ile işaretlenen hücre ortalaması anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0,008$).

IGF-1R β 4. grup ile TGF- β R2 4. grup karşılaştırıldığında, TGF- β R2 ile işaretlenen hücrelerin ortalaması daha yüksekti ancak bu fark anlamlı değildi ($p=0,997$). Her iki grubun pozitif hücre sayılarının aynı günlerde karşılaştırılması şekil 4 te gösterilmiştir.



Şekil 4. IGF-1R β ve TGF- β R2 ile işaretlenen hücrelerin günlere göre dağılımı

4.3.4. FGF-2

FGF-2 ile işaretlenen hücrelerin günlere göre dağılımı şekil 5 te verilmiştir. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında;

1. grup ile 2. grup karşılaştırıldığında, 2. grupta pozitif hücre sayısında artış vardı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,241$).

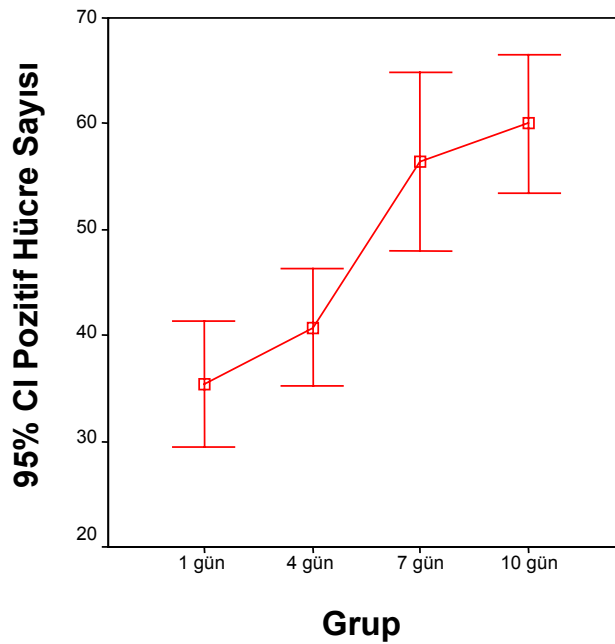
1. grup ile 3. grup karşılaştırıldığında, 3. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı ($p=0,000$).

1. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında, 4. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı ($p=0,000$).

2. grup ile 3. grup karşılaştırıldığında, 3. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı ($p=0,000$).

2. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında, 4. grupta pozitif hücre sayısında anlamlı artış vardı ($p=0,000$).

3. grup ile 4. grup karşılaştırıldığında, 4. grupta pozitif hücre sayısında artış vardı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,407$).

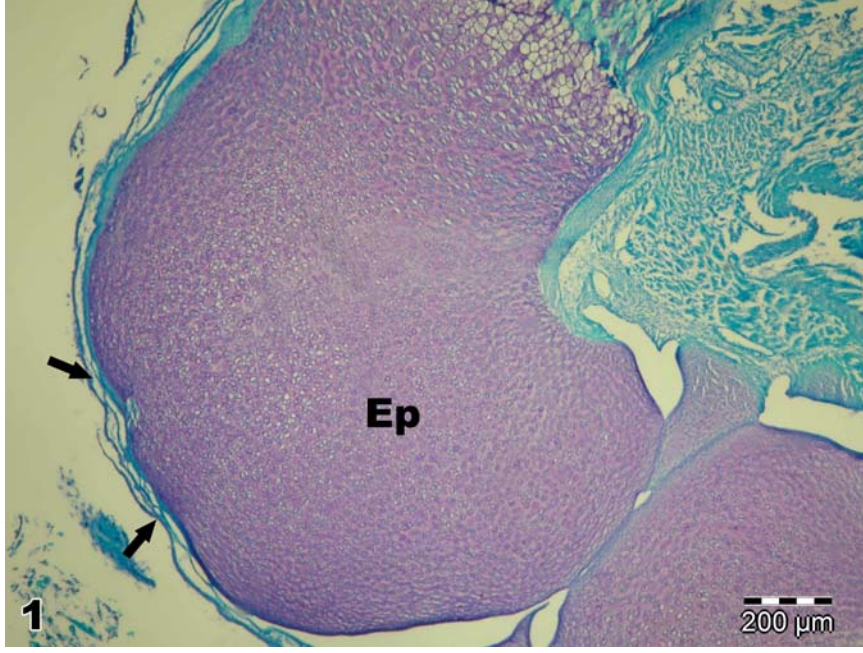


Şekil 5. FGF-2 ile işaretlenen hücrelerin günlere göre dağılımı

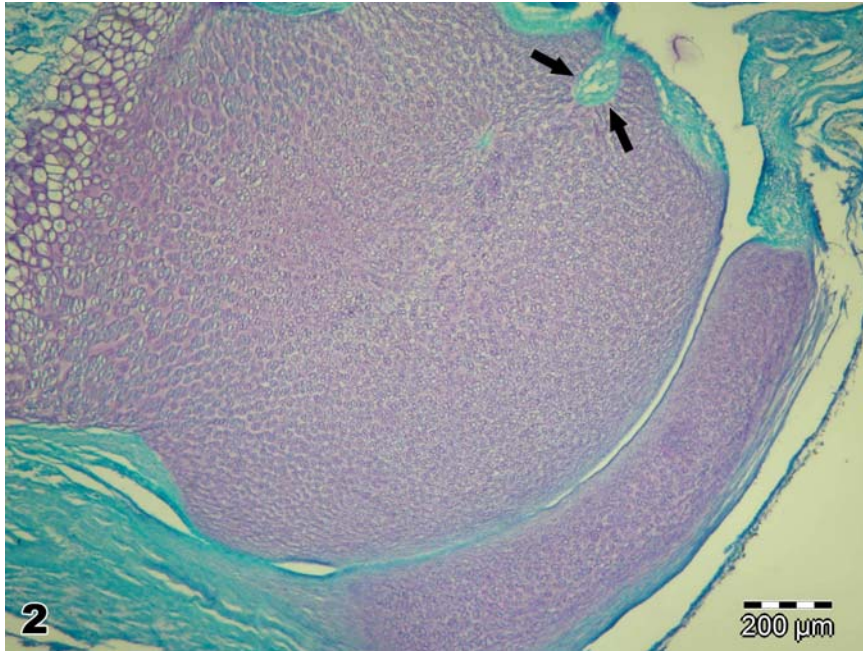
Tablo 1. IGF-1R β , TGF- β R2, FGF-2 pozitif hücre ortalamaları

GRUP	1	2	3	4
IGF-1Rβ	28,00 \pm 6,11	31,00 \pm 8,18	83,75 \pm 8,30*	79,92 \pm 9,09*
TGF-βR2	32,08 \pm 9,00	35,20 \pm 3,78	66,80 \pm 18,07*	82,40 \pm 8,24*
FGF-2	35,40 \pm 8,36	40,71 \pm 5,99	56,40 \pm 11,73*	60,00 \pm 7,89*

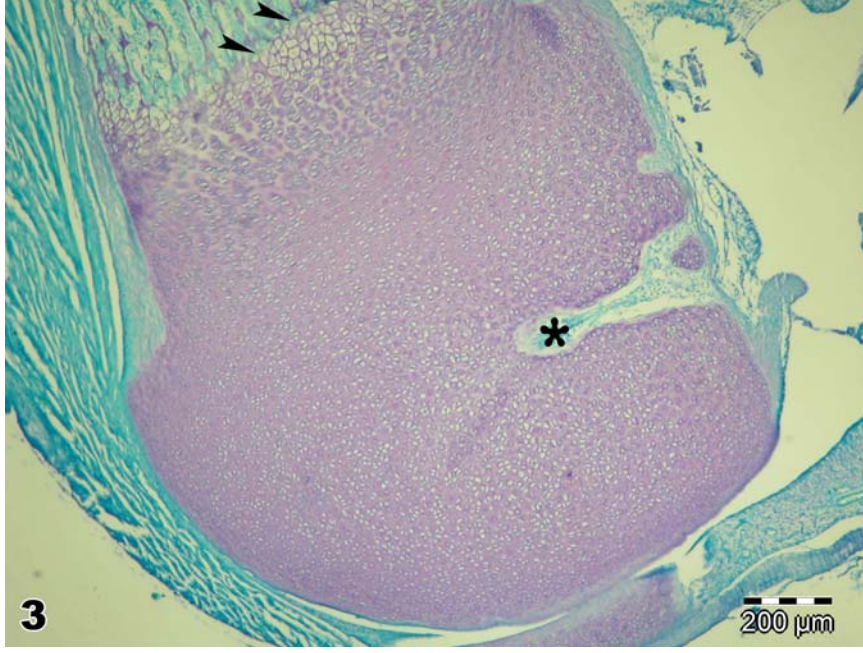
* p<0,050



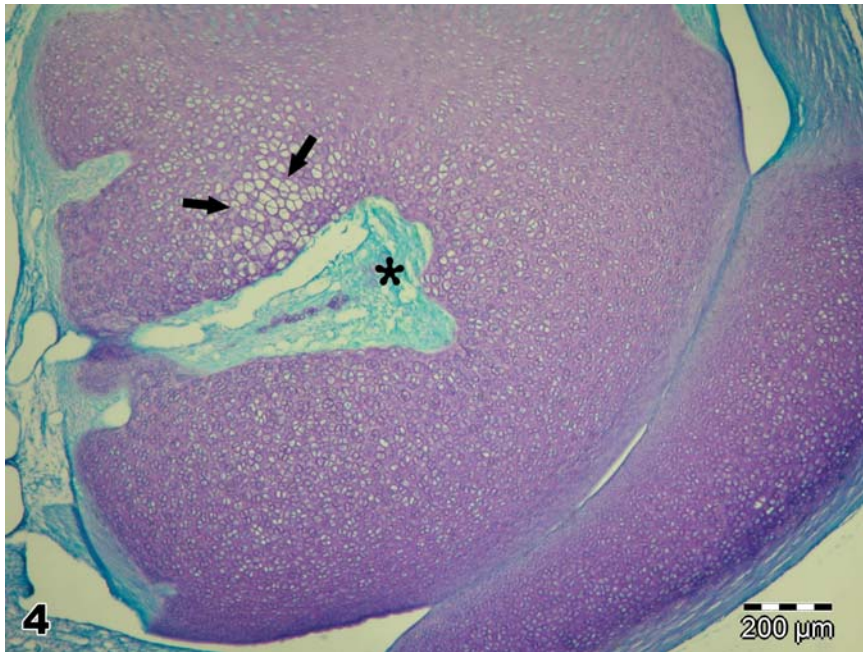
Resim 1. 1. grupta hyalin kıkırdak yapısındaki femur distal epifizinin (Ep) ışık mikroskopik görünümü (toluidin mavisiX120). Perikondriyum (ok).



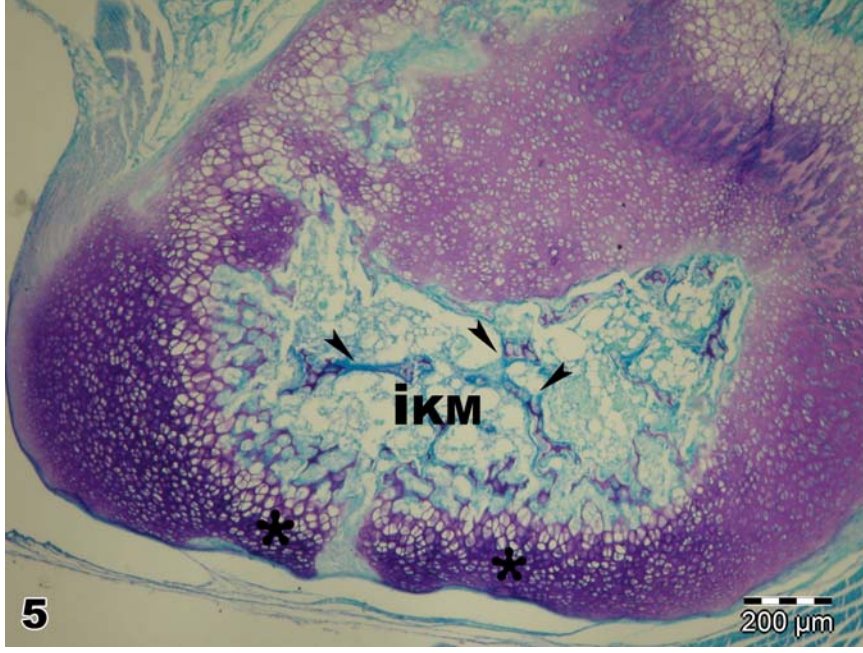
Resim 2. 2. grupta femur distal epifizinin ışık mikroskopik görünümü. Epifiz yüzeyinde çöküntülerin oluşması (ok), (toluidin mavisiX120).



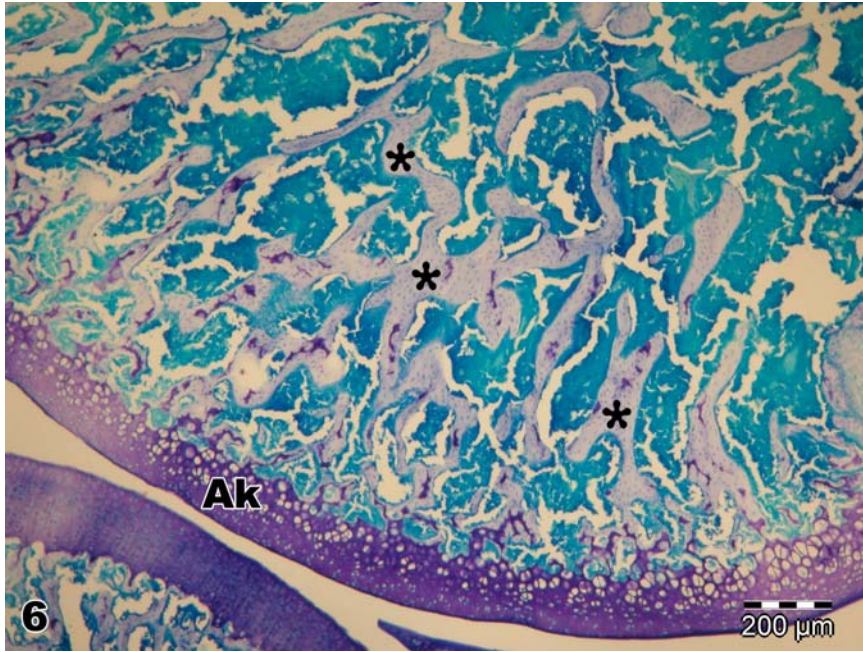
Resim 3. 3. grupta femur distal epifizinin ışık mikroskopik görünümü. Kan damarlarının epifiz merkezine doğru ilerlemesi (asterisk). Birincil büyüme plağının oluşması (ok başı), (toluidin mavisiX120).



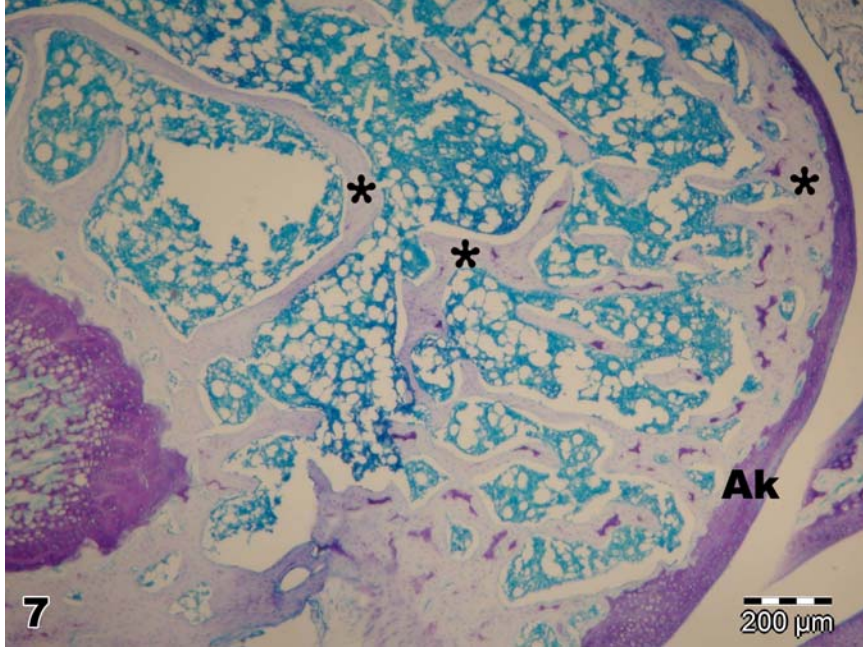
Resim 4. 4. grupta femur distal epifizinin ışık mikroskopik görünümü. Epifiz merkezinde kemik iliği alanının genişlemesi (asterisk), hipertrofik kondrositler (ok), (toluidin mavisiX120).



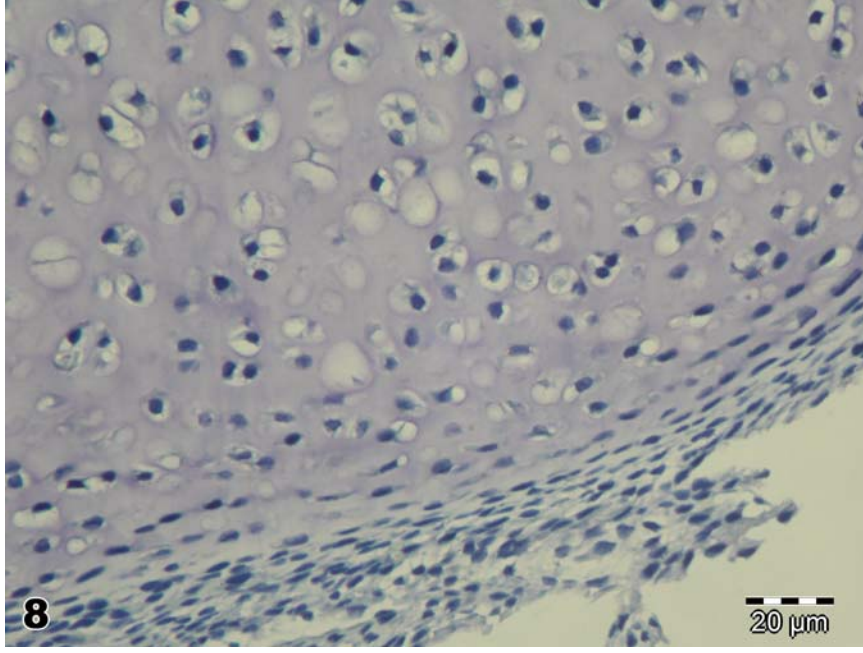
Resim 5. 5. grupta femur distal epifizinde kemikleşme. İkincil kemikleşme merkezinin (İKİM) genişlemesi, ikincil büyüme plağı (asterisk) ve kemik spiküllerinin oluşması (ok başı), (toluidin mavisiX120).



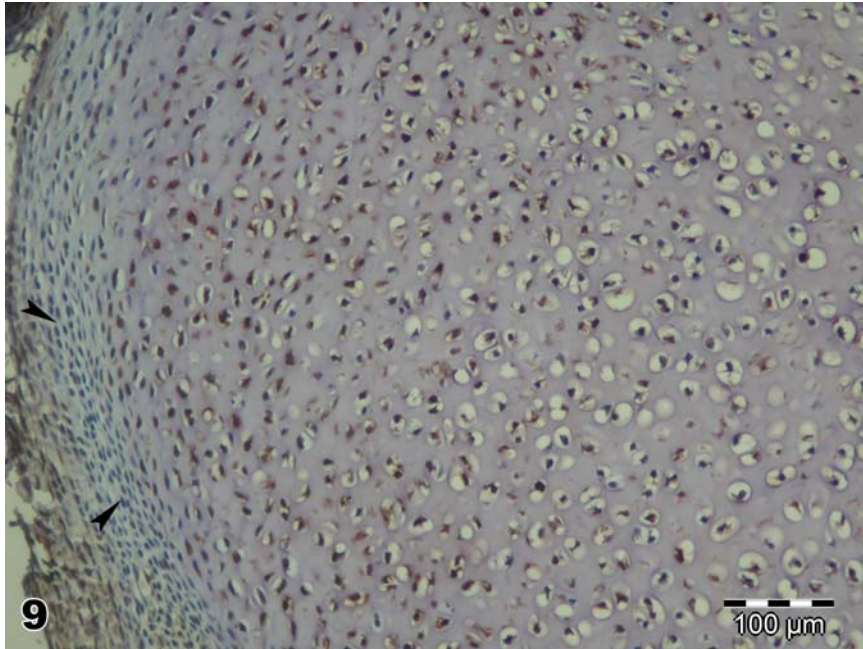
Resim 6. 6. grupta femur distal epifizinde ikincil kemikleşme merkezi. İkincil kemikleşme merkezindeki matür kemik trabekülleri (asterisk) ve artiküler kıkırdak oluşumunun tamamlanması (Ak), (toluidin mavisiX120).



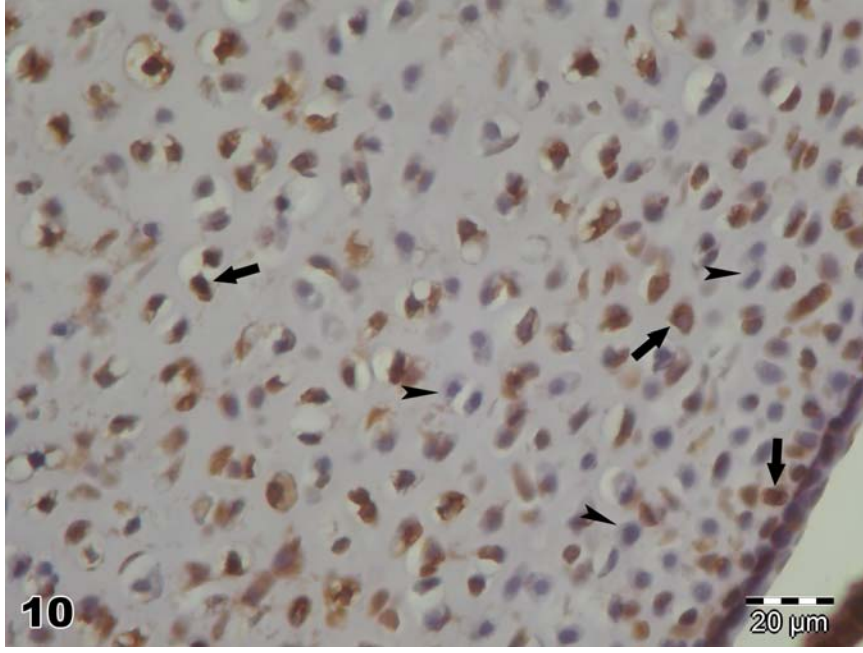
Resim 7. 7. grupta ikincil kemikleşmenin tamamlanması. Matür kemik trabekülleri (asterisk), artiküler kıkırdak (Ak), (toluidin mavisiX120).



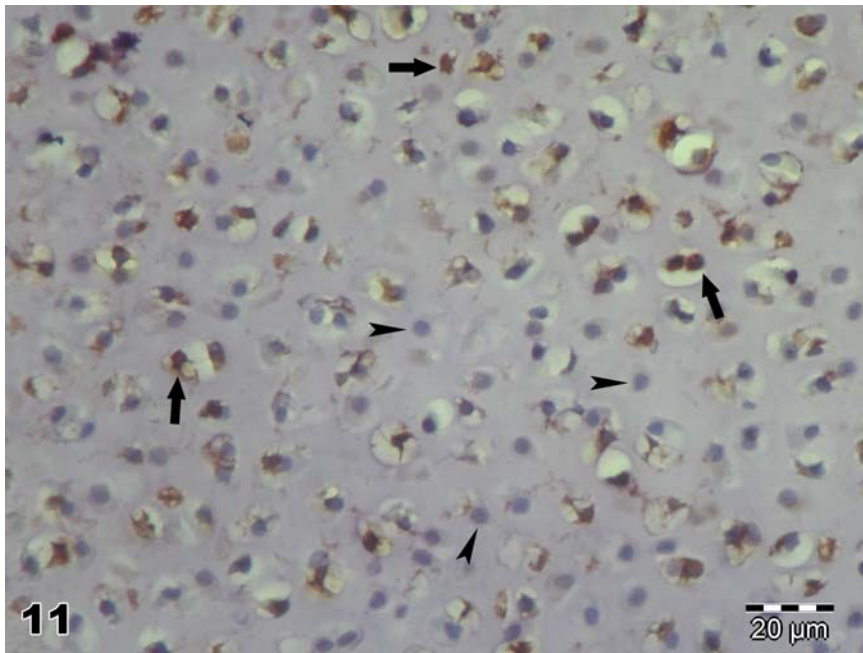
Resim 8. Negatif kontrol (X1200).



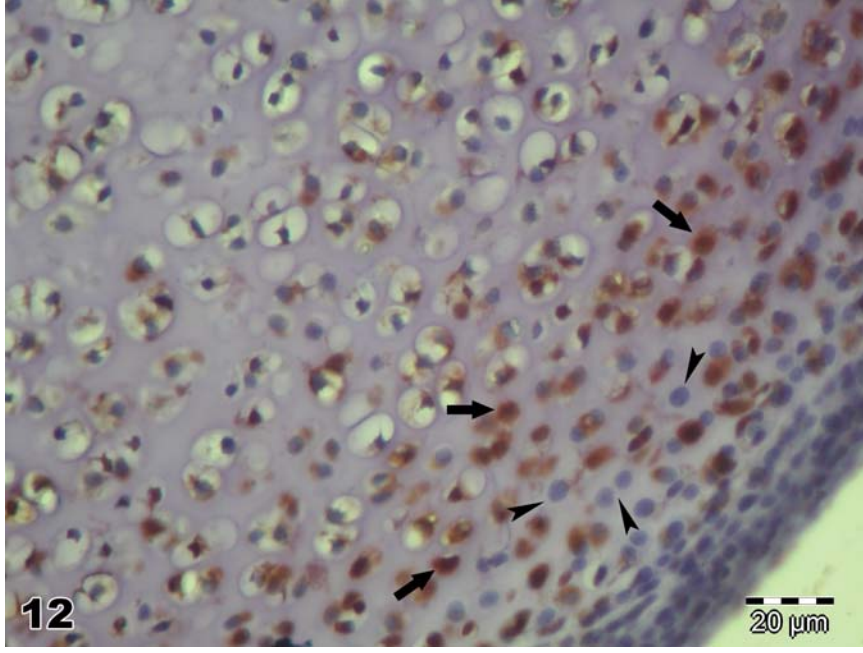
Resim 9. 1. grupta IGF-1R β işaretlenmesi. Epifizi çevreleyen perikondriumda IGF-1R β antikoru ile işaretlenmeyen farklanmamış mezenşimal hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX300).



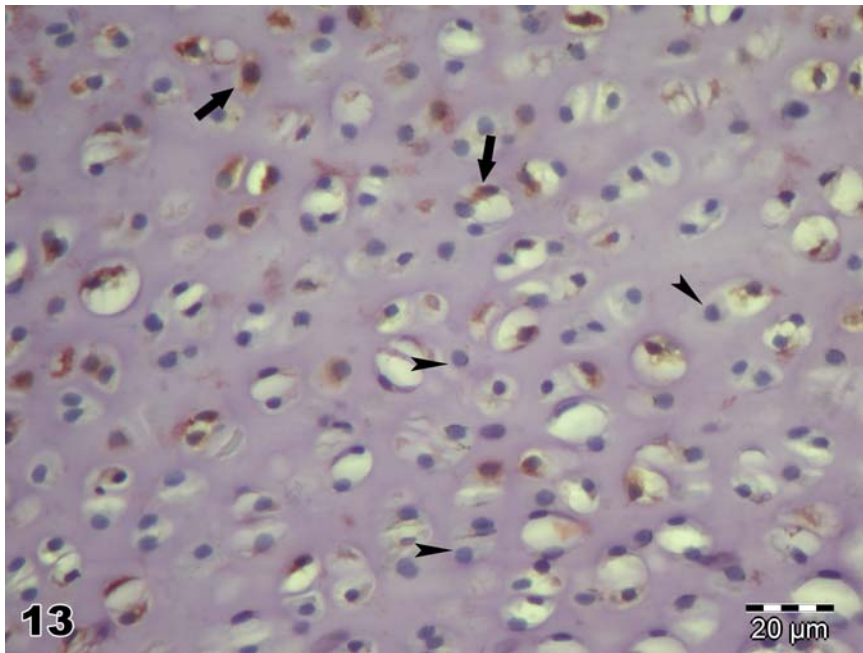
Resim 10. 1. grupta epifiz periferinde IGF-1R β immunoreaktivitesi. IGF-1R β (+) hücreler (ok) ve (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



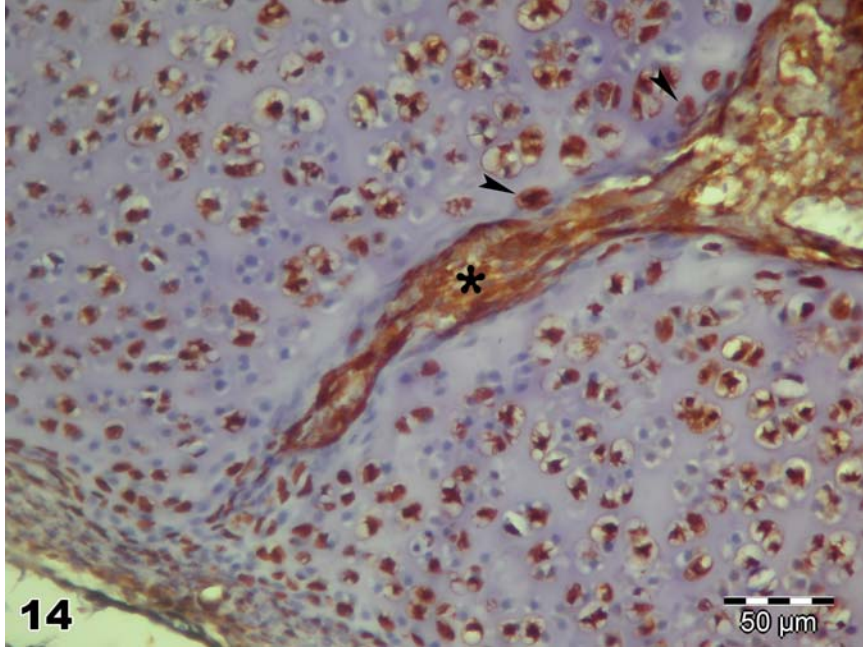
Resim 11. 1. grupta epifiz merkezinde IGF-1R β immunoreaktivitesi. IGF-1R β (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



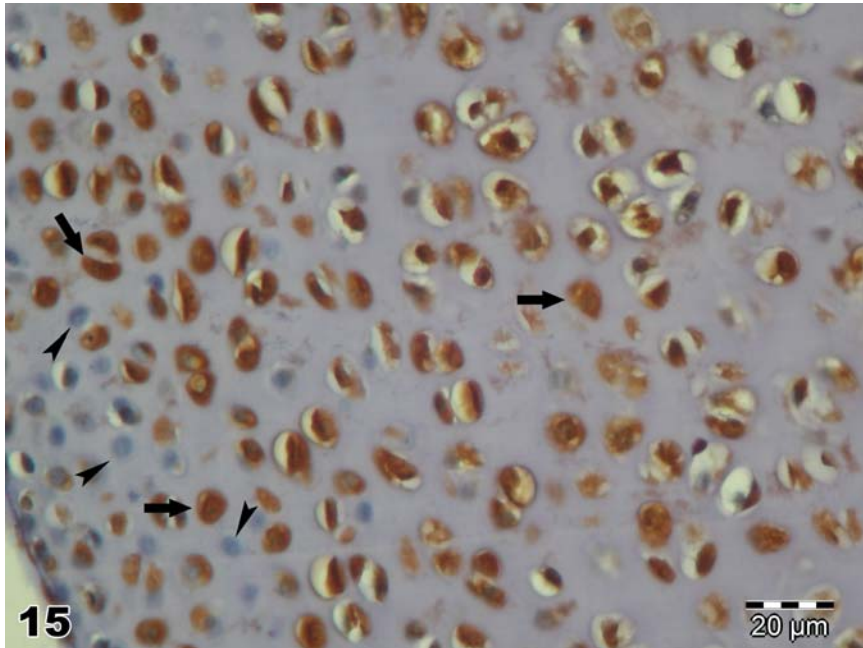
Resim 12. 2. grupta epifiz periferinde IGF-1R β işaretlenmesi. IGF-1R β (+) hücreler (ok) ve (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



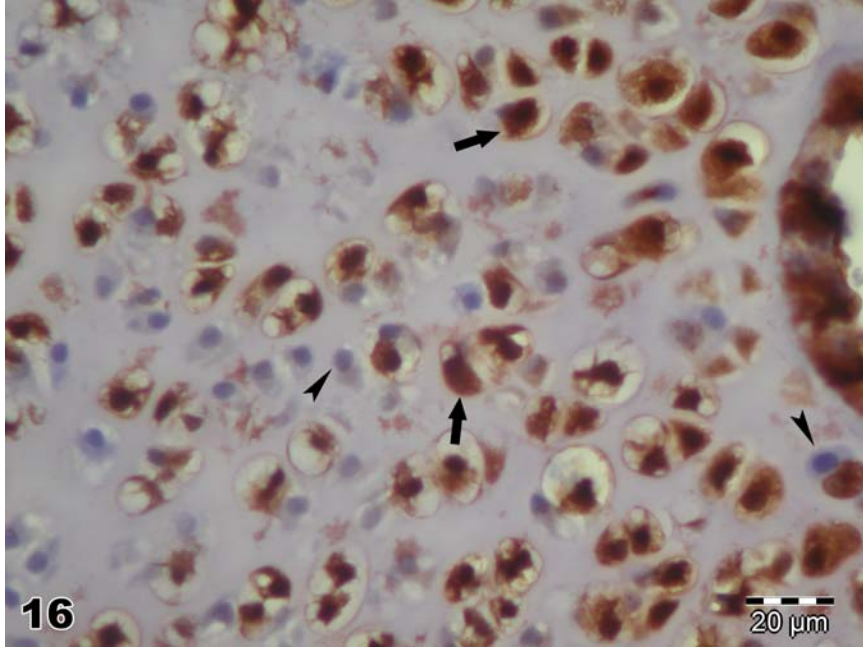
Resim 13. 2. grupta epifiz merkezinde IGF-1R β işaretlenmesi. IGF-1R β (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



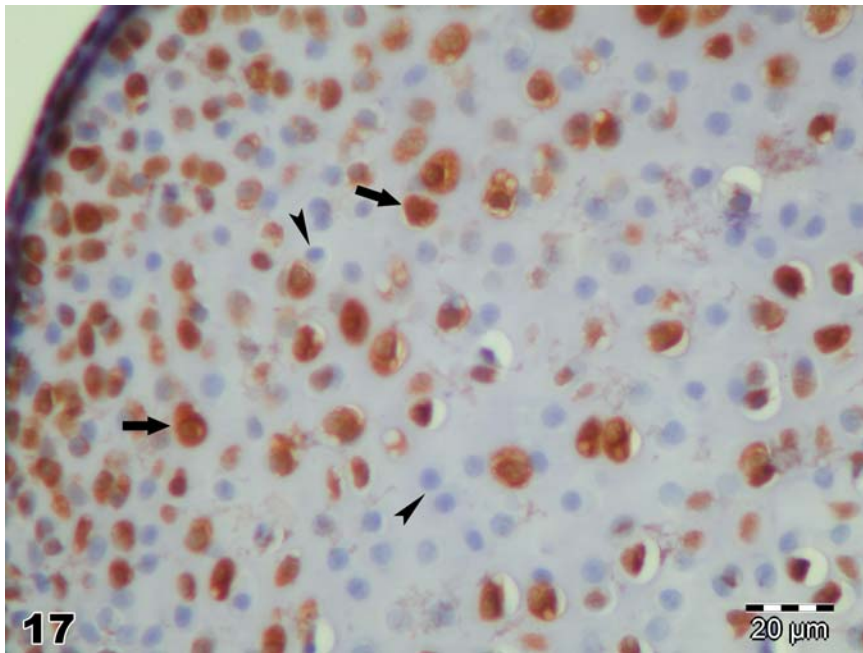
Resim 14. 3. grupta epifiz periferinden merkezine doğru gelişen kanalların görünümü. Kanal çevresinde bulunan kondroblast ve kondrositlerde IGF-1R β işaretlenmesi (ok başı), kanal içindeki osteoprogenitör hücrelerde yoğun işaretlenme (asterisk), (indirekt immunoperoksidazX600).



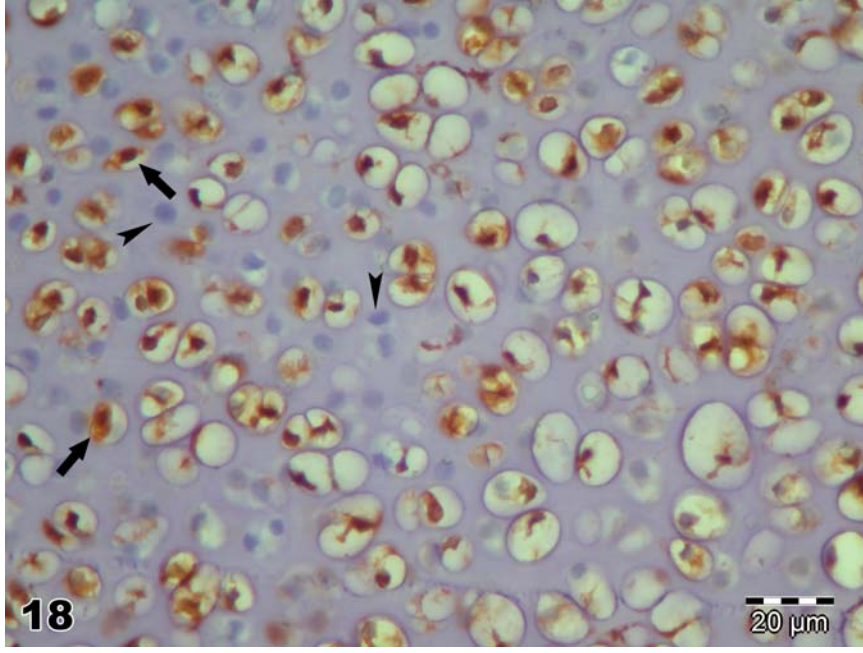
Resim 15. 3. grupta epifiz periferinde IGF-1R β immunoreaktivitesi. IGF-1R β (+) hücreler (ok) ve (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



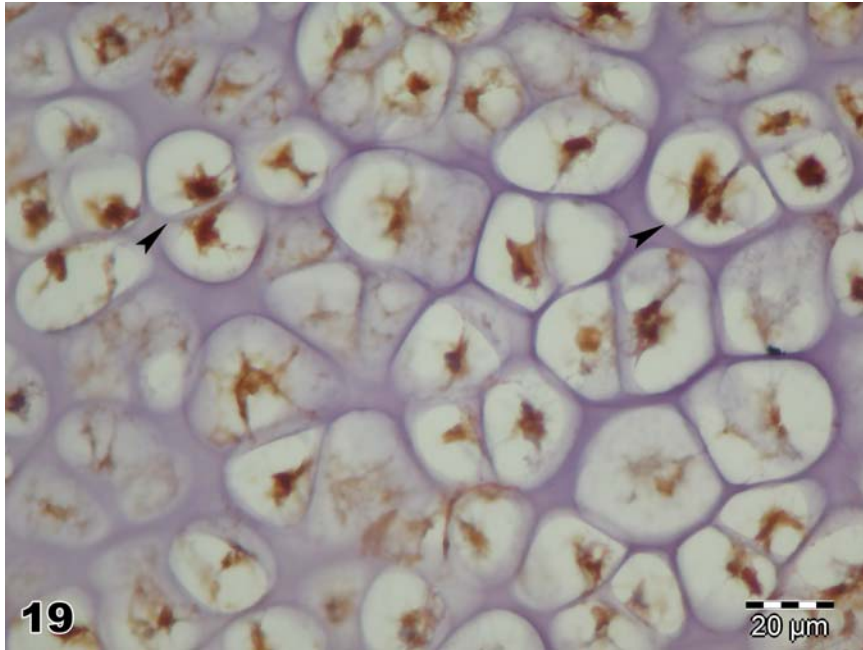
Resim 16. 3. grupta epifiz merkezinde IGF-1R β immunoreaktivitesi. IGF-1R β (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



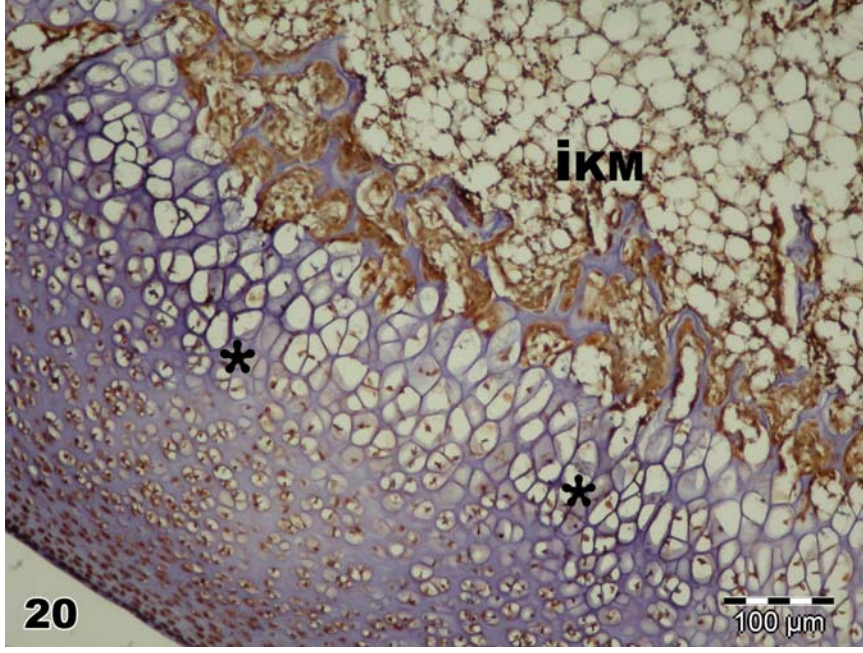
Resim 17. 4. grupta epifiz periferinde IGF-1R β işaretlenmesi. IGF-1R β (+) hücreler (ok) ve (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



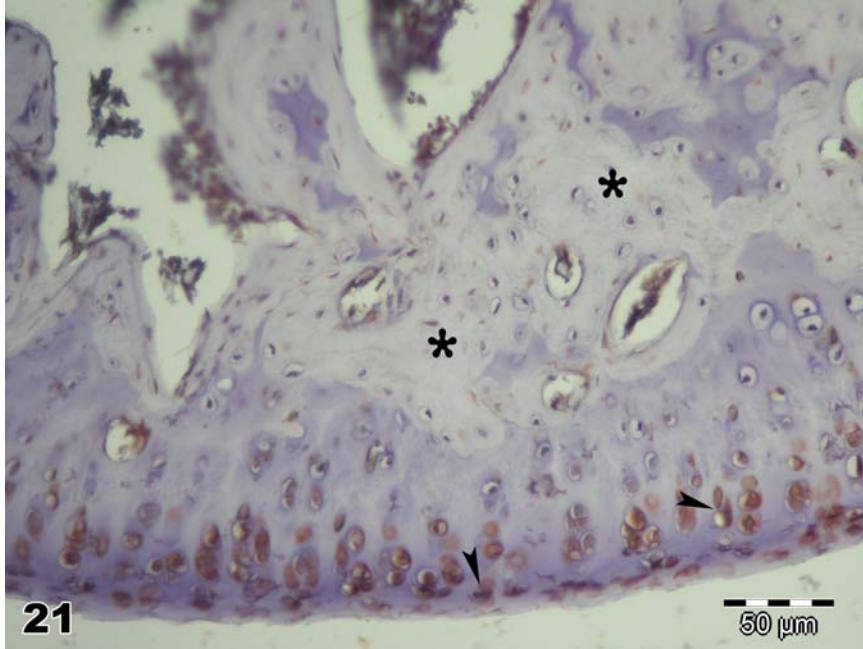
Resim 18. 4. grupta epifiz merkezinde IGF-1R β işaretlenmesi. IGF-1R β (+) hücreler (ok) ve (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



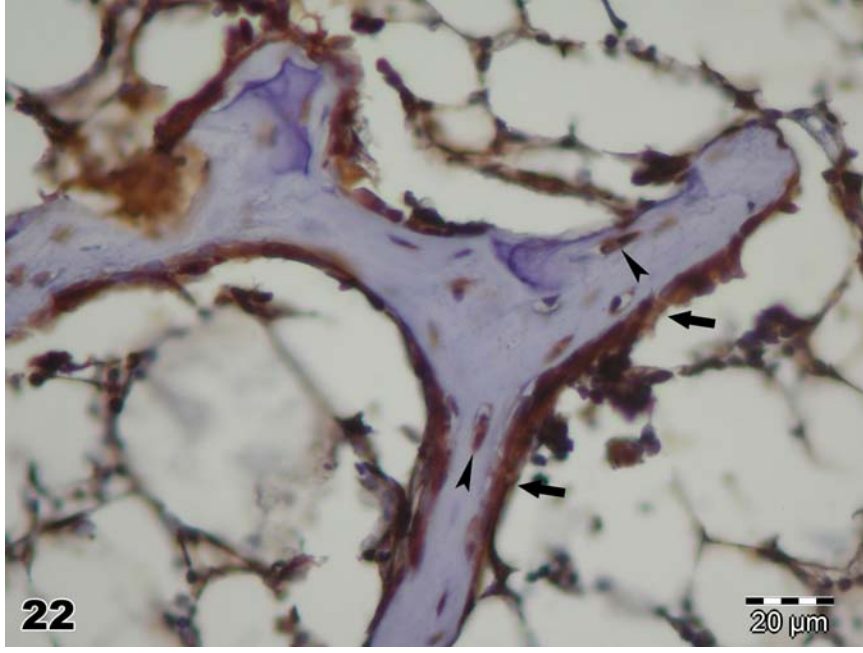
Resim 19. 4. grupta epifiz merkezindeki hipertrofik kondrositler. İkincil kemikleşmenin oluşacağı bölgelerdeki hipertrofik kondrositlerde (+) IGF-1R β işaretlenmesi (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



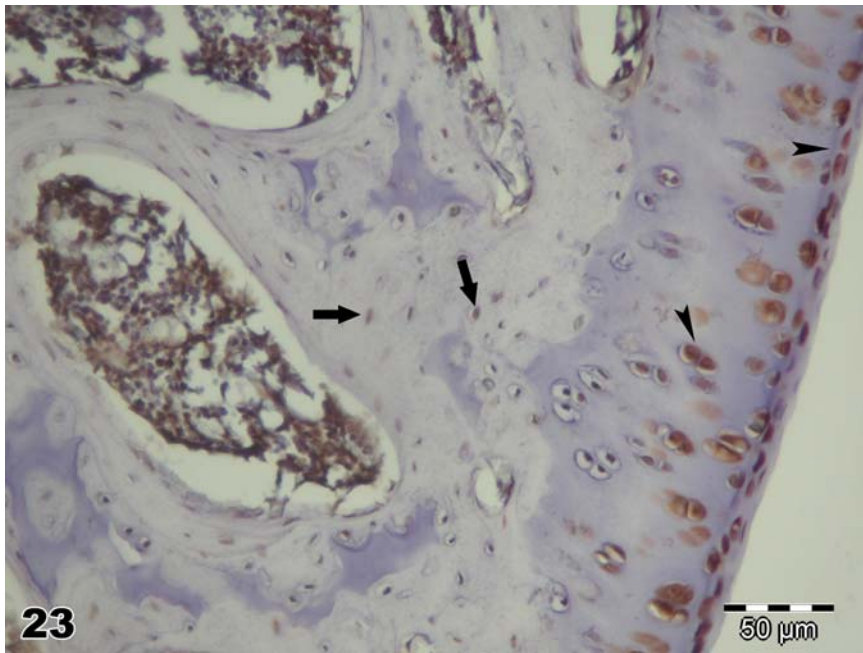
Resim 20. 5. grupta IGF-1R β işaretlenmesi. Oluşan ikincil kemikleşme merkezi (İKİM) çevresindeki hemen hemen tüm kondrositlerde belirgin (+) IGF-1R β işaretlenmesi (asterisk), (indirekt immunoperoksidazX300).



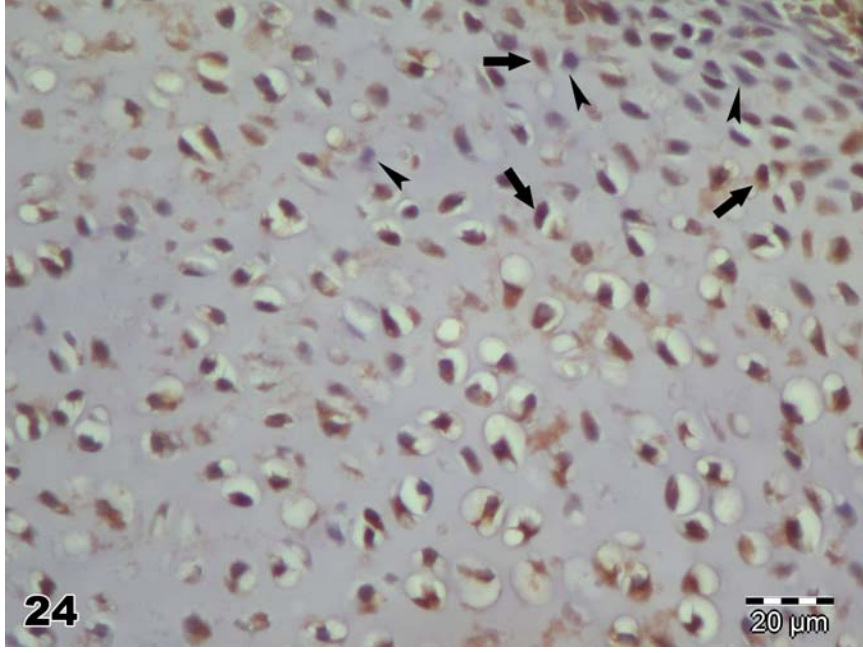
Resim 21. 6. grupta ikincil kemikleşme merkezindeki trabeküler kemik (asterisk) görünümü ve artiküler kıkırdaktaki kondrositlerde (+) IGF-1R β işaretlenmesi (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX600).



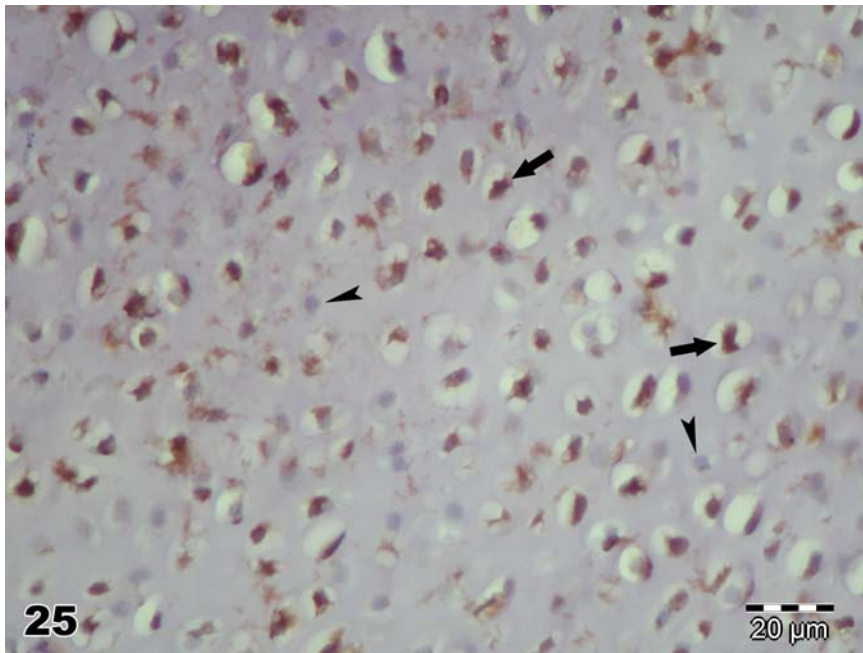
Resim 22. 6. grupta osteoblast (ok), ve osteositlerde (ok başı) belirgin IGF-1R β işaretlenmesi, (indirekt immunoperoksidazX1200).



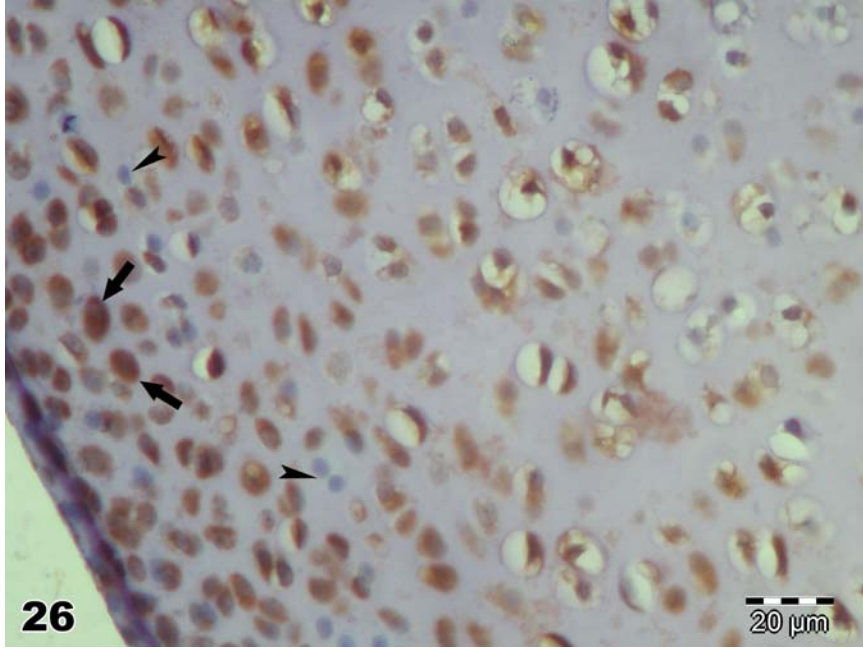
Resim 23. 7. grupta kemik trabekülalarındaki osteositlerde (ok), ve artiküler kıkırdağın kondrositlerinde (+) IGF-1R β işaretlenmesi (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX600).



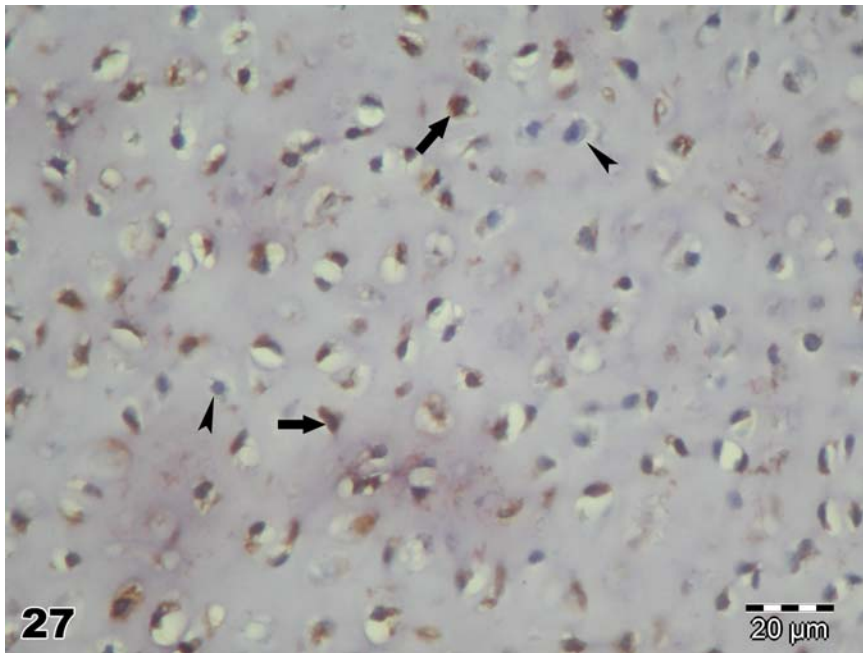
Resim 24. 1. grupta epifiz periferinde TGF- β R2 işaretlenmesi. TGF- β R2 (+) hücreler (ok) ve (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



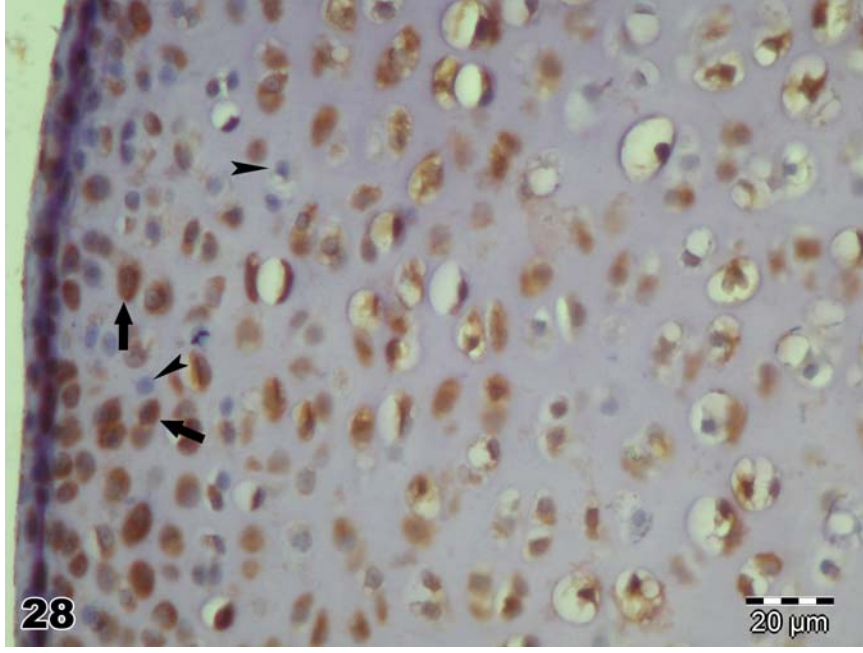
Resim 25. 1. grupta epifiz merkezinde TGF- β R2 işaretlenmesi. TGF- β R2 (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



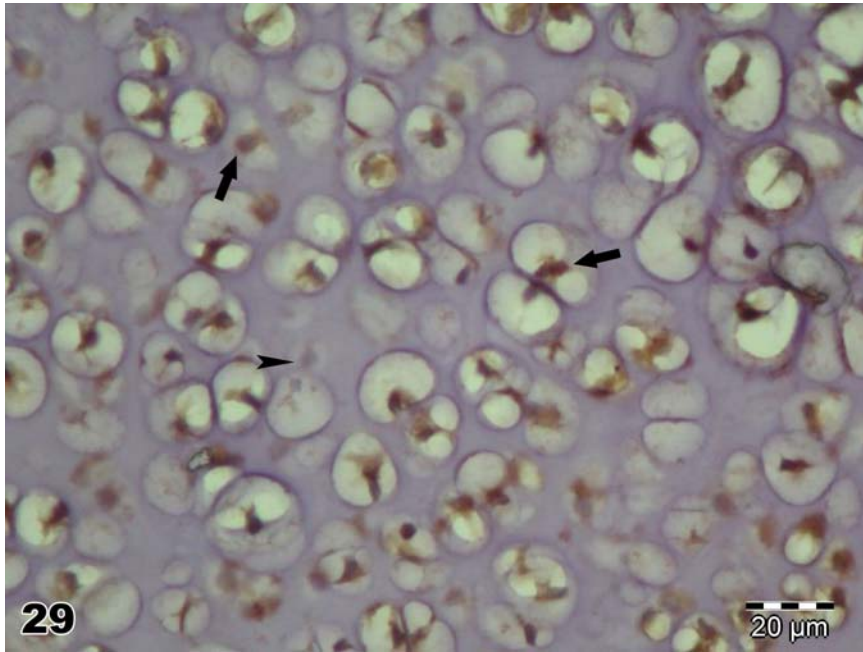
Resim 26. 2. grupta epifiz periferinde TGF- β R2 işaretlenmesi. TGF- β R2 (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



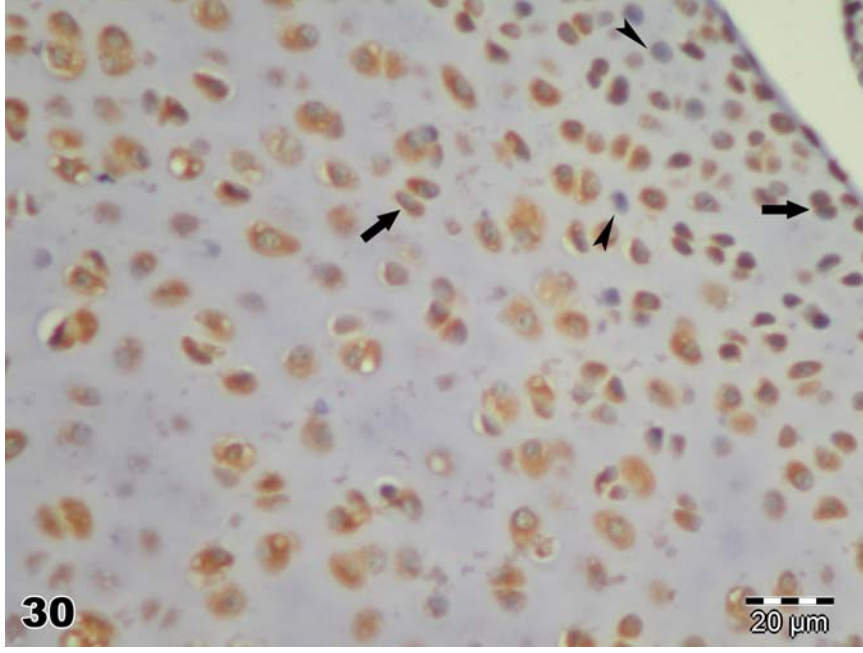
Resim 27. 2. grupta epifiz merkezinde TGF- β R2 işaretlenmesi. TGF- β R2 (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



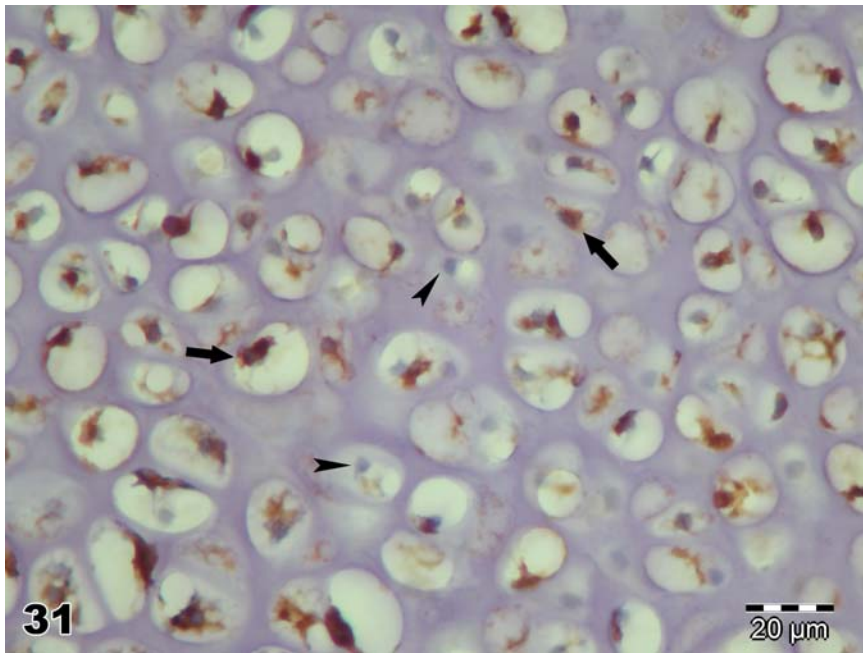
Resim 28. 3. grupta epifiz periferinde TGF- β R2 immunoreaktivitesi. TGF- β R2 antikoruna ile işaretlenen (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



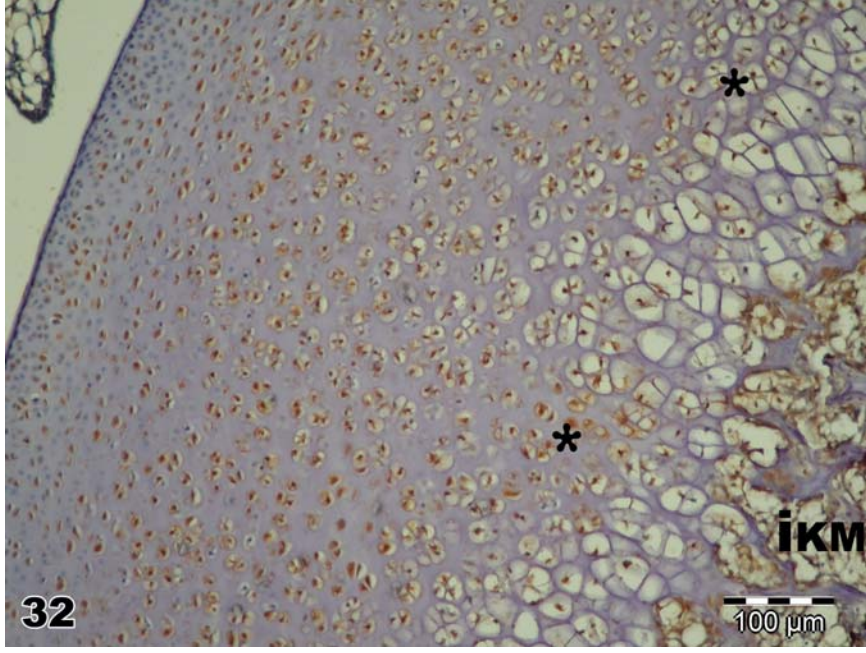
Resim 29. 3. grupta epifiz merkezinde TGF- β R2 immunoreaktivitesi. TGF- β R2 antikoruna ile işaretlenen (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



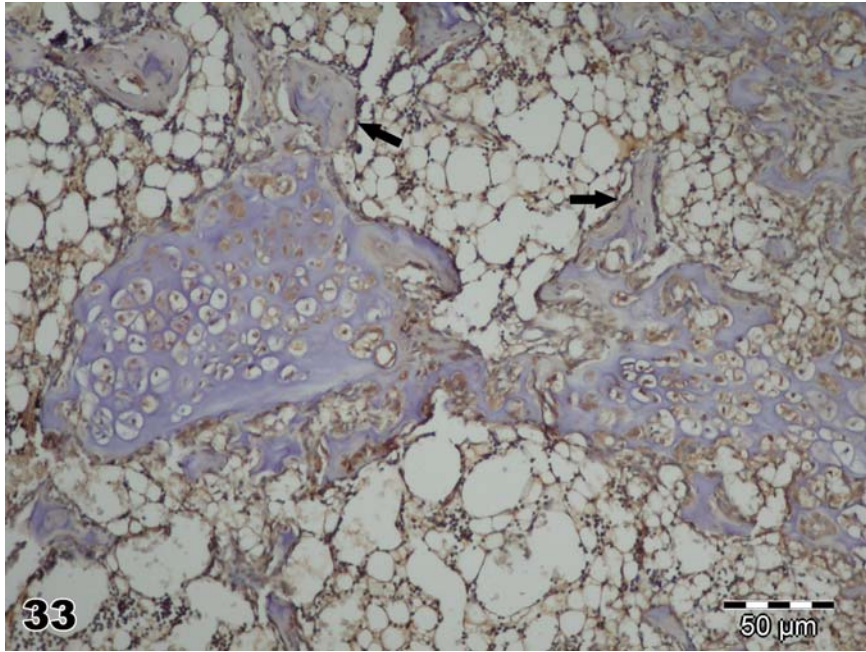
Resim 30. 4. grupta epifiz periferinde TGF- β R2 immunoreaktivitesi. TGF- β R2 (+) hücreler (ok) ve (-) hücreler, (indirekt immunoperoksidazX1200).



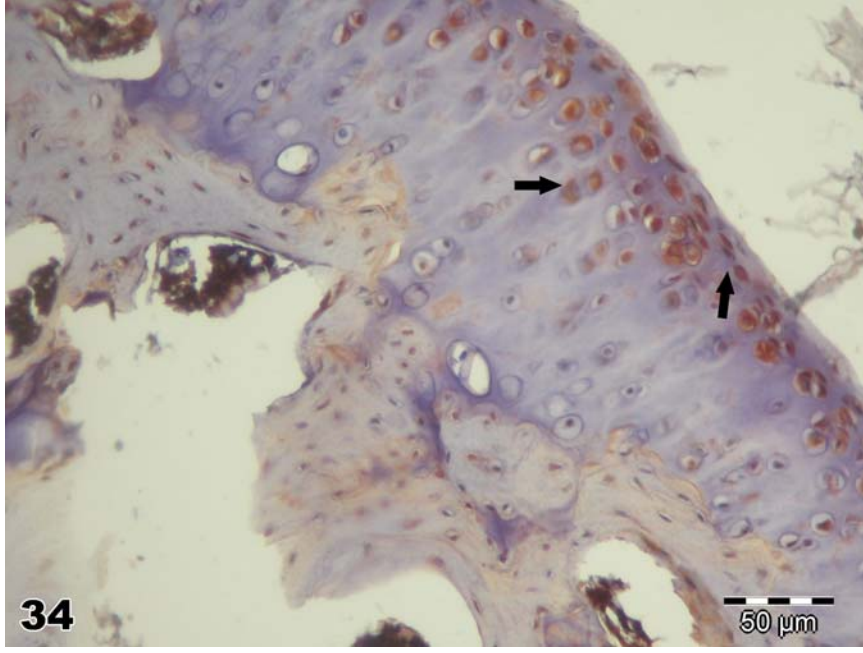
Resim 31. 4. grupta hipertrofik kondrositler. Epifiz merkezinde TGF- β R2 ile işaretlenmiş hipertrofik kondrositler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



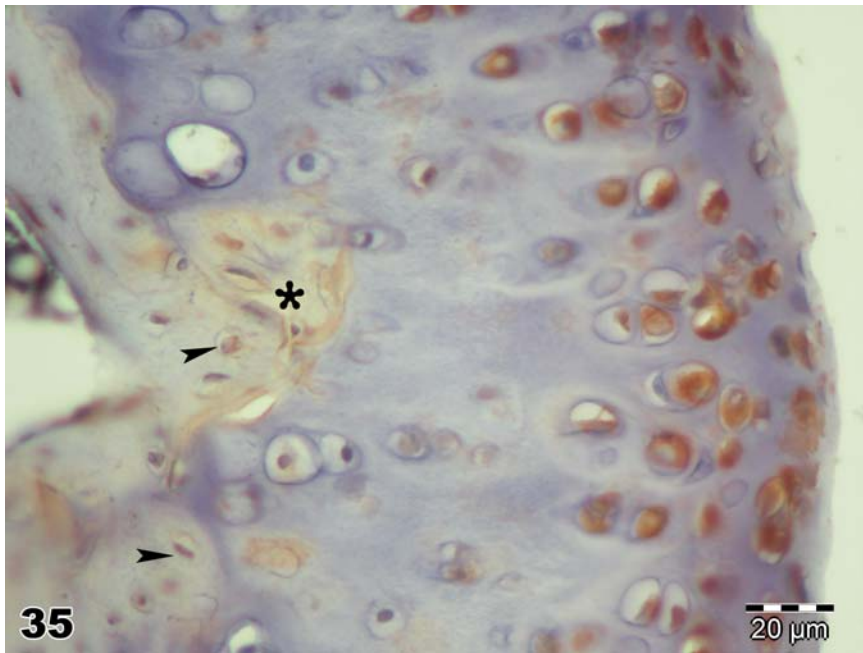
Resim 32. 5. grupta TGF- β R2 işaretlenmesi. İkincil kemikleşme merkezi (İKİM) çevresindeki kondrositlerin hemen hemen hepsinde TGF- β R2 ile (+) işaretlenme (asterisk), (indirekt immunoperoksidazX300).



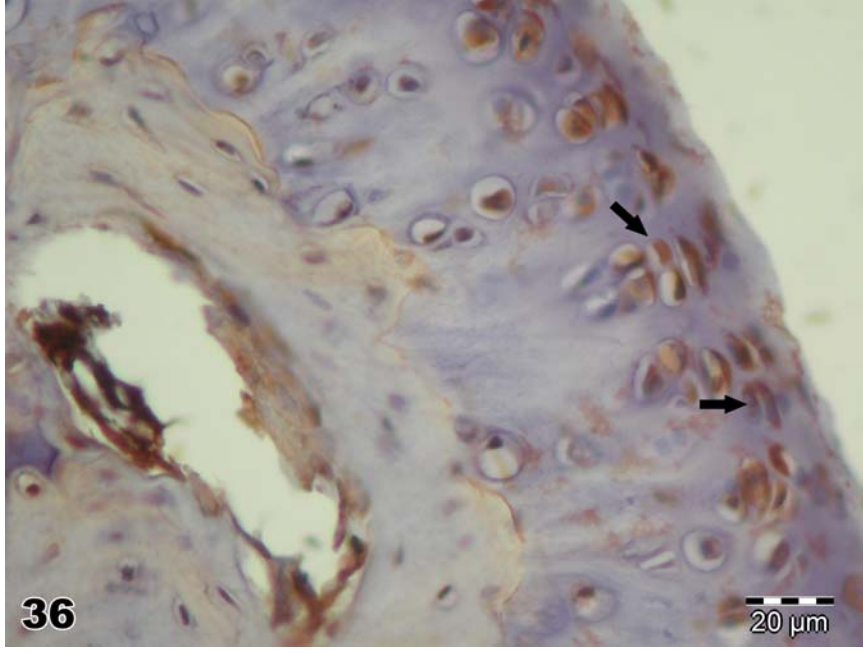
Resim 33. 5. grupta kemikleşme merkezi. İkincil kemikleşme merkezindeki immatür kemik spiküllerinde TGF- β R2 ile (+) işaretlenme (ok), (indirekt immunoperoksidazX600).



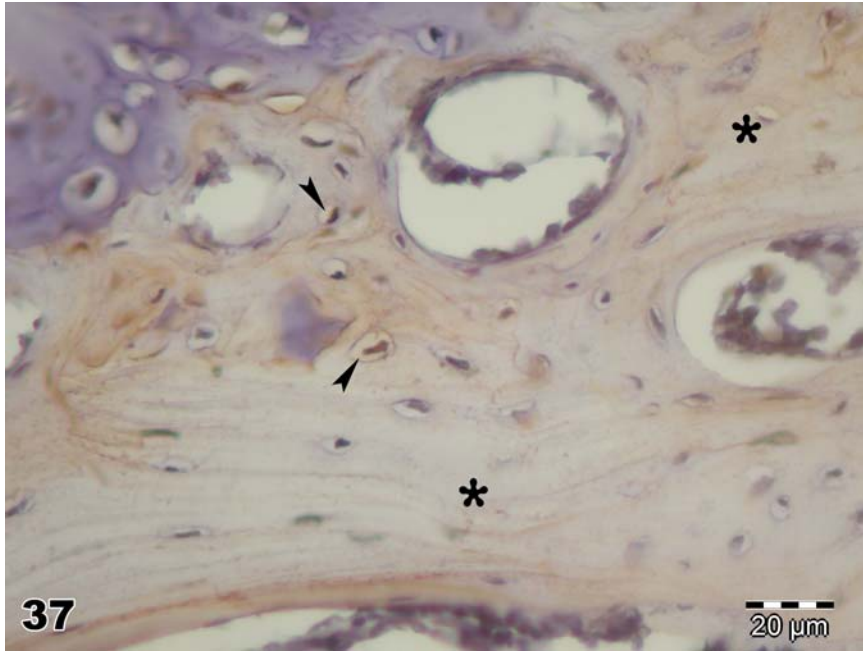
Resim 34. 6. grupta artiküler kıkırdaktaki kondrositlerde TGF- β R2 işaretlenmesi (ok), (indirekt immunoperoksidazX600).



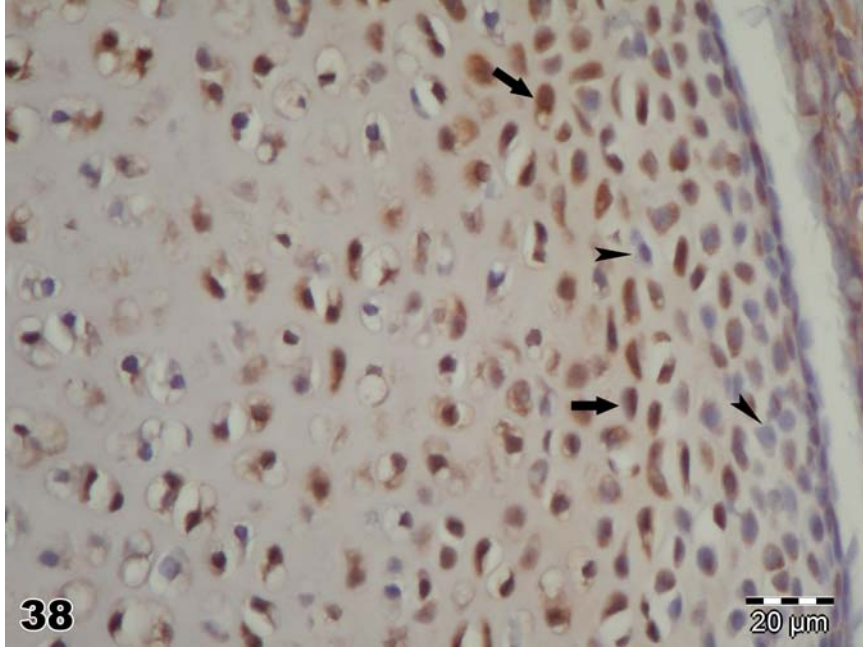
Resim 35. 6. grupta trabeküler kemikte TGF- β R2 işaretlenmesi. ikincil kemikleşme merkezindeki trabeküler kemik matriksinde TGF- β R2 işaretlenmesi (asterisk), kemik matriks içerisindeki osteositlerde (+) işaretlenme (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



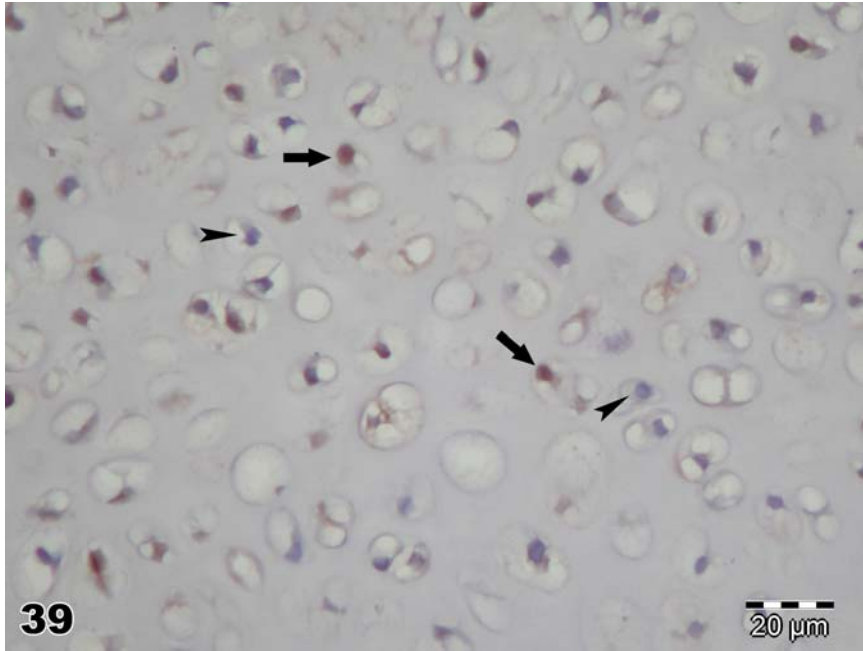
Resim 36. 7. grupta artiküler kıkırdakta TGF- β R2 işaretlenmesi. Artiküler kıkırdağın yüzeyel, ara tabakalarındaki kondrositlerde TGF- β R2 işaretlenmesi (ok), (indirekt immunoperoksidazX1200).



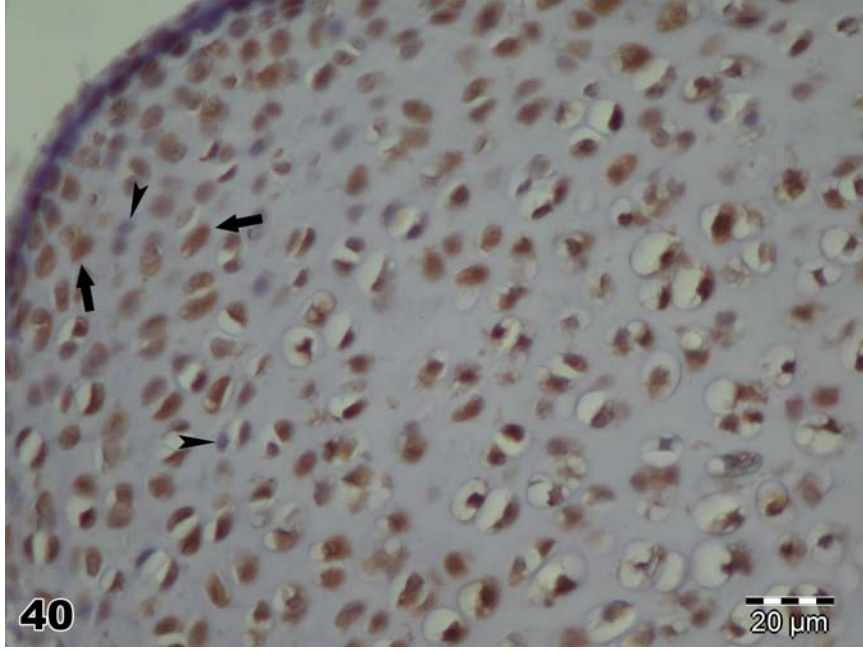
Resim 37. 7. grupta trabeküler kemikte TGF- β R2 işaretlenmesi. Kemik matriksinde (asteriks) ve kemik matriksindeki bazı osteositlerde (+) işaretlenme (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



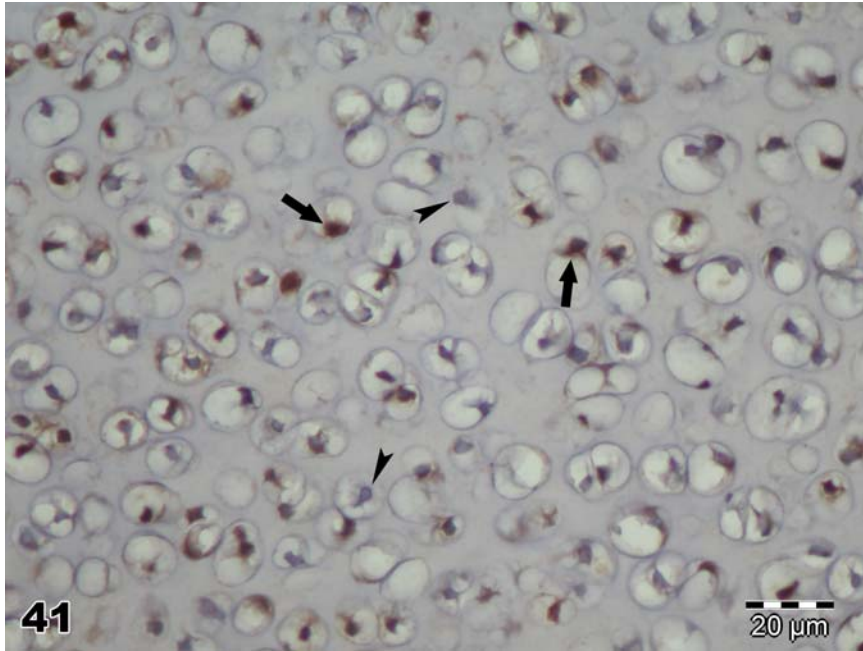
Resim 38. 1 grubun epifiz periferinde FGF-2 işaretleme. FGF-2 (+) hücreler (ok) ve (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



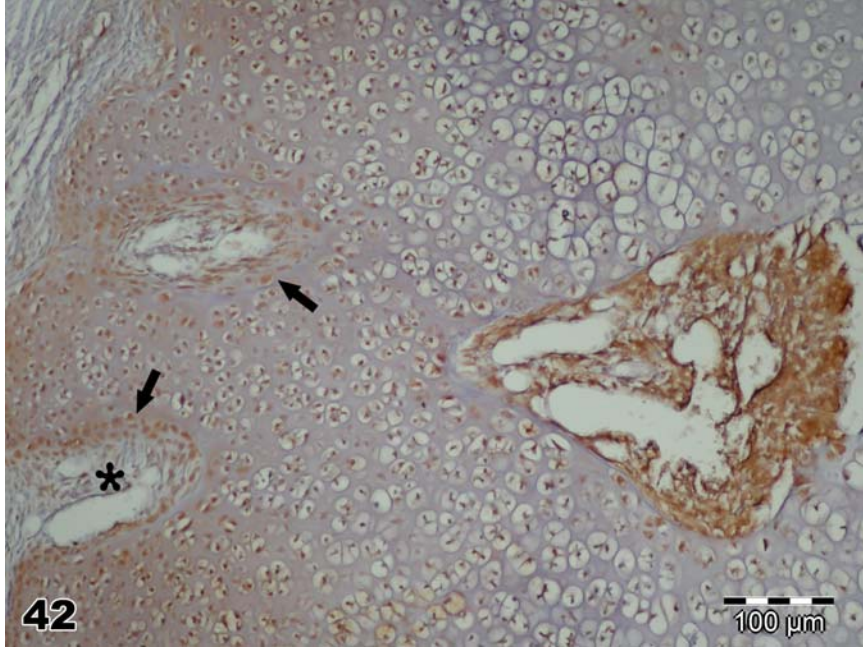
Resim 39. 1 grubun epifiz merkezinde FGF-2 işaretleme. FGF-2 (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



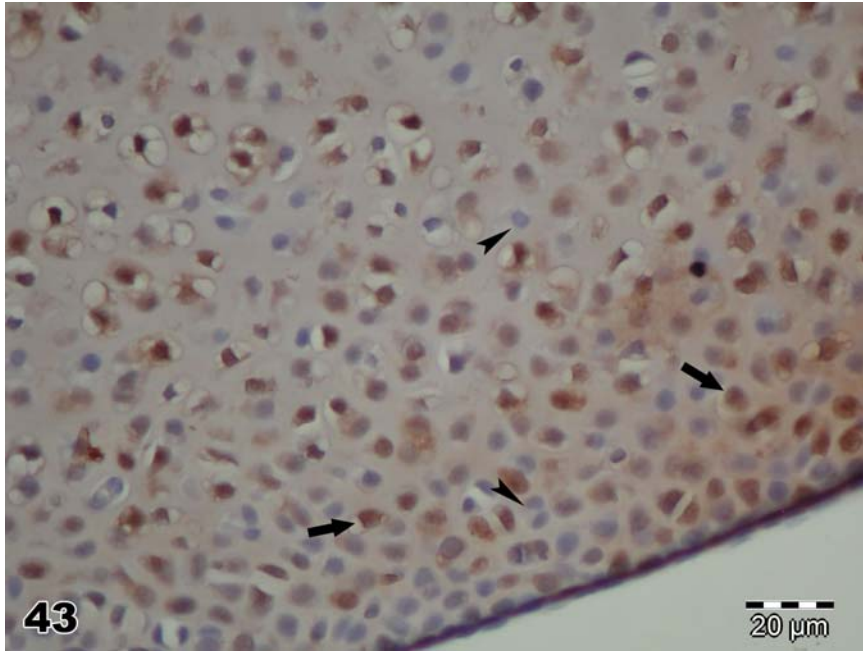
Resim 40. 2. grubun epifiz periferinde FGF-2 işaretleme. FGF-2 (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



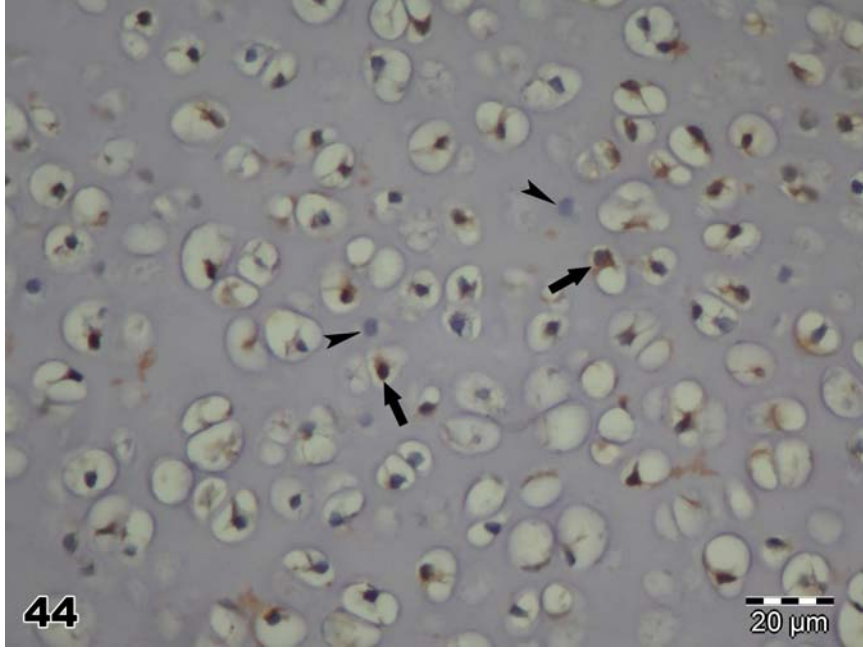
Resim 41. 2. grupta, epifiz merkezinde FGF-2 işaretleme. FGF-2 (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



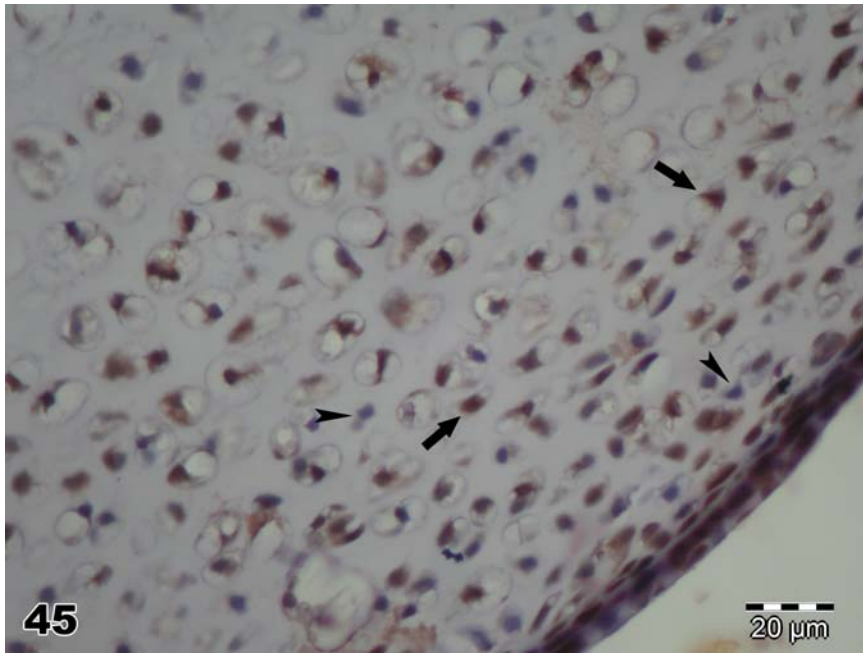
Resim 42. 3. grupta kanal oluşumu. Epifiz periferinden merkezine doğru kanal oluşumu (asterisk), damarlar çevresindeki kondrositlerde, FGF-2 ile (+) işaretlenme (ok), (indirekt immunoperoksidazX300).



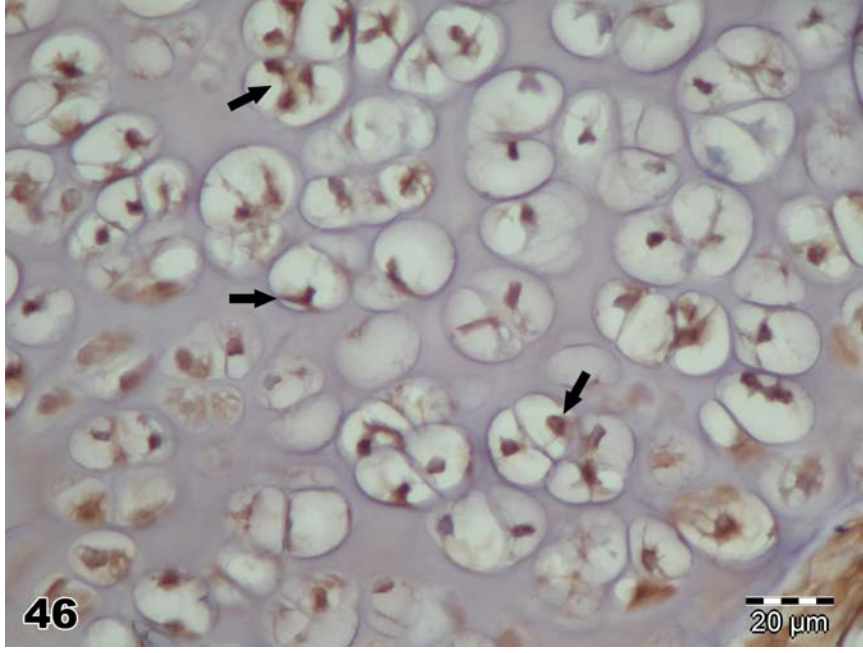
Resim 43. 3. grupta epifiz periferinde FGF-2 immunoreaktivitesi. FGF-2 (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



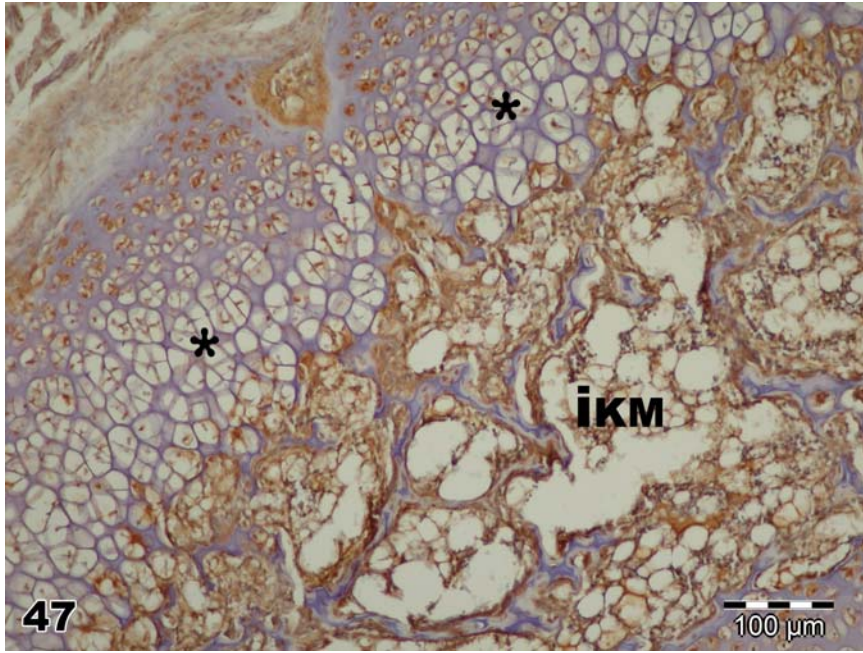
Resim 44. 3. grupta epifiz merkezinde FGF-2 immunoreaktivitesi. FGF-2 (+) hücreler (ok), (-) hücreler (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).



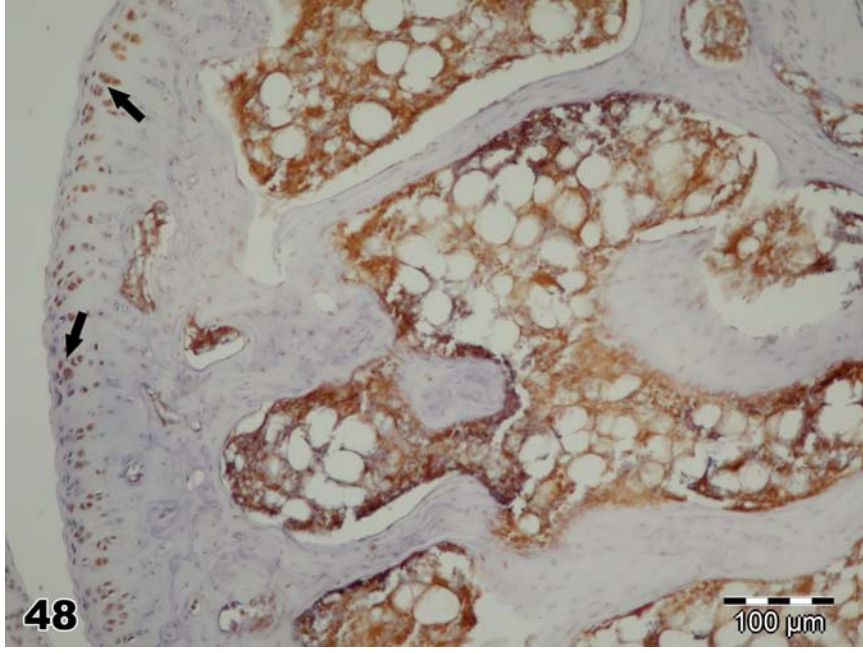
Resim 45. 4. grupta epifiz periferinde FGF-2 immunoreaktivitesi. FGF-2 (+) hücreler (ok) ve (-) hücreler, (indirekt immunoperoksidazX1200).



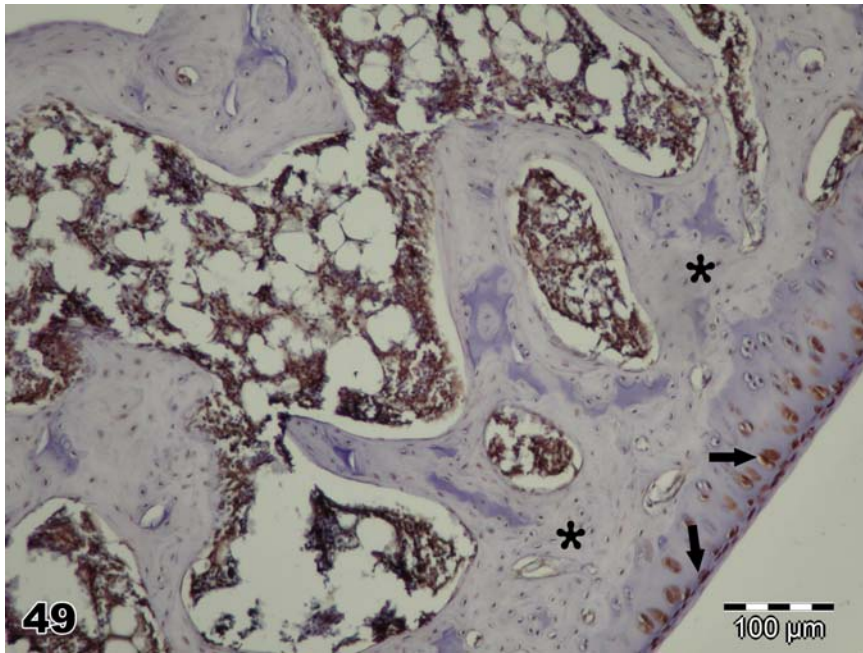
Resim 46. 4. grupta epifiz merkezinde FGF-2 (+) hipertrofik kondrositler (ok), (indirekt immunoperoksidazX1200).



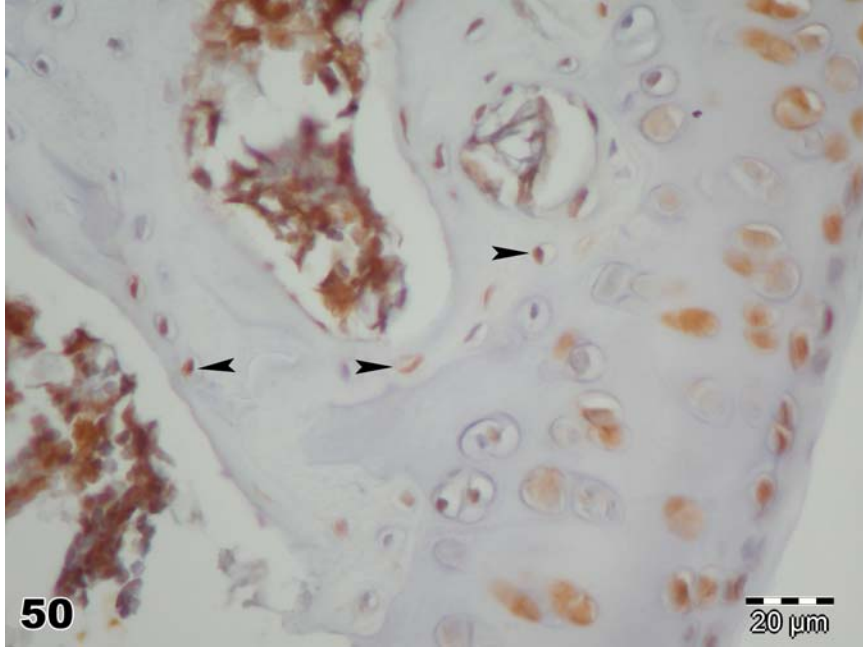
Resim 47. 5. grupta kemikleşme merkezi. Oluşan ikincil kemikleşme merkezi (İKМ) çevresindeki kondrositlerin çoğunda FGF-2 ile (+) işaretlenme (asterisk), (indirekt immunoperoksidazX300).



Resim 48. 6. grupta artiküler kıkırdaktaki kondrositlerde FGF-2 işaretlenmesi (ok), (indirekt immunoperoksidazX300).



Resim 49. 7. grupta kemikleşme merkezi ve artiküler kıkırdak. Matür kemik trabekülleri (asterisk), artiküler kıkırdağın yüzeyel, ara tabakalarındaki kondrositlerde FGF-2 işaretlenmesi (ok), (indirekt immunoperoksidazX300).



Resim 50. 7. grupta osteositlerde (+) FGF-2 işaretlenmesi. Trabeküler kemikte bazı osteositlerde (+) FGF-2 işaretlenmesi (ok başı), (indirekt immunoperoksidazX1200).

5. TARTIŞMA

Daha önce yapılmış çalışmalarda birincil büyüme plağında IGF, TGF- β ve FGF sisteminin endokondral kemikleşme ile kemik doku oluşumundaki etkinliği ve farklı evrelerdeki hücrelerde sentezlenmeleri araştırılmıştır. Ancak literatürde bu faktörlerin ve reseptörlerinin ikincil kemikleşme merkezinin oluşumunda rollerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda benzer olarak endokondral kemikleşme ile oluşan ikincil kemikleşme merkezinin oluşumunda bu faktörlerin ve reseptörlerinin etkinliği açıklanmaya çalışılmıştır.

İkincil kemikleşme merkezinin gelişmeye başlaması için ilk basamak epifiz yüzeyinden merkezine doğru kanalların oluşmasıdır. Bu kanallar, kan damarlarının ve osteoprogenitör hücrelerin oluşacak kemikleşme bölgesine gelmesini sağlar. Böylece bu alandaki osteoprogenitör hücrelerin sistemik ve lokal etkili birçok faktörün etkisiyle osteoblastlara farklanması, endokondral kemikleşme sürecinde kemik matriksin sentezlenmesine yol açar⁸.

Postnatal dönemde ikincil kemikleşme merkezinin gelişimi sırasında, farklı yaş evrelerindeki (yaşa göre) epifizlerde endokondral kemikleşme sürecine giren hücreler, bu faktörleri sentezlerken, aynı zamanda bu faktörlerden etkilenirler. Böylece uygun epifizyal büyüklüğün ve şeklin sağlanması ile fonksiyonel iskelet çatısı oluşur.

5.1. IGF-1R β

IGF-1R kondrositler, osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından sentezlenmektedir^{52,53}. Bilindiği gibi IGF'nin kendi reseptörleriyle etkileşimi hücrede birçok farklı süreci başlatır. Bu süreçler arasında, hücre çoğalması, farklanması, migrasyon, ekstrasellüler matriks sentezi, hücrenin apoptozisten korunması yer almaktadır⁴². IGF-1 ve IGF-2'nin hücresel düzeyde etkilerinin ortaya çıkmasına aracılık eden bu reseptörlerin delesyonu ağır gelişimsel defektlere neden olmaktadır⁴⁹.

Çalışmamızda farklı yaşlardaki sıçanların epifizlerinde, ikincil kemikleşme merkezinin oluşum sürecinde, IGF-1R β sentezi yapan kondrositlerin sayısında yaşa göre farklılık bulunmaktaydı. İkincil kemikleşmenin başlamadığı dönemlerde, 1. gün ve 4. gün grubunda IGF-1R β pozitif hücreler epifiz

periferinde yoğun olarak bulunurken, epifiz merkezine doğru IGF-1R β negatif hücrelerin IGF-1R β pozitif hücrelere göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Epifizin merkezi bölgesinde, ikincil kemikleşmenin oluşacağı alanda IGF-1R β pozitif hücreler 1. gün grubunda 28,00 \pm 6,11 iken, 4. gün grubunda 31,00 \pm 8,18' e yükselmişti, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,999). Bu nedenle bu günlerde endokondral kemikleşme sürecine girecek kondrositlerde, kemikleşmeyle ilgili olabilecek IGF-1R β sentezlenme fonksiyonlarının değişmediği saptanmıştır. Epifiz periferinde pozitif hücre yoğunluğunun fazla olmasında şu mekanizmaların etkili olabileceği düşünüldü; farklanmamış mezenşimal hücrelere komşu kondroblastlarda üretilen IGF-1R β IGF ligandını bağlayarak, mezenşimal hücrelerin kondrositlere farklanmasını artırıyor olabilir. Hücrelerde IGF-1R β 'nin bulunması, otokrin ve parakrin etkili olan IGF'ye karşı verilen hücreyel yanıtı artırarak, epifiz periferinden merkezine doğru ilerleyen hücrelerin çoğalmasını artırabilir. Epifiz merkezinde pozitif hücrelerin daha az görülmesi ise, ikincil kemikleşme merkezinin olacağı bölgede kıkırdak matriks üretimine gereksinim daha az olacağından, hücrelerin IGF-1R β 'nin sayısının azalmasıyla ilgili olabilir. Ayrıca bu bölgede olan kondrositlerin farklı üretim fazlarında olabileceği de düşünüldü.

4. günden sonra 7. gün grubunda (83,75 \pm 8,30, p=0,000) ve 10. gün grubunda (79,92 \pm 9,09, p=0,000) ikincil kemikleşme merkezinin oluşacağı alanda, IGF-1R β sentezi yapan kondrosit sayısında anlamlı bir artış vardı. Bu dönemlerde endokondral kemikleşmede önemli sinyallerin oluşmasını sağlayan hipertrofik kondrositlerin hemen hemen tümünde IGF-1R β sentezlendiği gözlemlendi.

Wang ve ark⁵⁹. IGF-1R gen ekspresyonunun mezenşimal kondensasyondan itibaren kondrositik seri hücrelerinde, kondrosit farklanması, çoğalması ve hipertrofisinde rol aldığını göstermişlerdir. Postnatal büyüme plağında IGF-1R'ün geniş oranda dağılım gösterdiğini ve tüm hücrelerde bulunduğunu gözlemişlerdir. IGF-1R mRNA düzeylerini ise proliferatif kondrositlerle karşılaştırıldığında erken hipertrofik kondrositlerde belirgin olarak yüksek saptamışlardır. Benzer olarak Wang ve ark¹⁵. IGF-1 knockout farelerde, büyüme plağında hipertrofik kondrositlerde %30 azalma ve kemiğin uzunlama büyümesinde %35 azalma saptamışlardır. IGF-1'in kondrositlerde glukoz,

aminoasit alımı ve kullanımı gibi insülin benzeri etki ile kondrosit hipertrofini değiştirdiğini ileri sürmüşlerdir. İnsülin reseptörüne fonksiyonel ve yapısal benzerlik gösteren IGF-1R'ünün, GLUT4'ün düzenlenmesi gibi anabolik etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Böylece hipertrofik kondrositlerde GLUT4 ve glikojen sentez enzimlerinde azalma nedeniyle bu hücrelerde glikojen depolanmasında azalma saptamışlardır.

Çalışmamızda kemikleşmenin oluşacağı alanda 7. günden sonra IGF-1R β sentezi yapan kondrositlerin artması, bu reseptörün kondrositlerdeki glikojen sentez enzimlerinin aktifleşmesinde ve glikojen depolanmasında etkili olarak hücre hipertrofinde rol alabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca bu reseptör sentezinin artmasının kemikleşme sürecinde gerekli olan damarlanma ve osteoprogenitör hücre çoğalması, farklanması için gerekli hücrel sinyallerin ortaya çıkmasında etkili olabileceği sonucunu düşündürmüştür. Bununla birlikte epifiz merkezine doğru ilerleyen kanallarda bulunan kemik öncül hücrelerinin çoğalması ve farklanması için gerekli olabilecek IGF'nin, hipertrofik kondrositlerin artan üretimi ile gerçekleşiyor olabileceği akla gelmektedir.

21. gün grubunda ikincil kemikleşme merkezinin çevresindeki tüm hipertrofik kondrositlerin pozitif boyanması ile devam eden endokondral kemikleşme sürecinde, hücrelerde bulunan IGF-1R β 'nin gerekli olabileceği sonucuna varıldı. Hücrelerde sentezlenen IGF-1R β 'nin otokrin ve parakrin etki gösterecek IGF sentezini artırırken, IGF'nin hücrel etkilerinin ortaya çıkmasını sağlayabilir. Kemikleşme merkezindeki kemik öncül hücrelerinde yoğun boyanmanın olması, bu hücrelerin çoğalması ve osteoblastlara farklanmasında IGF-1R β 'nin etkili olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca kemik matriksini üreten osteoblastlarda da bulunan bu reseptörler, osteoblastlarda kemik matriks üretimini artırabilir ve osteoblast çoğalmasında etkili olabilir. Nitekim Zhang ve ark⁶⁰. IGF-1R knockout yapılmış farelerde, osteoblastların matriks üretiminde ve mineralizasyonundaki yetersizlik nedeniyle osteoid maturasyon periyodunun normal farelere göre 3 kat fazla uzadığını saptamışlar ve osteoblastların yeterli miktarda fosfat alımını gerçekleştirmesi için IGF sisteminin gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Rubin ve ark⁶². osteoklast farklanması ve fonksiyonlarının gerçekleşmesinde IGF-1R'nin rol aldığını ileri sürmüşlerdir. Sonuç olarak bu dönemlerde devam eden kemikleşme sürecinde, hücrel sinyallerin oluşması, kondroblast ve osteoklastların rezorpsiyon işlevlerinin meydana gelmesi,

osteoblastlarının kemik matriks sentezinin yapılması gerekmektedir. Bu fonksiyonların meydana gelebilmesi, IGF yolağının işleyebilmesine ve dolayısıyla bu hücrelerden sentezlenen IGF-1R β aktivitesiyle olan ilişkisine bağlı olduğunu düşündürmektedir.

50. gün ve 100. gün gruplarında hemen hemen tamamlanmış ikincil kemikleşme merkezinde, trabeküler kemik çevresindeki osteoblastlarda gözlenen IGF-1R β pozitifliği, bu reseptörün devam eden kemik metabolizmasında gerekli olduğunu işaret etmektedir. Osteoblastlardan sentezlenen IGF-1R β , ortamda bulunan IGF'nin hücrel etkinliğinin devam etmesini ve matür kemik matriks yapımını düzenliyor olabilir. Kemik matriks içine gömülmüş osteositlerde de pozitif boyanmanın olması, bu hücrelerin aktivitelerine bağlı olarak az da olsa kemik matriks üretimine devam ettiğini akla getirmektedir. Bazı osteositlerde boyanmanın olmaması ise, bu hücrelerin farklı metabolik fazlarda olduğunu, sentez aktivitelerini azalttığı veya durdurduğunu düşündürmektedir.

Artiküler kıkırdığın yüzeysel ve ara tabakalardaki kondrositlerde bu reseptörlerin varlığı, kondrosit fonksiyonunda ve kıkırdak matriks yapımındaki devamlılığın sağlanmasında da kondrositler tarafından sentezlenen bu reseptörlerin görev aldığı gözden uzak tutulmamalıdır.

5.2. TGF- β R2

TGF- β ailesi birçok hücrede çoğalma, farklılaşma, apoptozis, ekstrasellüler matriks üretiminin düzenlenmesinde rol almasının yanı sıra organogenezde de etkilidir^{76,77}. Bu proteinler mezenşimal hücre migrasyonunu, çoğalmalarını düzenlemekle birlikte bu hücrelerin yeni kemik dokusu oluşumu için farklılaşmasında rol oynamaktadır¹¹⁶. Bu faktörler inaktif kompleksler olarak sentezlenirler, bu nedenle hücrel sinyallerin iletilebilmesi ve hücrel etkilerin ortaya çıkabilmesi, vücutta yaygın olarak dağılan tip 1 ve tip 2 serin/treonin kinaz reseptörleri ile etkileşimlerine bağlıdır¹¹⁷.

Delatte ve ark¹¹⁸. neonatal sıçanlarda mandibular kondil ve femur başındaki kondroprogenitör hücrelerde TGF- β R2 ekspresyonunun olduğunu ve daha alt bölgelerde bulunan kondrositlerde ise ekspresyonun azaldığını göstermişlerdir. Bu reseptörün hücrel çoğalma ve kondrosit farklılaşmasının düzenlenmesinde rol alabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmayla uyumlu

olarak çalışmamızda da 1. gün ve 4. gün grubunda sıçan epifizlerinin periferindeki kondrositlerde gözlenen TGF- β R2 immunoreaktivitesinin, epifizlerin merkezinde bulunan kondrositlerdeki TGF- β R2 immunoreaktivitesinden daha yoğun olduğu saptanmıştır. Bu sonuçla epifizlerin periferlerindeki kondroprogenitör hücrelerin farklanması ve farklı hücrelerin kırıldak matris üretebilmesinin, bu reseptörün varlığına bağlı olduğu kanısına varılmıştır.

Epifizlerin merkezinde bulunan kondrositlerdeki TGF- β R2 ekspresyonunun olmaması veya belirlenemeyecek miktarda az olması, bu bölgede kondrosit çoğalması ve kırıldak matris üretiminin azalması yönündeki sinyallerle ilgili olabilir. Nitekim Rosado ve ark⁸⁶. kondrositlerde TGF- β R2 blokajı yaparak, bu hücrelerin ekstrasellüler matrisde bulunan proteoglikanları sentezleme fonksiyonunun azaldığını saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda epifizlerin merkezi bölgesinde, ikincil kemikleşmenin oluşacağı alanda TGF- β R2 pozitif hücreler 1. gün grubunda $32,08 \pm 9,00$ iken, 4. gün grubunda $35,20 \pm 3,78$ ' e yükselmişti, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,999$). Bu dönemlerde kondrositlerin çoğunda TGF- β R2 ekspresyonunun olmaması, bize bu bölgedeki kondrositlerin çoğalmasında yavaşlama veya baskılanmanın olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca bu bölgede kırıldak matris üretiminin ve kırıldak matrisde bulunan proteoglikan miktarının azalması ile ikincil kemikleşmenin oluşacağı bölgede endokondral kemikleşme sinyallerinin hazırlığının yapılmaya başlandığını düşündük.

7. gün grubunda ($66,80 \pm 18,07$) ikincil kemikleşmenin oluşacağı bölgede 1. gün ve 4. gün grubuna göre anlamlı bir artış (sırasıyla, $p=0,000$ ve $p=0,000$) vardı. 7. günde TGF- β R2 ekspresyonu yapan kondrositlerin sayısının artması, bu dönemde kondrositlerin olgunlaşmasında ve hipertrofik sürece girişinde TGF- β 'nin bu reseptör aracılığıyla etkili olduğunu düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda kondrosit olgunlaşması süresince TGF- β R2 ekspresyonunun devam ettiği ve mitojenik uyarıları azaltarak hücrelerin hipertrofiye olmasında rol aldığı ileri sürülmüştür¹¹. Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular bunu destekler niteliktedir. 7. günde TGF- β R2 ekspresyonu yapan kondrosit sayısındaki artış, bize TGF- β R2'nin kondrositlerin olgunlaşma

ve hipertrofi sürecine girişini başlatarak endokondral kemikleşme sinyallerinin başlattığını akla getirmektedir.

Kabasawa ve ark⁸³. tarafından sıçan epifiz plağında, çoğalan kondrosit tabakasının alt kısımlarında, olgunlaşma ve hipertrofik kondrosit tabakalarında bulunan kondrositlerde TGF- β 2'nin sentezlendiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada kondrositlerin TGF- β sentezlediği ve bunun kıkırdak matrikste depolandığı bildirilmiştir. Depolanan TGF- β 'nin endokondral ossifikasyon süresince TGF- β 2 aracılığıyla çoğalan kondrosit kısmında matriks üretimini, kondrositlerin olgun kondrosit ve hipertrofik kondrosite fonksiyonel farklanmasını düzenlediği ileri sürülmüştür.

Çalışmamızda 10. gün grubunda, TGF- β 2 ekspresyonu yapan kondrositlerin sayısında (82,40 \pm 8,24) 1. gün, 4. gün ve 7. gün grubuna göre anlamlı bir artış (sırasıyla p=0,000, p=0,000 ve p=0,020) saptanmıştır. 7. günden sonra ikincil kemikleşmenin oluşacağı bölgede TGF- β 2 immunoreaktivitesinin yoğun olarak hipertrofik kondrositlerde görülmesi ve 10. günde TGF- β 2 immunoreaktivitesi olan hipertrofik kondrositlerin artması, bu reseptörün ve ligandının 7. günden sonra kemikleşmede daha etkin rol aldığını düşündürmüştür.

Hipertrofik kondrositlerle, kemikleşmeden sorumlu hücreler arasındaki iletişim, geç dönemdeki hipertrofik kondrositlerin apoptozise girmesiyle bu hücrelerden mikroçevreye salınan faktörlerle ilgili olabilir. Gibson ve ark¹¹⁹. tarafından hücre kültürü ortamında hipertrofik kondrositlerin apoptozisiyle TGF- β 'nin sekresyonunun ve aktivasyonunun arttığını bildirmişlerdir. Anderson ve ark¹²⁰. apoptotik cisimlerin kıkırdak matriksin kalsifikasyonunun nükleasyonunda belirgin olarak rol oynadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmayla uyumlu olarak Gibson ve ark¹¹⁹. kondrosit apoptozisi ile TGF- β ve diğer faktörlerin aktive olduğunu ve kalsifikasyonda rol alan matriks veziküllerine morfolojik olarak benzer veziküllerin oluştuğunu ileri sürmüşlerdir.

Kemikleşmenin ilk sinyalleri bu dönemlerde hipertrofik kondrositlerin apoptozisi ile başlarken, diğer önemli bir değişiklik o bölgede artan vasküler invazyondur. Dangelo ve ark¹²¹. yaptıkları in vivo ve in vitro çalışmalar ile TGF- β 'nin endotelial hücrelerin migrasyonunu artıran angiogenik bir faktör olarak rol aldığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 7. günden sonra hipertrofik

kondrositlerde TGF- β R2 immunoreaktivitesinin giderek arttığı saptanmıştır. Bununla ilgili olarak; TGF- β 'nın, TGF- β R2 aracılığıyla hücreleri apoptozise yönlendirdiğini ve hücrelerin apoptozisi sonucunda, o bölgede vasküler invazyon alanının genişlemesinde rol alan faktörlerin ortama salındığını düşündürmüştür.

Horner ve ark⁸⁴. endokondral ve intramembranöz kemikleşme bölgelerinde TGF- β izoformlarını ve reseptörlerini göstermişlerdir. Neonatal kaburgada endokondral kemikleşme alanında, dinlenme, çoğalma, hipertrofi ve mineralizasyon zonundaki kondrositlerde TGF- β R2 ekspresyonu saptamışlardır. Oluşan osteofitlerde ise dinlenme, çoğalma ve hipertrofi zonundaki kondrositlerin TGF- β R2 eksprese ettiklerini göstermişlerdir. Böylece bu faktörlerin ve reseptörlerinin in vivo olarak kemik gelişimi süresince endokondral ve intramembranöz kemikleşmenin düzenlenmesinde yer aldıklarını ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda 21. günde epifizlerin merkezi bölgesindeki damarlanma bölgesinin çok belirgin olarak genişlediği gözlenmiştir. Buna ek olarak Horner ve ark⁸⁴.'nın çalışmasıyla uyumlu olarak ikincil kemikleşme bölgesindeki endokondral kemikleşmede, kondrositlerin çoğalma ve farklanma süresince yoğun olarak TGF- β R2 immunorektivitesi gösterdiği saptanmıştır. Kemikleşmenin başladığı sınırdaki hipertrofik kondrositlerde belirgin TGF- β R2 ekspresyonu vardı. Ayrıca bu bölgeye gelen osteoprogenitör hücrelerde, yeni oluşan immatür kemik doku çevresindeki ostoblastlarda ve immatür kemik doku içerisindeki osteositlerde yoğun olarak TGF- β R2 immunoreaktivitesi gözlemlendi.

Kabasawa ve ark⁸³. kemik doku gelişiminde, TGF- β 'nın kondrositleri ve preosteoblastları etkilediği, ekstrasellüler matris üretimi ve hücrelerel farklanmayı bu hücrelerdeki reseptörleri ile etkileşerek meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak endokondral kemikleşme sürecinde rol alacak kondrositlerde TGF- β R2 ekspresyonunun artması ile hücrelerel çoğalma, olgunlaşma ve hipertrofinin düzenlendiği söylenebilir. 21. günde kemikleşme bölgesinin genişlemesi için gerekli faktörlerin mikroçevrede artması, bu reseptörün etkinliğiyle ilişkili olabilir. Ayrıca bu bölgeye gelen osteoprogenitör hücrelerin çoğalması için gerekli sinyallerin salınması bu reseptörle bağlantılı

olabilir. Böylece osteoprogenitör hücrelerden dinamik kemik dokuyu yapılandıracak hücrelerin oluşması ve bu hücrelerin fonksiyonel etkinliği için gerekli olan TGF- β 'nın sinyal iletimini düzenliyor olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda 50. ve 100. gün gruplarında ikincil kemikleşme merkezindeki aktif endokondral kemikleşmenin sonlandığı gözlenmiştir. Kemik trabekülleri çevresindeki osteoblastlarda, kemik matrikste ve kemik matriks içine gömülmüş birçok osteositte TGF- β R2 immunoreaktivitesi saptanmıştır.

Atti ve ark¹²². çalışmalarında TGF- β 1'in osteoblastların kollajen sentez fonksiyonunu, sentezlenen kollajenin matürasyonunu etkilediğini ve oluşan immatür kemik matriksin mineralizasyonunda rol aldığını saptamışlardır. Böylece bu faktörün matür kemik yapısının gelişimini, ikincil kemikleşme merkezini ve kortikal kemik oluşumunu etkilediğini göstermişlerdir. Ancak bu süreçte bu faktörün hücrel etkinliğinin ortaya çıkmasında rol alan reseptörlerin işlevi açıklanamamıştır.

Bizim çalışmamızda 50. ve 100. günde ikincil kemikleşme merkezinde matür kemik yapısının oluştuğu gözlenmiştir. Bu dönemlerde matür kemik yapısı oluşmasına rağmen, bu yapıdaki dinamik metabolik olayların devamı için TGF- β 'nın gerekli olduğu düşünülmüştür. Gerçekten de osteoblastlardan ve osteositlerden TGF- β R2'nin eksprese olması, bu faktörün etkinliğinin bu dönemlerde de devam ettiğinin kanıtıdır. Nitekim Filvaroff ve ark¹²³. TGF- β R2'nin sitoplazmik kısmı kısaltılmış transjenik farelerde, TGF- β 'ya verilen osteoblastik yanıtın azaldığını, buna bağlı olarak kemik matrikste osteosit dansitesinin azalarak trabeküler kemik volümünün azaldığını saptamışlardır.

Osteoblastlardan ve osteositlerden TGF- β R2 eksprese edilmemesi, bu hücrelerin yaşamsal aktivitelerini azaltarak apoptozis sürecine yönlenmesinde veya TGF- β R2 ekspresyonu ile apoptozis sürecine girmeden metabolik faaliyetlerini sürdürerek, kemik dokunun devamının sağlanmasında etkili olabileceği düşünülmüştür. Osteoblastların apoptozise girmesi, osteosite dönüşmesi veya kemik sınırlayan hücreler olarak kalmasında sistemik hormonlar ve lokal büyüme faktörlerinin etkisi olduğu bilinmektedir¹²⁴. Bununla ilişkili olarak osteoblastlarda apoptozisin TGF- β 1 tarafından bloke edildiği ve bu osteoblastların osteosite dönüştüğünü ileri süren çalışmalar bulunmaktadır^{125,126}.

Bizim çalışmamızda TGF- β R2 sentezleyen osteositlerin, hücrel aktivitesinin devamı ve anti apoptotik etki için mikroçevrede bulunan TGF- β 'yı kullandığı, TGF- β R2 sentezlemeyen osteositlerin ise farklı metabolik fazda olabileceği veya apoptotik sürece yönlendiği kanısına varılmıştır. Kemik matriksteki TGF- β R2 pozitif immun işaretlenmesinin ise, apoptozise girmiş osteosit ve osteoblastlardan ortama dağılan hücrel artıklardaki TGF- β R2 nedeniyle olabileceğini düşünölmüştür.

Artiköler kıkırdakta yüzeyel ve ara tabakalardaki kondrositlerde TGF- β R2 ekspresyonunun olması, bu hücrelerin fonksiyonun devamında TGF- β 'nın etkili olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca kondrositler tarafından proteoglikan sentezinin devam etmesi, üretilen ekstrasellöler matriks içeriğinde değişikliğin oluşmamasında ve fonksiyonel bir artiköler kıkırdak devamında bu reseptör ligand ilişkisinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

5.3. IGF-1R β ve TGF- β R2

Epifizlerde ikincil kemikleşme merkezinin oluşacağı bölgede, günlere göre IGF-1R β ekspresyonu yapan kondrosit sayısı ile TGF- β R2 ekspresyonu yapan kondrosit sayısı birbiriyle karşılaştırılmıştır.

1. günde IGF-1R β immun pozitif kondrosit sayısı 28,00 \pm 6,11 iken TGF- β R2 immun pozitif kondrosit sayısı 32,08 \pm 9,00 olarak hesaplanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,997). 4. günde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. IGF-1R β ekspresyonu yapan kondrosit sayısı 31,00 \pm 8,18 iken TGF- β R2 ekspresyonu yapan kondrosit sayısı 35,20 \pm 3,78 olarak hesaplanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (p=0,994).

Çalışmamızda bu iki evrede, her iki reseptörün kondrositlerin matürasyonu ve kıkırdak matriks üretimiyle ilgili olarak, kondrositler tarafından eksprese edildiği saptanmıştır. Bu sonuç Delatte ve ark.'nın¹¹⁷. 4 günlük sıçanların femur epifizinde, her iki reseptörün benzer dağılım gösterdiği ve epifiz merkezindeki kondrositlerin bu reseptörleri daha az eksprese ettiğini bildirdikleri çalışma ile uyumluluk göstermektedir.

1. ve 4. günde endokondral kemikleşme ile ilgili sinyallerin henüz başlamadığı, ancak kemikleşmenin oluşacağı bölgede kondrosit aktivitesinin

sürdürülebilmesi için her iki reseptörün ekspresyonunun gerekli olduğu varsayılabilir. Bu reseptörlerin ekspresyonu ile mikroçevrede bulunan faktörlerin, kondrositlerdeki hücresel ve moleküler mekanizmaları karşılıklı etkileyebileceği düşünülmüştür. Bununla ilgili olarak reseptör düzeyinde bu etkileşimi gösteren çalışma bulunmamaktadır. Ancak Indrawattana ark¹²⁷.'nın yaptığı çalışmada, hücre kültürü ortamında mezenşimal hücrelerin kondrositik farklanmasında TGF- β 3'ün tek başına etkili olmadığını gözlemişlerdir. Mezenşimal hücrelerin bulunduğu ortama IGF-1 eklenmesi ile TGF- β 3 kondrojenik farklanma ve hücre maturasyonu üzerindeki etkinin arttığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda 7. günde IGF-1R β eksprese eden kondrosit sayısı $83,75 \pm 8,30$ iken TGF- β R2 eksprese eden kondrosit sayısı $66,80 \pm 18,07$ olarak hesaplanmıştır. İki grup karşılaştırıldığında, IGF-1R β ile işaretlenen hücre ortalaması anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,008$). Kemik dokunun oluşması, büyümesi ve yeniden şekillenmesi, ortamda bulunan hormonlar ve büyüme faktörlerinin, osteoprogenitör hücrelerin çoğalması ve farklanmasını düzenlemesiyle oluşmaktadır. Çalışmamızda 7. günde her iki reseptörü eksprese eden kondrositlerin sayısının daha önceki dönemlere göre artmış olduğu saptanmıştır. Bu artış, kondrositlerin maturasyonu ve hipertrofik sürece giren kondrositlerin endokondral kemikleşme sinyallerini başlatmasında, TGF- β ve IGF sistemine olan gereksiniminin artması ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür.

Kveiborg ve ark¹²⁸. insan kemik iliğinde bulunan stromal osteoblast prekürsör hücrelerinde, TGF- β 1'in varlığının, sentezlenen IGF-1 mRNA miktarını 8,5 kat artırdığını gözlemişlerdir. Perisellüler çevrede TGF- β 1'in IGF sisteminin uyarıcı komponentinde artışı etkileyerek, İn vivo ve in vitro ortamda osteoblast prekürsör hücrelerin çoğalmasını uyardığını ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda IGF-1R β eksprese eden hücrelerin, TGF- β R2 eksprese eden hücelere oranla daha fazla sayıda olması, bu dönemde IGF sisteminin daha aktif olmasıyla ilişkili olabilir. Ancak endokondral kemikleşme için gerekli olan damarlanmada ve osteoprogenitör hücrelerin sağlanmasında IGF ve IGF-1R β ilişkisinin TGF- β ve TGF- β R2 ekspresyonuyla düzenlendiği veya artırıldığı düşünülmüştür.

10. günde IGF-1R β ve TGF- β R2 eksprese eden kondrosit sayıları (sırasıyla 79,92 \pm 9,09 ve 82,40 \pm 8,24) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,997). Bu dönemde her iki reseptörün de endokondral kemikleşme alanının genişlemesi, osteoprogenitör hücrelerin kemikleşme bölgesinde çoğalması ve osteoblasta farklanmasında, kemik matriks üretiminin artmasında etkili olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca bu dönemde kemikleşme bölgesindeki kondrositlerin hipertrofik sürece yönlendirilmesinde ve hipertrofik kondrositlerde apoptozis mekanizmalarının aktifleşmesinde TGF- β ve IGF yollarının birbirlerini düzenleyerek etkili olduğu akla yakın bir olasılıktır. Buna ek olarak kemikleşme sürecinin bu döneminde her iki reseptörün benzer oranlarda eksprese olması, her iki faktörün benzer oranlarda mikroçevrede bulunduğu kanıtı olarak kabul edilebilir.

21., 50. ve 100. günde de her iki reseptörün benzer şekilde dağılım göstermesi, endokondral kemikleşmenin devamı ve matür kemik yapısının oluşmasında her iki faktörün ve reseptörünün gerekli olduğunu akla getirmektedir. Ayrıca bu faktörlerin hücreler üzerindeki etkilerinde birbirleri üzerine aditif etki gösterdiğini de düşündürmektedir.

Artiküler kıkırdakta, IGF-1R β ve TGF- β R2 ekspresyonu benzer dağılım gösterdi. Fonksiyonel kıkırdak oluşumu ve devamı için gerekli olan kondrosit aktivitesinde her iki reseptörün de gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

5.4. FGF-2

FGF sistemi, gelişim süresince endokondral ve intramembranöz kemik oluşumunu kontrol eden önemli sinyal moleküllerini içerir¹²⁹. Bu moleküllerin hücre farklanması ve çoğalması üzerine etkileri gösterilmiştir^{11,98}.

FGF'lerin kıkırdak fizyolojisindeki etkileri üzerine in vitro ve in vivo çalışmalar bulunmaktadır^{130,131}. FGF'ler tarafından oluşturulan mitojenik uyarılar ile kondrosit çoğalması düzenlenir¹³². Luan ve ark¹³³. epifizyal büyüme plağındaki kondrositlerin FGF-2 sentezlediğini göstermişlerdir. Sentezlenerek ekstrasellüler matrikse geçen büyüme faktörünün, otokrin ve parakrin etki göstererek kıkırdak dokusunun büyümesi ve gelişmesinde önemli rol aldığını ileri sürmüşlerdir. Benzer olarak kültüre ortamda kondrositlerin mitotik ve matriks oluşturma evrelerinde, FGF2'nin eklenmesi ile kondrositlerin çoğaldığı,

matriks üretiminin uyarılarak erken kalsifikasyonun baskılandığı gözlenmiştir¹⁰¹. Bu çalışmalara zıt olarak Ogawa ve ark¹³⁴. kültüre mandibular kondil çalışmalarında, rekombinant FGF-2 verilmesi ile perikondriumdan kondrositlerin farklanması ve çoğalmasında, hipertrofik kondrosit oluşumunda azalma gözlemişlerdir. Bu sonuçla FGF-2'nin kondrosit farklanmasında ve çoğalmasında negatif düzenleyici olarak işlev gördüğünü ileri sürmüşlerdir.

Moncilla ve ark¹⁰⁴. fetal sıçan metatars kültürlerinde, FGF-2 verilmesi ile epifizyal ve proliferatif kondrositlerde DNA sentezininin inhibe olduğunu göstermişlerdir. Benzer olarak Sahni ve ark¹³⁵. FGF sinyallerinin kondrositik hücre dizilerinde ve kıkırdak dokudan kemik dokuya geçişte hücrelerin çoğalması ve kemik gelişimi üzerine inhibitör etki gösterdiklerini ileri sürmüşlerdir. Hücre çoğalması üzerine FGF aracılı inhibitör etkinin, antiproliferatif genlerin aktivasyonu sonucu olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ikincil kemikleşme merkezinin oluşma sürecinde, farklı dönemlerdeki sıçan epifizlerinde hücresel FGF-2 ekspresyonu değerlendirilmiştir. 1. gün ve 4. günde epifizlerin periferinde bulunan kondrositlerin yoğun olarak FGF-2 eksprese ettiği saptanmıştır. Bu dönemlerde FGF sisteminin de IGF ve TGF- β sistemi gibi etki göstererek, perikondriumdaki mezenşimal hücrelerden kondrositlerin farklanmasını uyardığı kanısına varılmıştır. Ayrıca kondrositlerden eksprese olan FGF-2'nin otokrin ve parakrin etkilerle kondrositlerin çoğalması ve ekstrasellüler matriks sentezi için gerekli olduğunu düşündürmüştür.

Bu dönemlerde epifizin merkezinde, ikincil kemikleşmenin oluşacağı alanda, FGF-2 ekspresyonu yapmayan kondrositlerin yoğun olduğu gözlenmiştir. 1. günde bu faktörü eksprese eden kondrosit sayısı $35,40 \pm 8,36$ iken, 4. günde bu sayı $40,71 \pm 5,99$ olarak hesaplanmıştır. Ancak her iki grup arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p=0,241$). Bu günlerde kemikleşmenin oluşacağı alanda FGF-2 negatif kondrositlerin, FGF-2 pozitif kondrositlere oranla fazla olması, endokondral kemikleşmeyle ilgili olabilir. Bu bölgedeki kondrositler, FGF-2 eksprese etmeyerek veya varolan FGF-2 ekspresyonunu durdurarak, mikroçevrede FGF-2'nin azalmasına ve buna bağlı olarak kondrositlerin çoğalmaları üzerine uyarıcı etkili olan FGF-2 aracılı mitojenik sinyallerin oluşmamasını sağlıyor olabilir. Bu nedenle de FGF-2'nin

kondrosit çoğalması ve kıkırdak matrisi üretimi için uyarıcı etki gösterdiği söylenebilir.

7. günde FGF-2 eksprese eden kondrosit sayısı $56,40 \pm 11,73$ 'e yükseldiği saptanmış ve bu sayı 1.gün ve 4. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,000$). Ayrıca bu dönemde epifiz merkezine doğru yönelmiş damarlar çevresindeki kondrositlerde yoğun FGF-2 pozitif immün işaretlenme gözlenmiştir.

FGF-2'nin endotel hücre çoğalmasını ve migrasyonunu artırarak etkilediği gösterilmiştir¹⁰². Bununla ilişkili olarak Baron ve ark¹⁰³. tavşan büyüme plağına FGF-2 infüzyonu yaptıkları çalışmada, FGF-2 infüzyonu yapılan büyüme plağı bölgesinde, metafizyal alandan büyüme plağına doğru damarlanmanın arttığını göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda FGF-2'nin damarlanma süreciyle ilgili olduğunu düşünülmüştür. Çünkü epifiz periferinden merkezine doğru oluşan damarlar çevresindeki kondrositlerin FGF-2 eksprese ettiği saptanmıştır. Ayrıca 7. gündeki epifiz merkezinde FGF-2 eksprese eden kondrosit sayısındaki artışın, epifiz periferinden merkezine doğru, damarlanmanın artışı veya kemikleşmenin oluşacağı bölgeye damarların yönelmesiyle ilgili olabileceği kanısına varılmıştır.

10 günde FGF-2 eksprese eden kondrosit sayısında ($60,00 \pm 7,89$) 1. gün ve 4. güne göre anlamlı bir artış (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,000$) varken, 7. güne göre bu artış anlamlı bulunmamıştır ($p=0,407$). Bu dönemde FGF-2 eksprese eden kondrosit sayısındaki artışın kemikleşme bölgesindeki damarlanma alanının genişlemesiyle ilgili olabileceği söylenebilir. Bunun yanında FGF-2 artışı, bize bu faktörün kıkırdak dokudan kemik dokuya geçiş döneminde kondrosit maturasyonunda ve hipertrofinin düzenlenmesinde de dengeleyici rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalarda FGF-2'nin kondrosit farklanmasını ve çoğalmasını uyarırken, terminal farklanmayı inhibe ederek hipertrofik kondrositleri azalttığı gösterilmiştir^{101,105}. Çalışmamızda ise bu dönemde artan FGF-2 ekspresyonun, ortamda bulunan IGF ve TGF- β sisteminin kondrosit hipertrofini uyarıcı etkisinin dengelenmesi için kondrositlerin hücresel düzenleme mekanizmalarından olabileceği düşünülmüştür.

FGF-2 kondrositlerin hipertrofini inhibe etmesine karşın ilginç olarak 10. günde epifiz merkezindeki hipertrofik kondrositlerde yoğun ekspresyonu olduğu saptanmıştır. Hipertrofik kondrositlerin FGF-2 ekspresyonu, apoptozis ile ilgili olabilir. Nitekim kondrositlerde FGF sinyallerinin bir diğer rolünün hücre ölümünü uyarılması olduğu bilinmekle birlikte FGF-2'nin artmış ekspresyonunda kondrosit apoptozisinin de arttığı saptanmıştır¹³⁶. Çalışmamızda kemikleşme sürecinin 10. gününde, kırıkta kemik geçiş bölgesinde yapısal değişikliklerin oluşmasını stimüle eden apoptozisi düzenleyen mekanizmalardan birinin FGF-2 ile tetiklendiği kanısına varılmıştır. Ayrıca kemikleşme sınırındaki hipertrofik kondrositlerden ekspresyon edilen FGF-2'nin de parakrin etkiyle osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasını uyardığı düşünülmüştür.

21. günde genişlemiş ikincil kemikleşme alanı çevresindeki hipertrofik kondrositlerde, kemikleşme alanındaki osteoprogenitör hücrelerde, yeni oluşan osteoid matriksi sınırlayan osteoblastlarda FGF-2 ekspresyonu saptanmıştır. FGF-2 gen ekspresyonu oluşturulmuş çalışmada osteoblastogenezde defekt sonucu kemik büyümesinin ve kemik dansitesinin azaldığı gösterilmiştir¹³⁷. Daha sonra Power ve ark¹³⁸. overektomi uygulanmış sıçanlarda FGF-2 verilmesi ile kemik dokuda anabolik etkinin arttığını, osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını uyarıldığını ve osteoblastlar tarafından yapılan osteoid hacminin arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da endokondral kemikleşme sürecinde, osteoprogenitör hücrelerden osteoblastların oluşması ve kemik matriks oluşumunda etkili faktörler arasında FGF-2'nin de bulunduğu kanısına varılmıştır.

50. ve 100.günde ikincil kemikleşme merkezinde, trabeküler kemikler çevresindeki osteoblastlarda ve trabeküler kemiklerdeki bazı osteositlerde FGF-2 immün işaretlenmesi saptanmıştır. Ayrıca osteoprogenitör hücrelerde bu dönemde de devam eden FGF-2 pozitifliği gözlenmiştir.

Daha önceki çalışmalarda FGF-2'nin endokondral kemikleşme sinyallerinin başlamasında önemli rol oynayan hipertrofik kondrosit apoptozisini uyarırken, kemik matriksin üretiminden sorumlu osteoblastlarda ise antiapoptotik etkili olduğu gösterilmiştir. Debiasis ve ark¹⁰⁶. osteoblast kültürü çalışmalarında FGF-2'nin antiapoptotik mekanizmaları uyararak osteoblastların apoptozisini engellediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda FGF-2'nin osteoblastların hücresel aktivitelerinin devamında ve osteoblastların apoptozis

sürecine girmeyip osteosite dönüşmesinde etkili faktörlerden biri olduğunu düşünölmüştür. Bu nedenle bu faktör, matür trabekül kemik yapısının oluşabilmesi için yeterli osteosit dansitesinin sağlanmasında da düzenleyici rol oynayabilir.

Sonuç olarak kemik dokunun oluşması ve devamının sağlanmasında, osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar ve osteositlerden eksprese edilen FGF-2'nin bu dönemde de otokrin ve parakrin etkilerle hücre fonksiyonlarında etkili olduğu söylenebilir.

Artiküler kıkırdağın yüzeyel ve ara zonlarında belirgin FGF-2 işaretlenmesi, bu hücrelerin fonksiyonlarının devamı ve kıkırdak dokunun oluşması için bu faktörün gerekli olduğunu düşündürmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda farklı dönemlerde ikincil kemikleşme merkezinin oluşumu üzerine IGF-1R β , TGF- β R2 ve FGF-2' nin etkisi açıklanmaya çalışıldı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre;

1. İkincil kemikleşme sinyallerinin henüz başlamadığı 1. ve 4. günde, kondrositlerden eksprese edilen IGF-1R β ve TGF- β R2'nin epifiz periferinde kondrosit çoğalması ve kıkırdak matriks üretimi için hücrel aktivite düzenliyor olabileceği düşünüldü. Ancak kemikleşmenin olacağı bölgelerdeki kondrositlerin, bu reseptör ekspresyonlarını azaltarak IGF ve TGF- β etkisinden çıkıp, o bölgede çoğalma ve kıkırdak matriks üretimini azaltarak kemikleşmenin başlamasına yol açtığı kanısına varıldı. FGF-2 ekspresyonunun IGF-1R β ve TGF- β R2 ekspresyonu ile paralellik göstermesi, benzer hücrel aktivitelerin olmasında bu faktörün de etkili olduğu şeklinde yorumlandı.

2. 7. günden itibaren ikincil kemikleşme bölgesindeki IGF-1R β ve TGF- β R2 ekspresyonu yapan kondrosit sayısının artması, her iki reseptör aktivitesinin de artmasını sağlayarak, endokondral kemikleşmenin başlamasında önemli rol alan hipertrofik kondrosit sayısının artışına yol açtığı sonucuna varıldı. Ayrıca IGF-1R β eksprese eden kondrosit sayısının TGF- β R2 eksprese eden kondrosit sayısına göre fazla olması, bu dönemde meydana gelen kondrosit hipertrofinde IGF-1R β 'nin TGF- β R2'ye göre daha etkili olduğunu düşündürdü. Kemikleşme merkezine doğru oluşan kanallar çevresindeki kondrositlerde IGF-1R β ve FGF-2 ekspresyonu olması, bu dönemde IGF ve FGF sisteminin damarlanma artışında etkili olduğu kanısına varıldı.

3. 10. günde IGF-1R β ve TGF- β R2 ekspresyonu yapan kondrosit sayısındaki artış, bu dönemde, kondrositlerin hipertrofinin artarak devam etmesinde ve hücrelerin apoptozis sürecine yönelmesinde, her iki reseptörün de etkili olduğunu düşündürdü. Ayrıca artan IGF-1R β ve TGF- β R2 etkisi ile hücrelerin apoptozisi sonucunda ortamda artan faktörlerin, ikincil kemikleşme bölgesinde vasküler invazyon alanının genişlemesine, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasına ve kemik matriksin yapılmasına neden olabileceği

sonucuna varıldı. Bu dönemde hipertrofik kondrositlerde FGF-2'nin artması, bu faktörün IGF ve TGF- β sisteminin kondrosit hipertrofisinde uyarıcı etkisini dengeleyen hücrel düzenleme mekanizmalarından olabileceği şeklinde yorumlandı.

4. 21. günde genişleyen ikincil kemikleşme merkezi çevresinde matür ve hipertrofik kondrositlerde belirgin IGF-1R β , TGF- β R2 ve FGF-2 işaretlenmesi görüldü. IGF, TGF- β ve FGF sisteminin, kemikleşme bölgesinde devam eden endokondral kemikleşme sürecinde otokrin ve parakrin etkilerle, artmış osteoprogenitör hücrelerin çoğalması, farklanması, kemik matriksin üretimi ve, mineralizasyonu ile ilgili olabileceği düşünöldü.

5. 50. ve 100. günde ikincil kemikleşme merkezinde aktif endokondral kemikleşme süreci sonlanmış ve matür trabekül kemik yapısı oluşmuştu. Bu dönemde kemik trabekülleri çevresindeki osteoblastlarda ve kemik matriks içindeki birçok osteositte IGF-1R β , TGF- β R2 ve FGF-2 işaretlenmesi saptanmıştı. Bu nedenle devam eden kemik metabolizmasında, hücre fonksiyonunu düzenleyen ve antiapoptotik mekanizmaları aktive eden IGF, TGF- β ve FGF sistemlerinin gerekli olduğu kanısına varıldı.

Sonuç olarak büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin ikincil kemikleşme merkezinin oluşumunda ve buna bağılı olarak dinamik iskelet çatının meydana gelmesinde etkili olduğu düşünöldü.

Endokondral kemikleşmede IGF, TGF- β ve FGF sisteminin karşılıklı etkileşim mekanizmasını açıklayan moleküler düzeydeki çalışmaların yapılması, endokondral kemikleşme mekanizmasında henüz tamamen bilinmeyen hassas dengelerin açıklanmasına ışık tutacaktır. Ayrıca bu faktörlerin ve reseptörlerinin, kemikleşme üzerindeki dönemsel etkinliğinin in vivo olarak saptanması, kemik displazilerinde fizyopatolojik mekanizmaların daha net olarak anlaşılmasına ve kullanılacak agonist veya antagonist tedavi protokollerinin geliştirilmesine faydalı olacaktır.

Bunlara ilaveten doku mühendisliğinde, bu faktörlerin ve reseptörlerinin dönemsel aktivasyonunun, mezenşimal hücrelerden fonksiyonel kemik dokusu geliştirilmesinde ve gerekli kemik implantların yapılmasında katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Ross MH, Gordon IK, Pawlina W. Histology a Text and Atlas. 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams-Wilkins, 2003:180-213.
2. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 2nd ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2001:135-54.
3. Fawcett DW. Bloom and Fawcett, A Textbook of Histology. 12th ed. New York, Chapman-Hall, 1994:199-229.
4. Leeson TSS, Leeson CR, Paparo AA. Text/Atlas of Histology. Philadelphia, W. B. Saunders, 1988:168-89.
5. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Development Cell* 2002;2:309-406.
6. Ducky P. Cbfa1: A molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000;219:461-71.
7. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:191-220.
8. Lee ER, Lamplugh L, Davoli MA. Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats ages 0-21 days: I. Two groups of proteinases cleave the core protein of aggrecan. *Dev Dyn* 2001; 222:52-70.
9. Blumer MJF, Longato S, Richter E, Perez MT, Konakci KZ, Fritsch H. The role of cartilage canals in endochondral and perichondral bone formation: are there similarities between these two processes?. *J Anat* 2005;206:359-72.
10. Solheim E. Growth factors in bone. *International Orthopaedics (SICOT)* 1998;22:410-16.
11. Rosier NR, Reynolds PR, O'Keefe RJ. Molecular and cell biology in orthopaedics. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR eds. *Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*. 2nd ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000:20-76.

12. Khan SN, Bostrom MPG, Lane JM. Bone growth factors. In: Lane JM eds. The Orthopedic Clinics of North America. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000;31:375-87.
13. Ianotti JP, Goldstein S, Kuhn J, Lipiello L, Kaplan FS, Zaleske DJ. The formation and growth of skeletal tissues. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR eds. Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System. 2nd ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000:78-105.
14. Oursler MJ. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor beta. J Bone Miner Res 1994;9:443-52.
15. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji, Çeviri; Prof. Dr. Başaklar A. Can. 9. Baskı, Ankara: Palme, 2005:167-91.
16. Hall BK, Miyake T. All For One and One For All: Condensations and the initiation of skeletal development. Bioessays 2000;22:138-47.
17. Moore, Persound. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi, Çeviri; Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. 6. Baskıdan Çeviri, İstanbul, Nobel, 2002:406-24.
18. Horton WA. Skeletal Development: Insights From Targeting The Mouse Genome. The Lancet 2003;362:560-69.
19. Larsen WJ. Human Embryology. 2nd ed. New York, Livingstone Churchill, 1997:311-44.
20. Peters H, Wilm B, Sakai N, Imai K, Maas R, Balling R. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. Development 1999;126:5399-5408.
21. Hall BK, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. Int J Dev Biol 1995;39:881-93.
22. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. Osteoarthritis Cartilage 2000;8:309-34.
23. Hall BK, Miyake T. The membranous skeleton: The role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. Anat Embryol (Berl) 1992;186:107-24.
24. Stevens A, Lowe J. Human Histology. 2nd ed. Philadelphia, Mosby, 1997:234-47.
25. Erkoçak A. Genel Histoloji. 3. Baskı. Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi, 1980:236-44.

26. Ferretti M, Palumbo C, Contri M, Marotti G. Static and dynamic osteogenesis: two different types of bone formation. *Anat Embryol* 2002;206:21-29.
27. Portner GA, Gurley AM, Roth SI. Bone. In: Stenberg SS eds. *Histology for Pathologist*. 2nd ed. Philadelphia, Lippincott-Roven Publishers, 1997:85-106.
28. Eroschenko VP. *di Fiore Histoloji Atlası-Fonksiyonel İlişkileriyle, Çeviri; Demir R. 9. Baskıdan Çeviri, Ankara, Palme, 2001:47-53.*
29. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 2001;15:2865-76.
30. Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev* 2001;106:97-106.
31. Esing MT, Chen QJ, Vu TH, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vasküler endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* 2000;151:879-90.
32. Floyd WE, Zaleske DJ, Schiller AL, Trahan C, Mankin HJ. Vascular events associated with the appearance of the secondary center of ossification in the murine distal femoral epiphysis. *J. Bone Joint Surg A* 1987;69:185-90.
33. Costales L, Alvarez J, Balbin M, Lopez JM. Cell proliferation during secondary ossification of rat tibia. *European Cell and Materials* 2002;4:47.
34. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Serge GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by indian hedgehog and pth-related protein. *Science* 1996;273:613-22.
35. Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP. Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and independent pathways. *Development* 2000;127:543-48.
36. Chung UI, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* 2001;107:295-304.

37. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1996;12:390-97.
38. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 1996;84:911-21.
39. Su WC, Kitagawa M, Xue N, et al. Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* 1997;386:288-92.
40. Camacho-Hubner C, Savage M. Insulin-like growth factor 1 deficiency. *Horm Res* 2001;55:17-20.
41. Dupont J, Holzenberger M. Biology of Insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Research* 2003;69:257-71.
42. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of Insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000;21:215-44.
43. Clemens TL, Chernausk SD. Genetic strategies for elucidating insulin-like growth factor action in bone. *Growth Horm IGF Res* 2004;14:195-99.
44. Czech MP. Structural and functional homologies in the receptors for insulin and the insulin-like growth factors. *Cell* 1982;31:8-10.
45. Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 1982;215:185-87.
46. Brandt J, Andersen AS, Kristensen C. Dimeric fragment of the insulin receptor alpha-subunit binds insulin with full holoreceptor affinity. *J Biol Chem* 2001;276:12378-84.
47. Rosen CJ. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins: Clinical implications. *Clin Chem* 1999;45:1384-90.
48. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993;75:73-82.
49. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factors 1 (Igf-1) and type 1 Igf receptor (Igf1r). *Cell* 1993;75:59-72
50. Sjogren K, Liu JL, Bland K, et al. Liver-derived insulin-like growth factor 1 (Igf-1) is the principal source of Igf-1 in blood but is not required for

- postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7088-7092.
51. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy T. Igf-1 mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 1989;83:60-65.
 52. Chihara K, Sugimoto T. The Action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Horm Res* 1997;48:45-49.
 53. Conover CA. In vitro studies of insulin-like growth factor 1 and bone. *Growth Horm IGF Res* 2000;10:107-110.
 54. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Regulatory effects of insulin-like growth factors 1 and 2 on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* 1989;124:301-309.
 55. Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, et al. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* 1993;7:2609-17.
 56. Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 1998;140:19-24.
 57. Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, et al. Targeted overexpression of insulin-like growth factor 1 to osteoblasts of transgenic mice: Increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 2000;141:2674-82.
 58. DeChiara T, Efstratiadis A, Robertson E. A growth deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor 2 gene disrupted by targeting. *Nature* 1990;345:78-80.
 59. Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J, Bondy CA. Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis. *Endocrinology* 1995;136:2741-51.
 60. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, et al. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem* 2002;277:44005-12.
 61. Hock JM, Centrella M, Canalis E. insulin-like growth factor 1 has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988;122:254-60.

62. Rubin J, Ackert-Bicknell CL, Zhu L, et al. IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in vitro and OPG in vivo. *J. Clin. Endocrinol Metab* 2002;87:4273-79.
63. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, et al. Insulin-like growth factor 1 supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology* 1992;131:1075-80.
64. Guicheux J, Heymann D, Rousselle AV, et al. Growth hormone stimulatory effects on osteoclastic resorption are partly mediated by insulin-like growth factor 1: An in vitro study. *Bone* 1998;22:25-31.
65. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Isolation and characterization of insulin-like growth factor 1 (Somatomedin-C) from cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1988;122:22-27.
66. Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor in mouse postnatal growth. *Developmental Biology* 2001;229:141-62.
67. Thomas T, Gori F, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL, Conover CA. Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: Effect on binding protein production, proliferation and commitment to osteoblasts and adipocytes. *Endocrinology* 1999;140:5036-44.
68. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693-99.
69. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff Martin, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell*. 3 rd ed. New York, Garland Publishing, 1994:721-85.
70. Persson U, Souchelnytskyi S, Franzen P, Miyazono K, Dijke P, Heldin CH. Transforming growth factor (TGF- β)-specific signaling by chimeric TGF- β type II receptor with intracellular domain of activin type IIB receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1997;272:21187-94.
71. Shi Y, Massagne J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.
72. Massague J. Receptors for the TGF- β family. *Cell* 1992;69:1067-70.
73. Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing

- lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 1985;1001:2210-22.
74. Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β 1. purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* 1988;263:5407-15.
 75. Carrington JL, Roberts AB, Flanders KC, Roche NS, Reddi AH. Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor β during endochondral bone development. *The Journal of Cell Biology* 1988;107:1969-75.
 76. Mathews LS. Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocr Rev* 1994;15:310-25.
 77. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Dev* 1994;8:133-46.
 78. Rolen BA, Lin HY, Knezevic V, Freund E, Mummery CL. Expression of TGF- β s and their receptors during implantation and organogenesis of the mouse embryo. *Devel Biol* 1994;166:716-28.
 79. Lawler S, Candia AF, Ebner R, et al. The murine type II TGF- β receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF- β 1. *Development* 1994;120:165-75.
 80. Sakou T, Onishi T, Yamamoto T, Nagamine T, Sampath TK, Dijke PT. Localization of Smads, the TGF- β family intracellular signaling components during endochondral ossification. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999;14:1145.
 81. Centrella M, Casinighino S, Kim J, et al. Independent changes in type I and type II receptors for transforming growth factor- β induced by bone morphogenetic protein 2 parallel expression of osteoblast phenotype. *Mol Cell Biol* 1995;15:3273-81.
 82. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Glucocorticoid regulation of transforming growth factor- β 1 activity and binding to osteoblast-enriched cultures from foetal rat bone. *Mol Cell Biol* 1991;11:4490-96.

83. Kabasawa Y, Ejri S, Matsuki Y, Hara K, Ozawa H. Immunoreactive localization of transforming growth factor- β type II receptor- positive cells in rat tibiae. *Bone* 1998;22:93-98.
84. Horner A, Kemp P, Summers C. Expression and distribution of transforming growth factor- β isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone* 1998;23:95-102.
85. Critchiow MA, Bland YS, Ashhurst DE. The effects of age on the response of rabbit periosteal osteoprogenitor cells to exogenous transforming growth factor- β 2. *Journal of Cell Science* 1994;107:499-516.
86. Rosado E, Schwartz Z, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Transforming growth factor- β 1 regulation of growth zone chondrocytes is mediated by multiple interacting pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002;1590:1-15.
87. Thorp BH, Anderson I, Jakowlew SB. Transforming growth factor- β 1, - β 2 and - β 3 in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick. *Development* 1992;114:907-11.
88. Copray JC, Jansen HWB, Duterloo HS. Effect of compressive forces on phosphatase activity in mandibular condylar cartilage of the rat in vitro. *J Anat* 1985;140:479-89.
89. Hosoi T, Asaka T, Motoo M, et al. Immunolocalization of transforming growth factor- β in the bone tissue. *Calcify Tissue Int* 1996;59:305-06.
90. Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor- β in bone formation. *J Cell Biochem* 1994;55:350-57.
91. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:494-98.
92. Doschak MR, Cooper DML, Huculak CN, et al. Angiogenesis in the distal femoral chondroepiphysis of the rabbit during development of the secondary centre of ossification. *J Anat* 2003;203:223-33.
93. Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase-molecular analysis and signal transduction. *Biochem Biophys Acta* 1992;1135:185-99.

94. Ornitz DM. FGF Signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2005;16:205-213.
95. Chon MJ, Izpisua-Belmonte JC, Abud H, Heath JK, Tickle C. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 1995;80:739-46.
96. Mahmood R, Bresnick J, Hornbruch A. A role of fgf-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Curr Biol* 1995;5:797-806.
97. Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA. Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem Cell Biol* 1997;75:669-85.
98. Yamaguchi JP, Rossant J. Fibroblast growth factor in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:485-91.
99. Debais F, Hott M, Graulet AM, Marie PJ. The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J Bone Miner Res* 1998;13:645-54.
100. Hiraki Y, Shukunami C, Iyama K, Mizuta H. Differentiation of chondrogenic precursor cells during the regeneration of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9(Suppl A):102-108.
101. Iwamoto M, Shimazu A, Nakashima K, Suzuki F, Kato Y. Reduction of basic fibroblasts growth factor receptor is coupled with terminal differentiation of chondrocytes. *J Biol Chem* 1991;266:461-67.
102. Sato Y, Rifkin D. Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1988;107:1199-1205.
103. Baron J, Klein KO, Yanovski JA, Novosad JA, Bacher JD, Bolander ME, Cutler GB. Induction of growth plate cartilage ossification by basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1994;135:2790-93.
104. Mancilla EE, Luca FD, Uyeda JA, Czerwiec FS, Baron J. Effects of fibroblast growth factor-2 on longitudinal bone growth. *Endocrinology* 1998;139(6):2900-04.
105. Coffin JD, Florkiewicz RZ, Neumann J, et al. Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor factor (fgf-2) transgenic mice. *Mol Biol Cell* 1995;6:1861-73.
106. Debais F, Lefevre AG, Lemonnier BJ, et. al. Fibroblast growth factor-2 induces osteoblast survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-

- dependent, -h-catenin-independent signaling pathway. *Experimental Cell Research* 2004;297:235-46.
107. Nakajima F, Yamazaki M, Ogasawara A, et. al. Enhancement of experimental fracture healing with a local injection of basic fibroblast growth factor. *Trans Orthop Res Soc* 1998;23:596.
 108. Nakamura T, Hanada K, Tamura M, et. al. Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rat. *Endocrinology* 1995;136:1276-84.
 109. Chen WJ, Jingushi S, Aoyama I, et. al. Effects of fgf-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae. *J Bone Miner Metab* 2004;22:303-309.
 110. Jingushi S, Heydemann A, Kana SK, et. al. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gen expression in rat fracture healing. *J Orthop Res* 1990;8:360-64.
 111. Morini S, Continenza MA, Ricciardi G, Gaudio E, Pannarale L. Development of microcirculation of secondary ossification center in rat humeral head. *The Anatomical Record Part A* 2004;278A:419-27.
 112. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, 1992.
 113. Polak JM, Van Noorden S. *Immunocytochemistry*. 3rd ed. BIOS, UK, 2003.
 114. Demir R. *Histolojik Boyama Teknikleri*. Ankara, Palme, 2001:273-77
 115. Wang J, Zhou J, Bondy CA. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *The FASEB Journal* 1999;13:1985-90.
 116. Reddi AH. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:737-44.
 117. Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994;4:172-78.
 118. Delatte M, Von den Hoff JW, van Rheden REM, Kuijpers-Jagtman AM. Primary and secondary cartilages of the neonatal rat: The femoral head and the mandibula condyle. *Eur J Oral Sci* 2004;112:156-62.
 119. Gibson G. Active rol of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microscopy Research and Technique* 1998;43:191-204.
 120. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop* 1995;34:266-80.

121. Dangelo M, Pacifici M. Articular chondrocytes produce factors that inhibit maturation of sternal chondrocytes in serum free agarose cultures: A TGF-beta independent process. *J Bone Miner Res* 1997;12:1368-77.
122. Atti E, Gomez S, Wahl SM, Mendelsohn R, Paschalis E, Boskey AL. Effect of transforming growth factors- β deficiency on bone development: a fourier transform-infrared imaging analysis. *Bone* 2002;31(6):671-84.
123. Filvaroff E, Erlebacher A, Ye JQ et. al. Inhibition of TGF- β receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development* 1999;126:4267-69.
124. Janssens K, Dijke P, Janssens S, Hul WV. Transforming growth factor- β 1 to the bone. *Endocrine Reviews* 2005;26(6):743-74.
125. Karsdal MA, Fjording MS, Foged NT, Delaisse JM, Lochter A. Transforming growth factor- β -induced osteoblast elongation regulates osteoclastic bone resorption through a p38 mitogen-activated protein kinase and matrix metalloproteinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001;276:39350-58.
126. Karsdal MA, Andersen TA, Bonewald L, Christiansen C. Matrix metalloproteinases (MMPs) safeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes: MT1-MMP maintains osteocyte viability. *DNA Cell Biol* 2004;23:155-65.
127. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M et. al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;320:914-19.
128. Kveiborg M, Flyvbjerg A, Eriksen EF, Kassem M. Transforming growth factor- β 1 stimulates the production of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in human bone marrow stromal osteoblast progenitors. *Journal of Endocrinology* 2001;169:549-61.
129. Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & Dev* 2002;16:1446-65.
130. Wroblewski J, Edwall-Arvidsson C. Inhibitory effects of basic fibroblast growth factor on chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res* 1995;10:735-42.

131. Trippel SB, Wroblewski J, Makower AM, Whelan MC, Schoenfeld D, Doctrow SR. Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth factor I and basic fibroblast growth factor. *J Bone Joint Surg* 1993;75:177-89.
132. Beier F. Cell-cycle control and the cartilage growth plate. *J Cell Physiol* 2005;202(1):1-8.
133. Luan Y, Praul CA, Gay CV, Leach RM. Basic fibroblast growth factor: an autocrine growth factor for epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 1996;62(3):372-82.
134. Ogawa T, Shimokawa H, Fukada K et. al. Localization and inhibitory effect of basic fibroblast growth factor on chondrogenesis in cultured mouse mandibular condyle. *J Bone Miner Metab* 2003;21:145-53.
135. Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes & Dev* 1999;13:1361-66.
136. Sahni M, Raz R, Coffin JD, Levy D, Basilico C. STAT-1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in the mice overexpressing FGF2. *Development* 2001;128:2119-29.
137. Montero A, Okada Y, Tomita M et.al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest* 2000;105:1085-93.
138. Power RA, Iwaniec UT, Magee KA, Mitova-Caneva NG, Wronski TJ. Basic fibroblast growth factor has rapid bone anabolic effects in ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 2004;15:716-23.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AER	Apical Ectodermal Ridge (Apikal Ektodermal Kabartı)
aFGF	Asidic Fibroblast Growth Factor (Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü)
ALS	Acid-Labile Subunit (Asit Değişken Subunit)
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü)
BMP	Bone Morphogenetic Protein (Kemik Morfogenetik Protein)
BMP-6	Bone Morphogenetic Protein-6 (Kemik Morfogenetik Protein-6)
DAB	Diaminobenzidine (Diaminobenzidin)
EDTA	Ethylenedinitrilotetraacetic Acid (Etilendinitrilotetraasetik Asit)
FGF-1	Fibroblast Growth Factor-1 (Fibroblast Büyüme Faktörü-1)
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2 (Fibroblast Büyüme Faktörü-2)
FGF-3	Fibroblast Growth Factor-3 (Fibroblast Büyüme Faktörü-3)
GH	Growth Hormon (Büyüme Hormonu)
GHr	Growth Hormon receptor (Büyüme Hormonu reseptörü)
HIF1 α	Hipoxy-Inducible Factor-1 α (Hipoksi Uyarıcı Faktör-1 alfa)
HOX	Homeobox

IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1)
IGF-2	Insulin-Like Growth Factor-2 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2)
IGFBP	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein)
IGF-1R β	Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Beta (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 Reseptör Beta)
Ihh	Indian Hedgehog
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz-9
PAX	Paired Box
PBS	Phosphate Buffer Salin (Fosfatlı Tuz Tamponu)
PBS-BSA	Phosphate Buffer Salin- Bovine Serum Albumin (Fosfatlı Tuz Tamponu- Sığır Serum Albumin)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü)
PTHrP	Parathyroid Hormon-Related Protein (Paratiroid Hormonla İlişkili Protein)
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Ligand)
TGF- β	Transforming Growth Factor- β (Değiştirici Büyüme Faktörü-Beta)
TGF- β R2	Transforming Growth Factor- β Receptor 2 (Değiştirici Büyüme Faktörü-Beta Reseptör 2)
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (Tartrata Direçli Asit Fosfataz Enzimi)
VEGF	Vascüler Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Somitlerin oluşumu ve farklanması).....	10
Şekil 2 (Vasküler invazyon oluşum süreci).....	17
Şekil 3 (Büyüme plaklarının tamamlanmış görünümü).....	19
Şekil 4 (IGF-1R β ve TGF- β R2 ile işaretlenen hücrelerin..... günlere göre dağılımı)	38
Şekil 5 (FGF-2 ile işaretlenen hücrelerin günlere göre dağılımı).....	39
Resimler	
Resim 1 (1. grupta hyalin kıkırdak yarısındaki femur distal..... epifizinin ışık mikroskopik görünümü)	41
Resim 2 (2. grupta femur distal epifizinin ışık mikroskopik görünümü).....	41
Resim 3 (3. grupta femur distal epifizinin ışık mikroskopik görünümü).....	42
Resim 4 (4. grupta femur distal epifizinin ışık mikroskopik görünümü).....	42
Resim 5 (5. grupta femur distal epifizinde kemikleşme).....	43
Resim 6 (6. grupta femur distal epifizinde ikincil kemikleşme merkezi).....	43
Resim 7 (7.grupta ikincil kemikleşme merkezinin tamamlanması).....	44
Resim 8 (Negatif kontrol).....	45
Resim 9 (1. grupta IGF-1R β işaretlenmesi).....	45
Resim 10 (1. grupta epifiz periferinde IGF-1R β immunoreaktivitesi).....	46
Resim 11 (1. grupta epifiz merkezinde IGF-1R β immunoreaktivitesi).....	46
Resim 12 (2. grupta epifiz periferinde IGF-1R β işaretlenmesi).....	47
Resim 13 (2. grupta epifiz merkezinde IGF-1R β işaretlenmesi).....	47
Resim 14 (3. grupta epifiz periferinden merkezine doğru gelişen..... kananalların görünümü)	48
Resim 15 (3. grupta epifiz periferinde IGF-1R β immunoreaktivitesi).....	48
Resim 16 (3. grupta epifiz merkezinde IGF-1R β immunoreaktivitesi).....	49
Resim 17 (4. grupta epifiz periferinde IGF-1R β işaretlenmesi).....	49
Resim 18 (4. grupta epifiz merkezinde IGF-1R β işaretlenmesi).....	50

Resim 19 (4. grupta epifiz merkezinde hipertrofik kondrositler).....	50
Resim 20 (5. grupta IGF-1R β işaretlenmesi).....	51
Resim 21 (6. grupta ikincil kemikleşme merkezindeki trabeküler kemik..... görünümü ve artiküler kıkırdakta IGF-1R β işaretlenmesi)	51
Resim 22 (6. grupta osteoblast ve osteositlerde IGF-1R β işaretlenmesi).....	52
Resim 23 (7. grupta kemik trabekülalarındaki osteositlerde..... ve artiküler kıkırdakta IGF-1R β işaretlenmesi)	52
Resim 24 (1. grupta epifiz periferinde TGF- β R2 işaretlenmesi).....	53
Resim 25 (1. grupta epifiz merkezinde TGF- β R2 işaretlenmesi).....	53
Resim 26 (2. grupta epifiz periferinde TGF- β R2 işaretlenmesi).....	54
Resim 27 (2. grupta epifiz merkezinde TGF- β R2 işaretlenmesi).....	54
Resim 28 (3. grupta epifiz periferinde TGF- β R2 immunoreaktivitesi).....	55
Resim 29 (3. grupta epifiz merkezinde TGF- β R2 immunoreaktivitesi).....	55
Resim 30 (4. grupta epifiz periferinde TGF- β R2 immunoreaktivitesi).....	56
Resim 31 (4. grupta hipertrofik kondrositler).....	56
Resim 32 (5. grupta TGF- β R2 işaretlenmesi).....	57
Resim 33 (5. grupta kemikleşme merkezi).....	57
Resim 34 (6. grupta artiküler kıkırdaktaki kondrositlerde..... TGF- β R2 işaretlenmesi)	58
Resim 35 (6. grupta trabeküler kemikte TGF- β R2 işaretlenmesi).....	58
Resim 36 (7. grupta artiküler kıkırdakta TGF- β R2 işaretlenmesi).....	59
Resim 37 (7. grupta trabeküler kemikte TGF- β R2 işaretlenmesi).....	59
Resim 38 (1. grupta epifiz periferinde FGF-2 işaretlenmesi).....	60
Resim 39 (1. grupta epifiz merkezinde FGF-2 işaretlenmesi).....	60
Resim 40 (2. grupta epifiz periferinde FGF-2 işaretlenmesi).....	61
Resim 41 (2. grupta epifiz merkezinde FGF-2 işaretlenmesi).....	61
Resim 42 (3. grupta kanal oluşumu).....	62
Resim 43 (3. grupta epifiz periferinde FGF-2 immunoreaktivitesi).....	62
Resim 44 (3. grupta epifiz merkezinde FGF-2 immunoreaktivitesi).....	63
Resim 45 (4. grupta epifiz periferinde FGF-2 immunoreaktivitesi).....	63
Resim 46 (4. grupta hipertrofik kondrositler).....	64
Resim 47 (5. grupta kemikleşme merkezi).....	64

Resim 48 (6. grupta artiküler kıkırdaktaki kondrositlerde.....65 FGF-2 işaretlenmesi)	65
Resim 49 (7. grupta kemikleşme merkezi ve artiküler kıkırdak).....65	65
Resim 50 (7. grupta osteositlerde FGF-2 işaretlenmesi).....66	66

TABLULAR DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (IGF-1R β , TGF- β R2, FGF-2 pozitif hücre ortalamaları).....	40