

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**GELİŞMEKTE OLAN SIÇAN HUMERUSU
PROKSİMAL EPİFİZİNDE CD105, CD166, NOTCH-1 VE
DELTA POZİTİF HÜCRE DAĞILIMI:
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BİR ÇALIŞMA**

Özlem ÖZBEY

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2008

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**GELİŞMEKTE OLAN SIÇAN HUMERUSU
PROKSİMAL EPİFİZİNDE CD105, CD166, NOTCH-1 VE
DELTA POZİTİF HÜCRE DAĞILIMI:
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BİR ÇALIŞMA**

Özlem ÖZBEY

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2006.02.0122.004)

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir”

Antalya, 2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu alışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 15/02/08

Tez danışmanı: Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



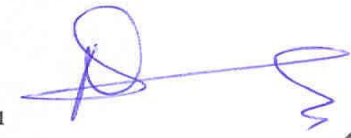
Üye: Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Akif ÇİFTÇİOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı



Üye: Doç. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye: Doç. Dr. A. Merter ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı



ONAY :

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../2008 tarih ve/.... Sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin OĞUZ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

GELİŞMEKTE OLAN SIÇAN HUMERUSU PROKSİMAL EPİFİZİNDE CD105, CD166, NOTCH-1 VE DELTA POZİTİF HÜCRE DAĞILIMI: İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BİR ÇALIŞMA

Özlem ÖZBEY

ÖZET

Organizmada doku ve organların gelişimi, yeniden modellenmesi ve rejenerasyonu kök hücrelerin aktivasyonuna bağlıdır. Kıkırdak ve kemik dokuları mezoderm kaynaklı kök hücrelerden gelişirler ve erişkinde değişik dokularda varlıklarını sürdürürler. Kök hücrelerle yapılan in vitro kültür çalışmaları, kök hücrelerinin CD105, CD166, Notch 1 ve Notch ligandı Delta gibi kendilerine özgü hücre yüzeyi moleküllerine sahip olduklarını göstermiştir. Gelişmekte olan epifiz kıkırdağında, CD105, CD166, Notch1 ve Notch ligandı Delta gibi hücre yüzeyi moleküllerini eksprese eden kök hücrelerin bulunup bulunmadıkları ya da bölgesel dağılımları halen bilinmemektedir. Bu çalışmada, gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifiz kıkırdağında, CD105, CD166, Notch1 ve Delta pozitif hücre dağılımını immunohistokimyasal yöntemlerle incelemesi amaçlandı.

Çalışmada, epifiz kıkırdağı dokusu, embriyonik 15 ve 19 günlük embriyolardan (E15 ve E19), doğum sonrası 10 ve 20 günlük yavrulardan (DS10 ve DS20) ve erişkin sıçanlardan eter anestezisi altında elde edildi. Toplanan epifiz kıkırdağı bölgeleri, rutin histolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelendi.

Çalışmamızın bulguları; Notch1, Delta, CD105 ve CD166'yı eksprese eden hücrelerin tüm gruplara ait sıçan epifiz kıkırdağında bulunduğunu ancak gruplar arasında bu hücrelerin lokalizasyonlarının bölgesel farklılık gösterdiğini ortaya çıkardı. Embriyonik dönemden yetişkin döneme doğru, özellikle DS10. günden itibaren bu molekülleri eksprese eden hücre sayısının, eklem kıkırdağının yüzeye yakın bölgelerinde arttığı ve diğer tüm zonlarda azaldığı ve erişkin eklem kıkırdağında özellikle eklem yüzeyine yakın yüzeyel, geçiş ve derin zonun üst bölgelerinde bulunduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, gelişmekte olan ve erişkin sıçan epifiz kıkırdağının projenitör hücre belirteçleri olan Notch1, Delta, CD105 ve CD166'yı eksprese ettiği ve bu hücrelerin gelişmekte olan epifiz kıkırdağının sağlıklı büyümesini ve olgunlaşmasını, erişkin epifiz kıkırdağında ise gerektiğinde rejenerasyonu ve tamirinde görev alabileceklerini söyleyebiliriz.

Anahtar kelimeler: Epifiz kıkırdağı, sıçan, kök hücre, CD105, CD166, Notch1, Delta, immunohistokimya.

**THE DISTRIBUTION OF CD105, CD166, NOTCH-1 AND DELTA
POSITIVE CELLS IN PROXIMAL EPIPHYSIS OF DEVELOPING RAT
HUMERUS: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY**

Özlem ÖZBEY

ABSTRACT

Development, remodelling and regeneration of tissue and organs depend on the activity of stem cells. Cartilage and bone tissues develop from mesoderm originated stem cells and exist in different tissues in adult. In vitro stem cell culture studies showed that stem cells express specific cell surface molecules like CD105, CD166, Notch1 and Notch ligand Delta. It has not been known yet that stem cells which express cell surface molecules like CD-105, CD-166 Notch1, and its ligand Delta neither exist in developing articular cartilage nor the zonal distribution of these cells. In this study, we aimed to investigate the distribution of CD105, CD166, Notch1 and Delta positive cells in developing rat humerus articular cartilage by immunohistochemical techniques.

In this study, rat epiphyseal articular cartilage tissues were obtained from embryonic day 15 and 19 (E15 and E19) rats, from postnatal day 10 and 20 rats (PN10 and PN20) and from adult rats under ether anesthesia. All tissues were investigated by routine histologic and immunohistochemical procedures.

Our results revealed that CD105, CD166, Notch1 and Delta expressing cells were localized in all studied groups, nevertheless the zonal localization of these cells differ between groups. From embryonic stage through adult, especially from PN10, the number of cells which express these molecules increased in the zone which was closed to the surface of articular cartilage and decreased in all other zones and in adult articular cartilage it was present especially in superficial, transitional, and upper regions of deep zones which was close to the surface of articular cartilage.

In conclusion, developing and adult rat epiphyseal articular cartilage tissues express CD105, CD166, Notch1 and Delta which are the markers of progenitor cells and these cells may contribute to healthy development and maturation processes in developing articular cartilage since it may contribute to regeneration and maintenance of articular cartilage when it is required in adult articular cartilage.

Key Words: Epiphyseal cartilage, stem cell, CD105, CD166, Notch1, Delta, immunohistochemistry.

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, projelendirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan proje yürütücüsü ve danışman hocam Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL'e,

Tezimin gerçekleşmesi için her türlü imkan ve desteği sağlayan hocam Prof. Dr. Ramazan DEMİR'e

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına ve çalışanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve beni yalnız bırakmayan sevgili aileme en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	Sayfa
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii-viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix-x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi-xii
	xiii

GİRİŞ ve AMAÇ

1.1.	Hipotezin Temeli ve Amaç	1-2
------	--------------------------	-----

TEMEL BİLGİLER ve KAYNAK

2.1.	Uzun Kemiklerin Anatomik Yapısı	3
2.2.	Ekstremitte Gelişimi	3-5
2.3.	Kemik Gelişimi	5
2.3.1.	İntramembranöz Kemikleşme	5-6
2.3.2.	Endokondral Kemikleşme	7
2.3.2.1.	Uzun Kemik Kıkırdak Modeli Gelişimi ve Primer Kemik Oluşumu	7-8
2.3.2.2.	Primer Kemikleşme Merkezinin Epifiz Kıkırdağı Bölgelerinde İlerlemesi	9-11
2.4.	Sekonder Kemikleşme Merkezi Gelişimi, Eklem Kıkırdağı ve Epifiz Büyüme Plağı Yapıları	11
2.4.1.	Sekonder Kemikleşme Merkezi Gelişimi	11-13
2.4.2.	Eklem Kıkırdağı	13-14
2.4.3.	Büyüme Plağı	15-17
2.5.	Kök Hücre	17-20
2.6.	Notch	21
2.6.1.	Notch Reseptörleri	21-22
2.6.2.	Notch Ligandları	22
2.6.3.	Notch Sinyal Yolağı	22-24
2.6.4.	Notch Sinyal Yolağının Fonksiyonu	24
2.7.	ALCAM (CD166)	24-26
2.8.	Endoglin (CD105)	26-27

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.	Denekler	28
------	----------	----

3.2.	Doku Temini ve Hazırlanması	28
3.3.	Işık Mikroskobu Pratik Çalışması	29
3.4.	İmmünohistokimyasal Gözlemler	29
3.4.1.	İmmünohistokimyasal Protokol	29
3.5.	İstatistiksel Analiz	29
3.5.1.	İmmünohistokimya	29-30
3.5.2.	Semikantitatif Değerlendirme	30
BULGULAR		
4.1.	Epifiz Kıkırdağı Gelişimi	31-35
4.2.	İmmünohistokimyasal Bulgular	36
4.2.1.	Notch1	36-44
4.2.2.	Delta	45-52
4.2.3.	CD105	53-59
4.2.4.	CD166	60-68
TARTIŞMA		69-73
SONUÇLAR		74
KAYNAKLAR		75-82
ÖZGEÇMİŞ		83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AEÇ	:	Apikal ektodermal çatı
ALCAM	:	Aktive hücre adhezyon molekülü
BMP	:	Kemik morfojenetik proteini
Bp	:	Büyüme plağı
Çz	:	Çoğalma zonu
DAB	:	Di-aminobenzidin tetrahidroklorid
Drz	:	Derin zon
DS	:	Doğum sonrası
DSL	:	Delta/Serrate/Lag2
Dz	:	Depo zonu
E	:	Embriyonik
Eb	:	Eklem boşluğu
Edk	:	Endokondral kemik
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
Ek	:	Eklem kıkırdağı
Ep	:	Epifiz kıkırdağı
ESM	:	Hücre dışı matris
FGF	:	Fibroblast büyüme faktörü
GER	:	Granüllü endoplazmik retikulum
Gz	:	Geçiş zonu
H-E	:	Hematoksilen-Eosin
Hk	:	Hipertrofik kondrosit
HKH	:	Hematopoietik kök hücre
Hu	:	Humerus
Hz	:	Hipertrofik zon
K	:	Kıkırdak
Ka	:	Kapiller

Kib	:	Kemik iliği boşluğu
Kk	:	Kalsifiye kırık
Klz	:	Kalsifikasyon zonu
Km	:	Kalsifiye matris
km	:	Kırık model
Kt	:	Kemik trabekülleri
Kz	:	Kemikleşme zonu
M	:	Mezenkimal doku
Me	:	Metafiz bölgesi
MKH	:	Mezenkimal kök hücreler
N-Cadherin	:	Nöral kadherin
N-CAM	:	Nöral-Hücre adhezyon molekülü
NICD	:	Notch hücre içi domeyni
P	:	Perikondrium
PBS	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PEST	:	Serin ve tironin zengin bölge
Pk	:	Periosteal kemik
Pkm	:	Primer kemikleşme merkezi
PO₂	:	Oksijen basıncı
Sk	:	Skapula
SKM	:	Sekonder kemikleşme merkezi
TGF-RI	:	Transform edici büyüme faktörü reseptörü I
TGF-RII	:	Transform edici büyüme faktörü reseptörü II
TGF-β	:	Transform edici büyüme faktörü
TNF-α	:	Tümör nekroz faktörü
Yz	:	Yüzeyel zon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	İnsanlarda, olgun bir uzun kemiğin anatomik yapısı	3
2.2a,b.	Somitlerin oluşumu ve erken farklılaşma aşaması	4
2.3.	4 haftalık embriyo görüntüsü	4
2.4a,b.	Ekstremitte tomurcuğunun erken dönem görüntüsü	5
2.5.	İntramembranöz kemikleşme basamakları	6
2.6a-d.	Endokondral gelişim basamakları	8
2.7a,b.	Endokondral kemik gelişimi aşamaları	9
2.8.	Doğum öncesi dönemde gelişmekte olan uzun kemik modeli	10
2.9.	Doğum sonrası dönemde epifiz kırırdağı gelişimi	11
2.10.	Doğum sonrası dönemde belirginleşmiş eklem kırırdağı, sekonder kemikleşme merkezi ve epifiz büyüme plağı görüntüsü	12
2.11.	Erişkin eklem kırırdağı zonlarının şematik görünümü	14
2.12.	Epifiz plağı zonlarının şematik görünümü	15
2.13.	Kök hücreler ve dönüştüğü farklı hücre tipleri	17
2.14.	Pluripotent kök hücreler	18
2.15.	Multipotent kök hücreler	19
2.16.	Büyümekte olan eklem kırırdağının apozisyonel büyüdüğünü gösteren şekil	20
2.17.	Notch yapısını gösteren şema	21
2.18.	Notch alttiplerinin yapıları	22
2.19.	Notch sinyal yolağı	23
2.20.	Hücreler arası homofilik ALCAM-ALCAM etkileşim modeli	25
2.21.	ALCAM molekülünün yapısını gösteren şematik çizim	25
2.22.	CD105'in TGF-RI ve TGF-RII ile etkilişimi	27
4.1a-d.	E15 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı görünümü	31
4.2.a-d.	E19 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı görünümü	32
4.3a-c.	DS10 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı görünümü	33
4.4a,b.	DS20 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı görünümü	34
4.5a-c.	Erişkin sıçan humerusu epifiz bölgesi görünümü	35
4.6a-c.	E15 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı Notch1 immünoboyanması	37
4.7a-c.	E19 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı Notch1 immünoboyanması	38
4.7d-g	E19 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı Notch1 immünoboyanması	39
4.8a-d.	DS10 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı Notch1 immünoboyanması	40
4.8e-f.	DS10 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı Notch1 immünoboyanması	41

4.9a-c.	DS20 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı Notch1 immünoboyanması	42
4.10a-c.	Erişkin sıçan humerusu epifiz kıkırdağı Notch1 immünoboyanması	43
4.11.	Tüm gruplarda Notch1 pozitif hücre sıklığı	44
4.12a-c.	E15 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı Delta immünoboyanması	46
4.13a-c.	E19 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı Delta immünoboyanması	47
4.13d-e.	E19 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı Delta immünoboyanması	48
4.14a-d.	DS10 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı Delta immünoboyanması	49
4.15a-c.	DS20 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı Delta immünoboyanması	50
4.16a-c.	Erişkin sıçan humerusu epifiz kıkırdağı Delta immünoboyanması	51
4.17.	Tüm gruplarda Delta pozitif hücre sıklığı	52
4.18a-c.	E15 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD105 immünoboyanması	54
4.19a-d.	E19 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD105 immünoboyanması	55
4.20a-d.	DS10 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD105 immünoboyanması	56
4.21a-c.	DS20 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD105 immünoboyanması	57
4.22a,b.	Erişkin sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD105 immünoboyanması	58
4.23.	Tüm gruplarda CD105 pozitif hücre sıklığı	59
4.24a-c.	E15 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD166 immünoboyanması	61
4.25a,b.	E19 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD166 immünoboyanması	62
4.25c,d.	E19 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD166 immünoboyanması	63
4.26a,b.	DS10 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD166 immünoboyanması	64
4.26c,d.	DS10 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD166 immünoboyanması	65
4.27a,b.	DS20 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD166 immünoboyanması	66
4.28a,b.	Erişkin sıçan humerusu epifiz kıkırdağı CD166 immünoboyanması	67
4.29.	Tüm gruplarda Cd166 pozitif hücre sıklığı	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo		Sayfa
4.1.	Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında Notch-1 immünboyanma yoğunluğunun semikantitatif dağılımı	36
4.2.	Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında Delta immünboyanma yoğunluğunun semikantitatif dağılımı	45
4.3.	Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında CD105 immünboyanma yoğunluğunun semikantitatif dağılımı	53
4.4.	Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında CD166 immünboyanma yoğunluğunun semikantitatif dağılımı	60

GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Hipotezin Temeli ve Amaç

Organizmada uzun kemikler, iki adet genişlemiş uç (epifiz) ve silindirik bir sütundan (diyafiz) oluşan hiyalin kıkırdak modellerden gelişir. Embriyonik dönemde, ilk kemik dokusu, diyafiz bölgesinde primer kemikleşme merkezinde oluşurken, gelişimin daha sonraki dönemlerinde epifizlerde sekonder kemikleşme merkezleri meydana gelir. Epifizlerde sekonder kemikleşme merkezleri oluşuktan sonra epifiz bölgeleri, eklem boşluğundan diyafizlere doğru; eklem kıkırdağı, sekonder kemikleşme merkezi ve büyüme plağı gibi bölgelere ayrılır (1-4). Eklem kıkırdağı ve büyüme plakları endokondral kemikleşmenin sürdürüldüğü alanlar olup bu işlem organizmanın gelişim çağına kadar sürer (3).

Organizmada doku ve organların gelişimi, yeniden şekillenmesi ve rejenerasyonu kök hücrelerin aktivasyonuna bağlıdır. Kıkırdak ve kemik dokuları mezoderm kaynaklı kök hücrelerden gelişirler ve bu hücreler erişkin dönemde de değişik dokularda varlıklarını sürdürürler (5, 6).

Kemik iliği stromal hücreleri veya mezenkimal projenitör hücreler olarak adlandırılan mezenkimal kök hücreleri (MKH) kendini yenileyebilen multipotent projenitör hücrelerdir ve birkaç farklı mezenkimal soya faklanabilme özelliğine sahiptirler (7-9). Bu güne kadar yapılan çalışmalar, birçok farklı omurgalı türünde MKH'lerin kemik, kıkırdak, yağ, tendon ve kas gibi dokulara farklılandığı göstermiştir (10-12). Ayrıca, bu hücrelerin hepatik, renal, kardiyak ve nöral hücreler gibi diğer bazı hücrelere de farklılandıkları belirtilmektedir (13-17). Bu yüzden, MKH'ler bazen multipotent bazen de pluripotent kök hücreler şeklinde tanımlanabilmektedir (18).

MKH'nin in vitro kültür çalışmaları, bu hücrelerin CD10, SH2 (CD105), SH3, SH4 (CD73) , SB10 ve Stro-1 gibi spesifik hücre yüzeyi antijenleri ve peptidlerine sahip olduklarını göstermiştir. Bu hücrelerin, CD49, CD54, CD90 (THY-1), CD102, CD 121a,b, CD123, CD124 ve CD166 gibi adhezyon molekülleri ve büyüme (growth) faktör/sitokin reseptörlerini eksprese etmelerine rağmen (19, 20), endotel hücrelerine özgü CD31, monositler/makrofajlara özgü CD14, lenfositlere özgü CD11a/LFA-1, lökositlere özgü CD45, eritrositlere özgü glycophorin A ve diğer hematopoietik hücrelere özgü CD3, CD14, CD19, CD34, CD38 ve CD66b gibi hücre belirteçlerini eksprese etmedikleri belirtilmektedir (18, 21). Diğer taraftan özellikle CD105 ve CD166'nın birlikte ekspresyonu MKH'nin bir popülasyonunu tanımlar (22, 23).

Kondrositler, MKH'nin farklılaşmış hücre tipleridir. Pluripotent özellikli bu projenitör hücreler, tendon hücreleri, miyosit, kemik iliği, stromal hücreleri, adiposit ve osteoblastlara da farklılanabilirler (7, 23-25).

Eklem kıkırdağı ile ilişkili olarak şimdiye kadar çok az çalışmaya rastlanılabilmiş olup bu çalışmalar çoğunlukla in vitro ortamlarda kültür hücreleri ile yürütülmüştür (25-27). 2004 yılında Alsalameh ve arkadaşlarının erişkin insan eklem kıkırdağı ve kemik iliğinde yaptıkları bir çalışmada (23); eklem kıkırdağından ve kemik iliğinden izole edilen bazı hücrelerin CD105 ve CD166 gibi hücre yüzeyi belirteçlerini birlikte eksprese ettiklerini ve bu hücrelerin in vitro ortamda adipogenez, kondrogenez veya osteogenez yönünde farklılaşabildiği gösterilmiştir. Yazarlar, bu hücrelerin eklem kıkırdağından izole edilen tüm hücrelerin yaklaşık %4'ünü oluşturduklarını ve bu hücrelerin multipotens özelliği olan progenitor hücreler olabileceklerini belirtmişlerdir. Ancak, MKH'lerinin erişkin eklem kıkırdağındaki zonal dağılımlarını ve yaşla birlikte zonal değişiklik gösterip göstermediklerini açıklamamışlardır.

Diaz-Romero ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada ise (28), insan eklem kıkırdağı hücreleri izole edilmiştir ve hücreler kültür ortamında çoğaltılarak değişik fenotipik belirteçleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, kültüre edilen eklem kıkırdağı hücrelerinin geri farklılaşarak fibroblast benzeri hücrelere dönüştükleri ve proliferatif bir özellik kazandıkları belirtilmiştir. Ayrıca, bu hücrelerin kültürasyon süresinin uzatılmasıyla birlikte CD10, CD90, CD105 ve CD166 gibi bazı MKH belirteçlerini daha fazla eksprese ettikleri de vurgulanmıştır. Sözü edilen bu belirteçleri eksprese eden hücrelerin, potansiyel MKH'ler olabileceğini belirtmişlerdir. Ancak, bu çalışmada MKH'lere spesifik bu belirteçlerin in vivo ortamdaki kondrositlerde de bulunup bulunmadığı konusunda detaylı bir yorum getirmemişlerdir.

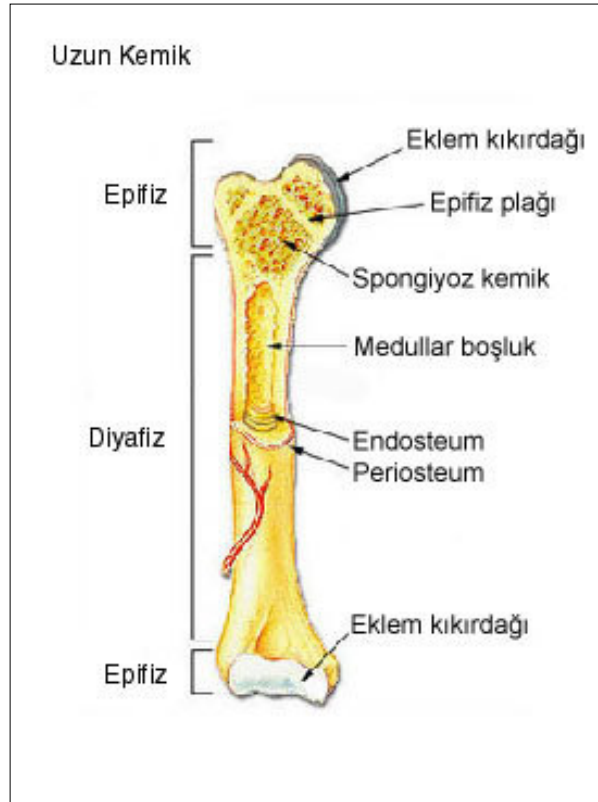
Yukarıda özetlenen bilgiler ışığında vardığımız sonuçlara göre; şimdiye kadar sıçan humerus proksimal epifizinde yer alan eklem kıkırdağı, sekonder kemikleşme merkezi ve büyüme plağı bölgelerinde CD105, CD166, Notch1 ve Delta gibi kök hücrelere özgü belirteçleri taşıyan pozitif hücrelerin bulunup bulunmadığı ve hangi zonlarda yerleşik oldukları, gelişim yaşı ile birlikte lokalizasyonlarının ve oranlarının değişiklik gösterip göstermedikleri ile ilgili kapsamlı bir bilgi eksikliği bulunmaktadır.

Bu nedenle çalışmamızda, embriyonik ve doğum sonrası dönemlerden elde edilen sıçan humerusu proksimal epifizinde CD105, CD166, Notch1 ve Delta pozitif hücrelerin bulunup bulunmadığını, eğer bulunurlarsa epifiz kıkırdağının hangi zonlarında yerleşik olduklarını ve gelişim yaşına paralel olarak sayısal bir değişiklik gösterip göstermediklerini immunohistokimyasal yöntemler ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

TEMEL BİLGİLER VE KAYNAK

2.1. Uzun kemiklerin anatomik yapısı

Organizmada uzun kemikler, uzun eksenleri diğer boyutlarından büyük olan kemiklerdir. Uzun kemiklerin sentral tübüler bölgesi diyafiz (diaphysis), diyafiz bölgesinin her iki kemik ucuna yakın daha geniş bölgeleri metafiz (metaphysis) ve her iki uçta yer alan bölgeleri epifiz (epiphysis) ismini alır. Sıkı kemikten yapılmış olan diyafiz bölgesi, kemik iliği ile dolu medullar kanal içerir ve periosteum ile çevrelenmiştir. Metafiz ve epifiz bölgeleri süngerimsi kemik yapısındadır. Epifizlerin eklem boşluğuna bakan yüzleri eklem kıkırdağı ile kaplıdır (29) (Şekil 2.1.) (30).

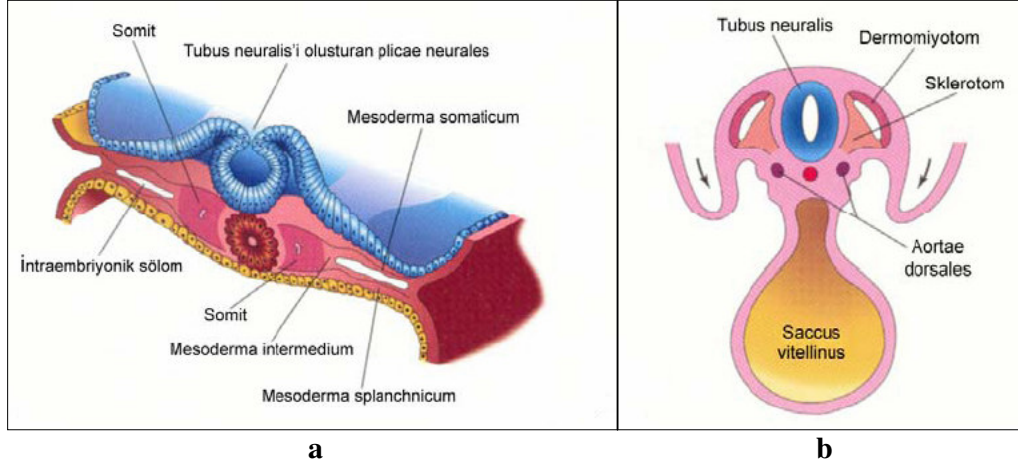


Şekil 2.1. İnsanlarda olgun bir uzun kemiğin anatomik yapısı gözlenmektedir (30)

2.2. Ekstremitte gelişimi

Omurgalılarda iskelet sistemi, paraksiyal mezoderm, mezodermin somatik plağı (lateral plak) ve nöral krestten gelişir. Ekstremiteler lateral plak mezoderminden köken alan somatik mezodermden gelişirken, nöral krest hücreleri baş ve yüz kemiklerini oluşturur. Notokord ve nöral tüp oluşurken, bu yapıların dış

yanında bulunan intraembriyonik mezoderm, longitudinal iki paraksiyal mezoderm sütununu oluşturmak üzere kalınlaşır. Üçüncü haftanın sonuna doğru bu sütunlar somit adı verilen mezodermal doku parçalarına ayrılır. Her somitte daha sonra iki parça oluşur. Bunlar, dermomiyotom ve sklerotomdur. Dermomiyotom, dermatom ve miyotomi bölgelerini içerir. Dermatom bölgesindeki hücreler, derinin dermis tabakasını oluştururken miyotomi bölgesindeki hücreler myoblast'ları (kas hücrelerinin taslakları), oluştururlar. Ventromedialde bulunan sklerotom parçasının hücrelerinden ise omurlar ve kaburgalar gelişir (31, 32) (Şekil 2.2a,b) (32).



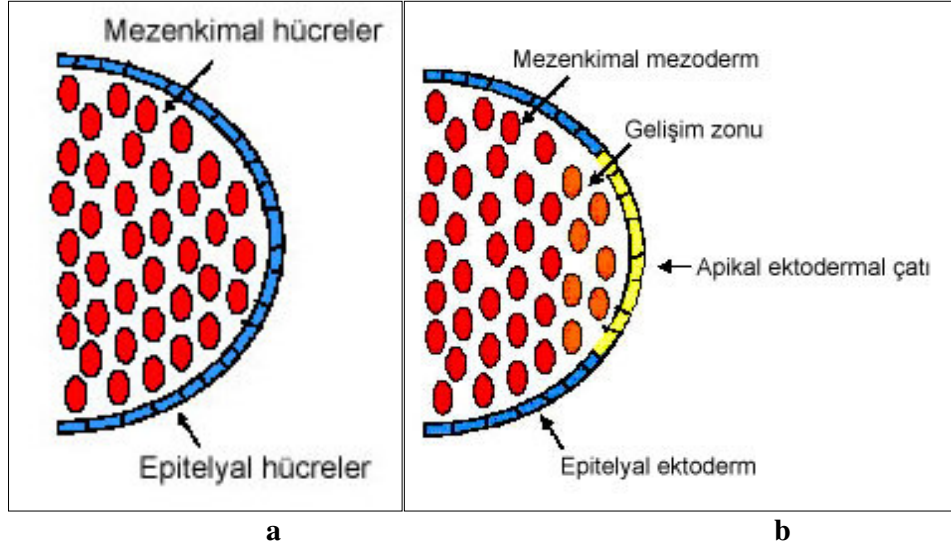
Şekil 2.2a,b. Embriyo gelişiminin erken döneminde somitlerin oluşumu ve erken farklılaşmasını gösteren resimler. a: Yaklaşık 22 günlük bir embriyoda erken somitlerin görüldüğü bir transvers kesit, b: 24 günlük bir embriyonun transvers kesiti, oklar embriyonun horizontal planda katlanmasını göstermektedir (32).

Embriyonik gelişiminin 4. haftasında ventrolateral vücut duvarında kabartılar şeklinde ekstremite tomurcukları belirir. Üst ekstremite tomurcukları 26. veya 27. günde belirginleşirken, alt ekstremite tomurcukları 28. veya 29. günde belirginleşirler (Şekil 2.3.) (33)



Şekil 2.3. Embriyo gelişiminin 4. haftasında ventrolateral vücut duvarında kabartılar şeklinde belirginleşen ekstremite tomurcukları görülmektedir (33).

Her bir ekstremite tomurcuğu ektoderm ile çevrili bir mezenkim kitlesi içerir, daha sonra ektoderm tabakası kalınlaşarak apikal ektodermal çatıyı (AEÇ) oluşturur. AEÇ ile mezenkimal hücreler arasındaki etkileşim ekstremite gelişimi için çok önemlidir. AEÇ, ekstremite mezenkiminde ekstremitelerin gelişmesini ve büyümesini başlatan indüksiyon etkisi gösterir. AEÇ'ye komşu olan mezenkim, hızlı çoğalan farklılaşmamış hücre grupları halinde kalırken, AEÇ'ye uzak bölgelerdeki mezenkim, kıkırdak-kemik modellere ve kan damarlarına farklılaşmaya devam eder (31, 32, 34) (Şekil 2.4a,b.) (35).



Şekil 2.4a,b. Ekstremitenin erken dönem görünümü. a: Yeni gelişmekte olan ekstremite tomurcuğunda ektoderm ile çevrili bir mezenkim kitlesi gözlenmektedir. b: Apikal ektodermal çatı (AEÇ) ile mezenkimal hücreler arasındaki etkileşim (35).

2.3. Kemik gelişimi

Kafatası kemiklerinde olduğu gibi bazı yassı kemikler intramembranöz yolla ekstremitelerin uzun kemikleri ise endokondral yolla gelişimlerini tamamlarlar. Uzun kemik gelişiminde ilk aşama, mezenkim hücrelerinin yoğunlaşması ile ortaya çıkan kıkırdak taslaklardır (31, 32).

2.3.1. İntramembranöz kemikleşme

Mezenkimal doku yoğunlaşmaları içerisinde olduğu için bu ad verilmiştir. Frontal ve pariyetal kemiklerin tamamı ile oksipital ve temporal kemikler, mandibula ve maksillanın bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile gelişir (Şekil 2.5.) (36).

İntramembranöz kemikleşme şu şekilde gerçekleşir:

1. Embriyonik mezenkim, damardan zengin bağ dokuya dönüşür. Kollajen lifleri içeren jelatinöz bir hücre dışı matrikse gömülü fibroblast benzeri mezenkim hücreleri bir araya gelir.
2. Mezenkim hücreleri osteoblastların tipik prizmatik şeklini alır ve kemik matriksi

salgılamaya başlar. Birçok kemikleşme merkezi gelişir ve bu merkezler sonunda birleşerek süngere benzeyen ve dolayısıyla süngerimsi kemik ya da primer spongiyoz olarak adlandırılan anastomozlaşan trabeküllerin bir ağını oluştururlar.

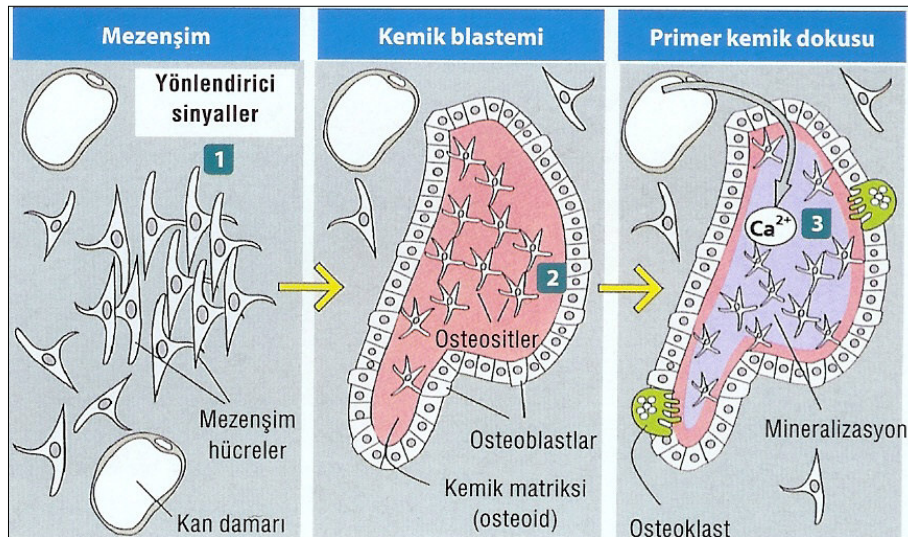
3. Yeni oluşan trabeküllerde kollajen lifleri rastgele dağılım gösterdiğinden erken dönemdeki intramembranöz kemik, ağısı kemik olarak tanımlanır.

4. Kalsiyum fosfat apozisyon ile uzayan kemik matriksinde depo edilir. İntersisyal kemik oluşumu gerçekleşmez.

5. Kemik matriksi mineralizasyonu, 2 yeni gelişime öncülük eder: **1.**Trabeküllerin kalınlaşması ile osteoblastların osteositler şeklinde hapsedilmesi, **2.**Perivasküler kanalların kısmen kapanması ile mezenkim hücrelerinin kan-yapıcı hücrelere dönüşmesi.

Osteositler kanaliküller içindeki sitoplazmik uzantılarla birbirlerine bağlanırlar ve kan damarlarına komşu osteoprogenitor (öncül) hücrelerden yeni osteoblastlar oluşur (36).

1-Mezenkimal hücreler kıkırdak ara maddesi olmaksızın bir araya toplanırlar. Bu olay Wnt, Hedhehog, fibroblast büyüme faktörü ve transform edici büyüme faktörü- β ailelerinin polipeptitlerinden oluşan yönlendirici sinyaller tarafından kontrol edilir.
2-Mezenkim hücreleri osteoblastlara farklılaşır. Kemığın primitif şekli olan kemik blastemi gelişir. Blastemin içindeki osteositler fonksiyonel bir sınısıyım oluşturacak şekilde birbirlerine hücre uzantılarıyla bağlanırlar. Osteoblastlar, kemik blasteminin yüzeyini döşer.
3-Kemik matriksi (osteoid) osteoblastlar tarafından depolanır. Daha sonra Ca^{2+} kan damarları tarafından taşınır, mineralizasyon işleminde kullanılır ve primitif (birincil) kemik dokusu oluşur. Osteoblastlar, kemik dokusunun şekillenmesini başlatır.



Şekil 2.5. İnamembranöz kemikleşme basamakları (36)

2.3.2 Endokondral kemikleşme

2.3.2.1. Uzun kemik kıkırdak modeli gelişimi ve primer kemik oluşumu

Endokondral kemik oluşumu, kıkırdak taslaklarında görülür. Primitif kemik yapılarının oluşumunda ilk aşama mezenkim hücrelerinin yoğunlaşması, ardından kıkırdağın meydana gelmesi ve daha sonra kıkırdağın yerini kemiğe bırakmasıdır. Bu tür kemikleşme özellikle uzun kemiklerin şekillenmesinden sorumludur (31, 32, 36, 37). Bu süreçte kondrogeniz olayı oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Endokondral kemik gelişimi basamakları özetlenecek olunursa (Şekil 2.6a-d.) (37):

1. Lateral plak mezoderminden köken alan mezenkim hücrelerinin, primitif ekstremitte tomurcuğu bölgelerine göçleri ve mitoz yolu ile proliferasyonları (Şekil 2.6a.),

2. Prolifere olan bu mezenkim hücrelerinin ekstremitte tomurcuklarının merkez orta bölgelerinde birbirlerine yaklaşmaları ve hücre kümeleri oluşturarak yoğunlaşmaları (Şekil 2.6b.) (37).

Bu işlem kondroprogenitör mezenkimal hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Nöral kadherin (N-cadherin), Nöral-Hücre Adhezyon Molekülü (N-CAM) gibi hücre bağlantı molekülleri oldukça önemli rol oynar. Kondrogenik yoğunlaşmanın ilk sinyallerinden biride TGF- β sentezidir ki bu molekül aynı zamanda fibronektin sentezini de uyararak N-CAM'ın regülasyonunda rol oynar. Sonraki evrelerde N-cadherin ve N-CAM farklılaşmış kondrositlerde kaybolurken sadece perikondriyal hücrelerde varlığını sürdürür. Bu dönemde hücre dışı matriks (ESM), mezenkim hücrelerinin birbirleri ile yakın temaslarına izin veren bir yapıda olup Kollajen Tip-1, hyaluronan, tenascin, fibronektin gibi faktörlerden zengindir (38-40).

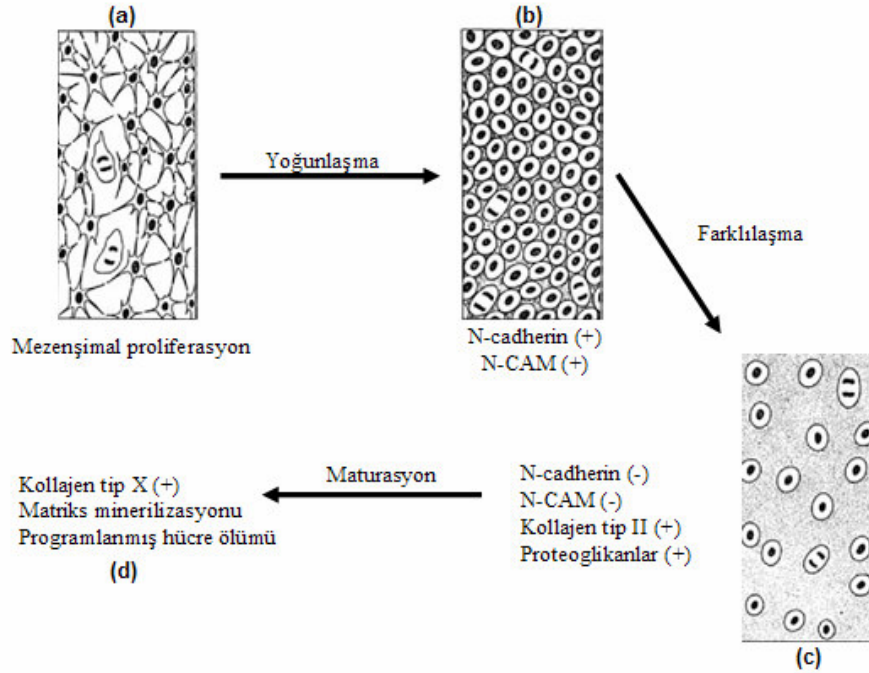
Ayrıca, prekondrogenik mezenkimal hücrelerde spesifik olarak eksprese edilen transkripsiyon faktörü *Scleraxis*'in, kıkırdağa özel genlerin transkripsiyonlarını tetiklediği de gösterilmiştir (41). Bu protein, kıkırdak doku yerini kemik dokuya bırakıncaya kadar aktif kalır. Yine önemli bir transkripsiyon faktörü olan *Sox9* geninin de spesifik olarak prekondrogenik yoğunlaşma bölgelerinde eksprese edildiği ve bir sonraki aşama olan mezenkimal-kondrogenik değişimi tetiklediği bilinmektedir (42).

Bunların yanında Fibroblast Growth Faktörü (FGF), Hedgehog, Morfogenetik Kemik Proteini (BMP) ve Wnt yolları, dorsoventral ve anteroposterior eksenlerde doğru düzenlemeyi sağlamak için ekstremitenin üç eksenli boyunca sinyalleri koordine eder (43). BMP'ler ektopik endokondral kemikleşmede önemli ölçüde rol oynamaktadır. Kemik morfogenezinde, kondroprogenitör hücre tayini ve farklılaşmasında etkilidirler. Ayrıca, daha sonraki aşamalarda, kondrosit maturasyonu ve terminal farklılaşmada hipertrofik kondrositleri kontrol ederler. Hem in vitro hemde in vivo çalışmalarla BMP sinyallerinin öncelikle kıkırdak yoğunlaşmasında ve kondrosit prekürsörlerinin tayininde rol oynadıkları gösterilmiştir (44, 45)

3. Yoğunlaşmış mezenkim hücrelerinin birbirleri ile olan hücreler arası bağlantıları kaybederek kondrositlere değişimleri (Şekil 2.6c.) (37). Bu evrede, kondrositlerdeki N-cadherin ve N-CAM ekspresyonlarında belirgin bir azalma gözlenir (46-48). Ayrıca kondrositlerden kıkırdak dokuya özgü bir ESM sekresyonu ve kondrositler arası ortamda depolanması başlar. Bu dönem, kollajen II, IX, XI ve

agrekant içeren kıkırdak matriksinin oluşumuyla karakterizedir. Bunların yanında *Gla* proteini, kondroidin 5 sülfattan zengin proteoglikanlar ve bağlantı (link) proteini salgılanmaya başlar (38-40).

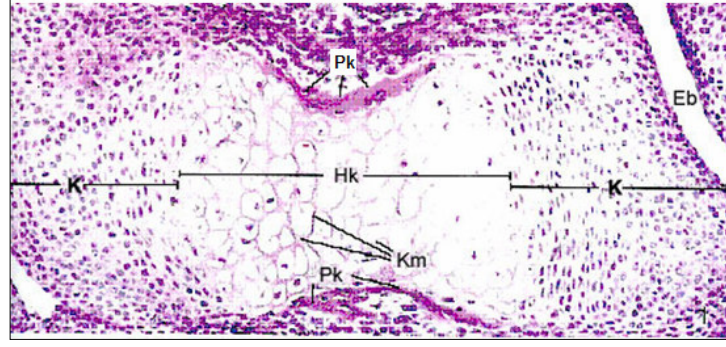
4. Kondrositlerin olgunlaşmaları, hipertrofiye uğramaları ve matriks mineralizasyonu başlar (Şekil 2.6d.) (37). Bu dönemde tipik olarak ESM'deki Kollajen Tip-II, IX ve XI yerlerini Kollajen Tip X'a bırakırlar ve ESM daha fazla fibronektin ve daha az proteaz inhibitörü içerir (38-40).



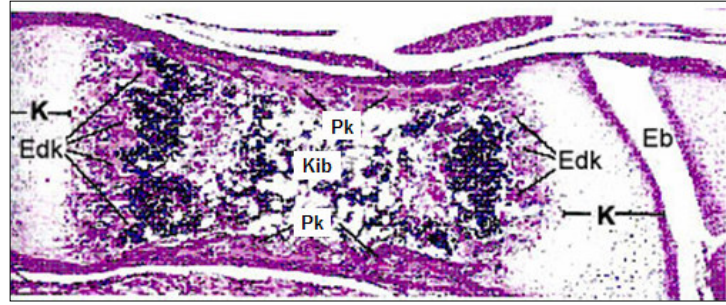
Şekil 2.6a-d Endokondral gelişim basamakları (37)

- a: Primitif ekstremite tomurcuğunda, lateral plak mezoderminden köken alan mezenkim hücrelerinin proliferasyonları,
- b: Mezenkim hücrelerinin birbirine yaklaşmaları ve yoğunlaşmaları,
- c: Mezenkim hücrelerinin kondrositlere değişimi,
- d: Kondrositlerin olgunlaşmaları, hipertrofiye uğramaları ve matriks mineralizasyonu.

Hipertrofik zonlarda kıkırdak hücreleri hipertrofiye uğrarlarken Kollajen Tip-X bakımından zenginleşen ESM, kalsifiye olmaya başlar. Bu olayı öncelikli olarak diyafizyal bölgede vasküler dokunun perikondriumdan kıkırdak dokusuna infiltrasyonu ve osteoprogenitör hücrelerin kıkırdak dokuya taşınması izler. Bu yolla aynı zamanda ileride kemik iliğini oluşturacak hücreler de kıkırdak dokuya taşınmaya başlanır. Eş zamanlı olarak hipertrofiye kondrositlerde planlanmış hücre ölümü (apoptoz) gözlemlenirken, osteoprogenitör hücreler de osteoblastik hücrelere değişim göstermeye başlarlar. Ortaya çıkan apoptotik hücre yapıları kemik matriksinin mineralizasyonunda önemli rol oynarlar. Bu yolla primer kemikleşme merkezlerinden başlayan kemikleşme uzun kemiklerin her iki ucunda yer alan epifiz bölgelerine doğru ilerleyerek devam eder (Şekil 2.7a,b.) (49).



(a)



(b)

Şekil 2.7a,b. Endokondral kemik gelişim aşamaları (49)

a:Endokondral kemik gelişiminin erken evrelerinde kıkırdak modelin yerini kemik dokuya bırakmaya başladığı görülmektedir H&E x240 b:Endokondral kemik gelişiminin daha ileri bir aşaması gözlenmektedir H&E x60

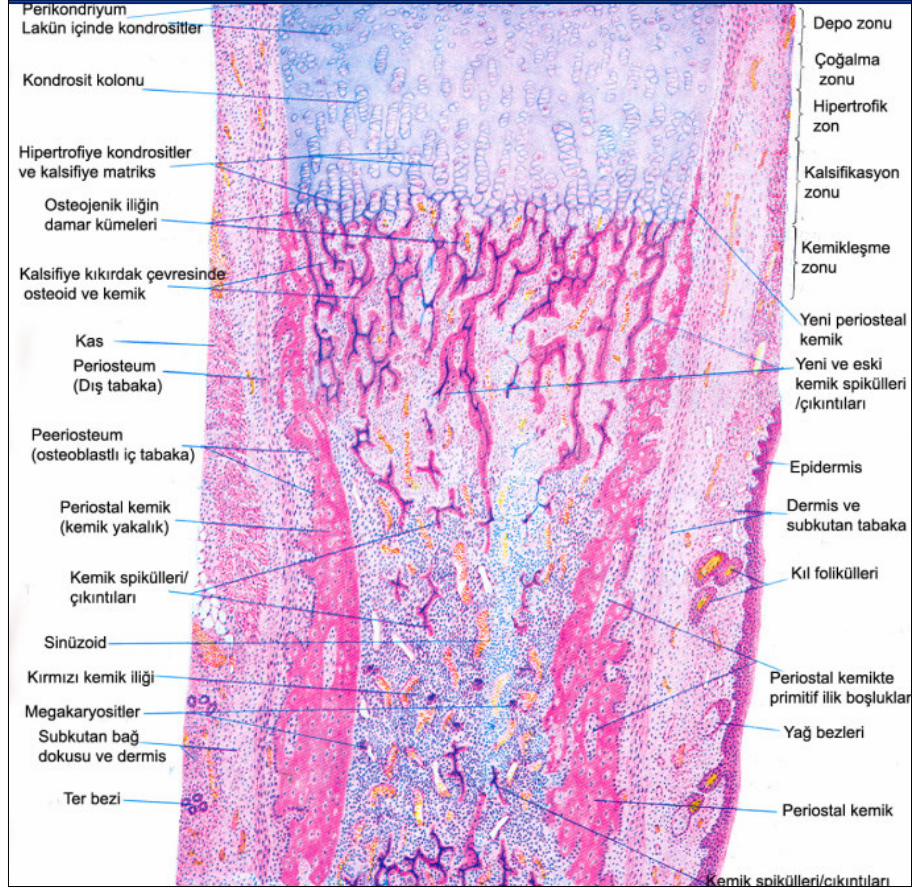
2.3.2.2. Primer kemikleşme merkezinin epifiz kıkırdağı bölgelerinde ilerlemesi

Endokondral kemikleşmede bahsedildiği gibi diyafizin merkezinde kemiğin depolanması, önceki kıkırdak modelinin erozyona uğramasıyla gerçekleşir. Bu erozyon bölgesi primer kemikleşme merkezi olarak bilinir ve kemik bir halkanın oluşumu ile paralel olacak şekilde modelin her iki yönüne doğru ilerler. Kıkırdağın yavaş yavaş ortadan kaldırılması sonucu kıkırdak model diyafiz bölgesinde zayıfladıkça kıkırdak modelin çevresinde oluşan kemik halka diyafiz orta bölgesinin dayanıklılığını üstlenir. Kıkırdağın erozyonu ve kemik depolanması olayı histolojik olarak gözlenebilir. Bu olay daha ayrıntılı olarak ele alındığında, kıkırdak yüzeyinden başlayıp erozyon bölgesine doğru 5 temel zon (bölge) ayırt edilmektedir (Şekil 2.8.) (50).

1- Depo (Rezerv, dinlenim) zonu: Primitif hiyalin kıkırdaktan oluşur. Çoğalma zonu hücrelerine kaynaklık eder ve ileride oluşacak büyüme plağı ile birlikte kemiğin boyuna büyümesinden sorumludur. Diyafiz bölgesinde osteoklast aracılı erozyon takibi sürerken depo zonu kondrositleri erozyondan kaçışı (running away) sürdürürler.

2- Çoğalma (Proliferatif) zonu: Kıkırdak modelin uzun eksenine paralel hücresel sütunlar şeklinde uzanan kondrositlerin aktif olarak çoğalması ile karakterizedir. Mitotik olarak aktif olan bu bölge, kemiğin uzamasını belirleyen bir mekanizma olan kaçış (running away) bölgesini temsil eder.

3- Hipertrofik zon: Bu zonda kondrositlerin çekirdek ve sitoplazmaları şişerek hipertrofi'ye uğrarlar. Lakünalar genişler. Kondrositlerde hipertrofinin nedeni, sitoplazmada glikojen ve lipit birikiminin artması ile çekirdeğin şişmesidir. Hücredeki hipertrofi sonucunda, laküna da hipertrofiye uğrar. Tip X kollajenin salgılanması, endokondral kemikleşme boyunca hipertrofik kondrositlerin bir belirteçidir. Bu bölgedeki kondrositler önemli şekilde büyüktür (hipertrofik).



Şekil 2.8. Doğum öncesi dönemde gelişmekte olan uzun kemik ve epifiz kıkırdaklı zonları gözlenmektedir (50).

Bundan dolayı, komşu hücre sütunlarını ayıran bölme (septa), hipertrofik kondrositlerin neden olduğu sıkıştırma etkisinden dolayı daha ince görünür.

4- Kalsifikasyon zonu: Bu bölge, hem kondrosit apoptozu hemde daha önce çoğalan kondrosit sütunlarını çevreleyen teritoryal matriksin kalsifikasyonu ile tanımlanır. Hipertrofiye kondrositin sitoplazması vakuolleşmeye, çekirdek piknotikleşmeye ve ince kıkırdak alanları kalsifiye matriks tarafından çevrilmeye başlar. Lakünalar genişler, hücrelerde dejenerasyon başlar ve lakünler arasında kalan ince kıkırdak matriksi kalsifiye olur. Kalsifiye kıkırdak, Hematoksilin-Eozin boyamalarında koyu mor boyanır.

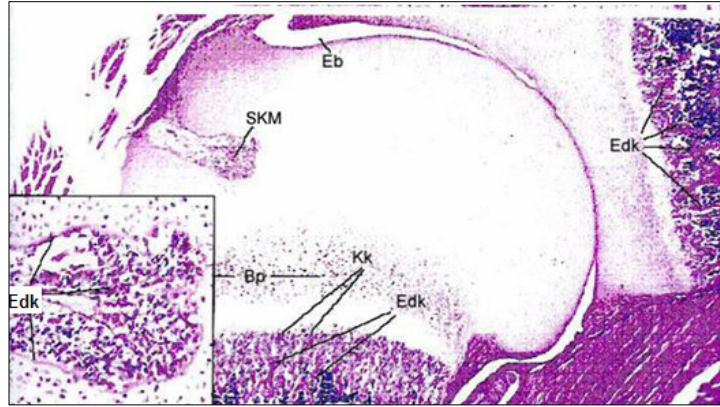
5- Kemikleşme zonu: Hematopoyetik hücreler tarafından doldurulan, gelişen kemik iliği boşluğundan köken alan kapiller tomurcukların kapalı uçlarını içerir. Kan damarlarının enine bölmeyi (septayı) deldiği ve beraberlerinde göçeden osteoprogenitör hücreleri taşıdıkları bölgedir. Osteoprogenitör hücreler, kalsifiye kıkırdağın açıkta kalan kısımlarının yüzeyini kaplayan osteoblastlara öncülük eder ve osteoid depolamasını başlatır. Osteoid, hücre dışı matriks içerisinde gömülü bol miktarda tip I kollajen liflerini içerir. Kıkırdak sütunlar yavaş yavaş kemikle yer değiştirir. Osteoidin depolanması osteogenezin başladığını gösterir. Kemik spikülleri (çıkıntıları, dikenleri) ve sonrasında da trabekül (bölme) oluşumu gerçekleşir. Sonuçta, kalıbın orta kesiminde geçici kemik (cancellous) görünür. Kemikleşme olayı komşu çoğalma zonlarına doğru ilerledikçe (bir "takip" etkisi) kıkırdak kaybı ve yeni oluşan kemik çıkıntılarının osteoklastlar tarafından aşındırılması nedeniyle kemik iliği boşluğu artar.

Endokondral kemikleşmeden sonra uzun kemiğin genel organizasyonu, belli alanlarda osteoklastlar tarafından gerçekleştirilen yeniden emilme (reabsorbsiyon) ve diğer alanlarda yeni kemiğin depolanması ile yeniden şekillendirilir. Sonuç olarak, süngerimsi kemiğin yerini sıkı (kompakt) kemik alır; bu olayda, kan damarları tarafından doldurulan uzun boşlukların yüzeyinde yer alan osteoblastlar kemik ya da lamel tabakaları üretirler. Konsantrik şekilde düzenlenen kemik lamelleri bir kanal içinde hapsedilen kan damarlarının etrafını çevreleyerek ilkel (primitif) havers sistemini oluşturur (36, 49, 50).

2.4. Sekonder kemikleşme merkezi gelişimi, eklem kıkırdağı ve epifiz büyüme plağı yapıları

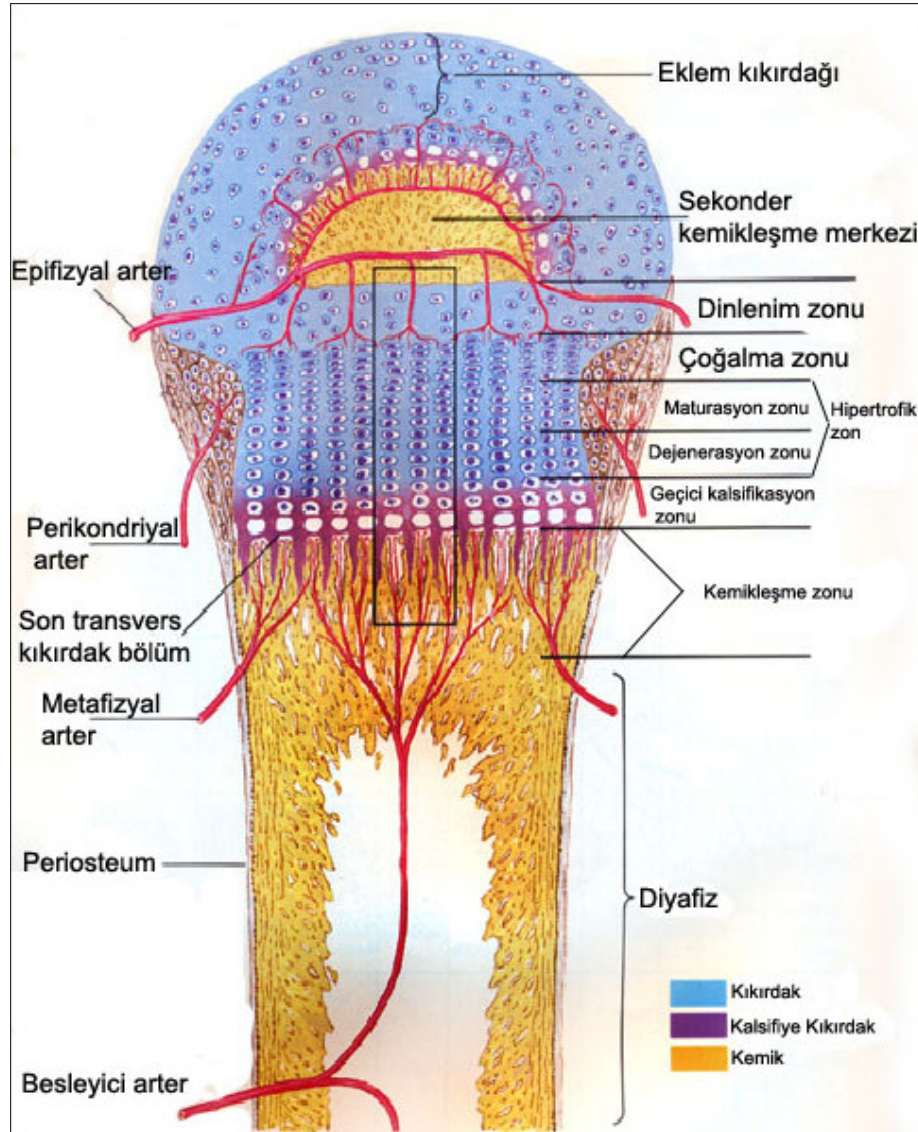
2.4.1. Sekonder kemikleşme merkezi gelişimi

Doğumdan sonra epifizlerde, **sekonder kemikleşme merkezleri** gelişir (Şekil 2.9.) (49).



Şekil 2.9. Doğum sonrası dönemde epifiz kıkırdağında sekonder kemikleşme merkezinin ortaya çıkışı gözlenmektedir. H&E x60; ilave x200 (49).

Bu bölgeler de diyafizde olduğu gibi, hipertrofik kondrositler tarafından işgal edilen boşluklar, kan damarları ve perikondriumdan gelen osteoprogenitör hücreler tarafından kaplanır. İlerleyen aşamalarda bu bölüm dışında kalan bölge süngerimsi kemikle yer değiştirir ve sekonder kemikleşme merkezi (SKM) ismini alır. Sekonder kemikleşme merkezinin ortaya çıkmasından sonra eklem yüzeyi ile sekonder kemikleşme merkezi arasında kalan hiyalin kıkırdak bölgesi eklem kıkırdağı, primer kemikleşme merkezi ile sekonder kemikleşme merkezi arasında kalan hiyalin kıkırdak bölgesi epifiz büyüme plağı ismini alır. Bu bölge embriyonik ve doğum sonrası erken devrede görülmez. Daha sonraki gelişme evrelerinde görülmeye başlar (2, 29, 37) (Şekil 2.10.) (2).



Şekil 2.10. Doğum sonrası dönemde belirginleşmiş eklem kıkırdağı, sekonder kemikleşme merkezi ve epifiz büyüme plağı gözlenmektedir (2)

Doğumdan sonraki dönemin ilerleyen yaşlarında, olgunluk dönemine kadar epifiz, büyüme plağı çizgisi şekline indirgenir ve uzun kemik artık daha fazla uzamaz. Eklem kıkırdağı ise yaşam boyu varlığını sürdürür.

2.4.2. Eklem Kıkırdağı

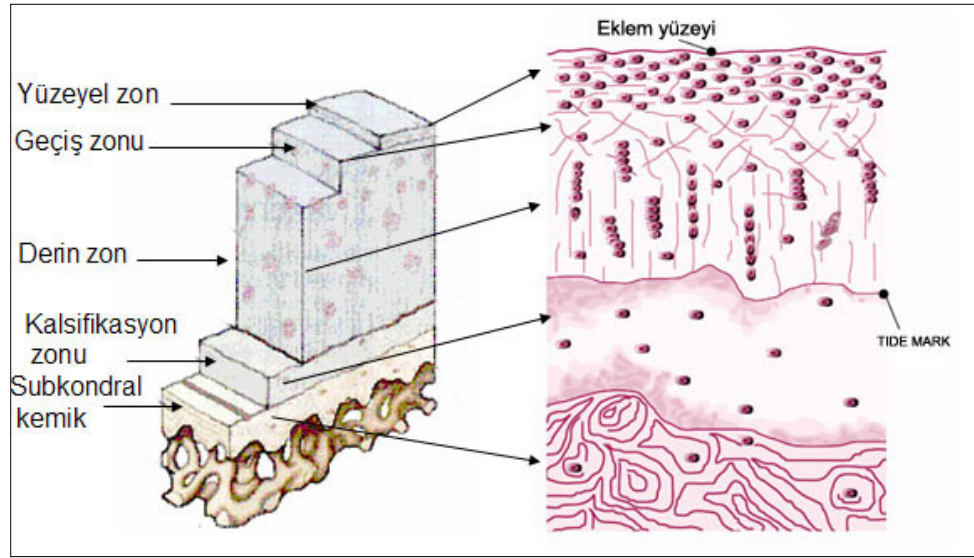
Hiyalin kıkırdak yapısında olan ve yüzeyinde perikondrium bulundurmeyen erişkin eklem kıkırdağı 2-5 mm kalınlığında olup 4 farklı zondan oluşur (Şekil 2.11.) (49).

1- Yüzeysel (Süperfisyal, tangential, surface) zon: En yüzeyde yer alan ve basınca maruz kalan zondur. İki farklı tabakadan oluşur. Eklem yüzeyini kollajen fibrillerce zengin olan bir kılıf çevreler. Bu kılıf lamina splendens olarak adlandırılır. (51-53). Hemen altında uzamış ve yassılaştırmış kondrositlerle birlikte Tip II kollajen fibrillerini içermektedir. Bu fibriller serbest yüzeye paralel olacak şekilde dizilim gösterirler (29, 49). ESM diğer tabakalara oranla daha çok kollajen ve daha az proteoglikan içerir. Yoğun olarak fibronektin ve su içerir. Fibronektin, $\alpha 5\beta 1$ tipi integrin reseptörü ile kondrosit membranına bağlanır (54). Bu moleküler kompozisyon ile eklem yüzeyindeki gerilim ve basınca dayanıklılık sağlanır (51-53). Bu bölgedeki hücreler özellikle lateral yüzeylerinde ve derin yüzeylerinde küçük sitoplazmik uzantılara sahiptirler. Seyrek mitokondrilere ve küçük sisternalı granüllü endoplazmik retikulumlar (GER) içerirler. Golgi kompleksleri çok belirgin değildir. Yüzeysel zonda dizilim gösteren fibriller, derinlere doğru çap ve yoğunluklarında artış gösterir. Yüzeysel zonda bir ağ oluşturan sıkıca paketlenmiş kollajen fibriller yüzeye paraleldir ve çapları $5\mu\text{m}$ 'den $20\mu\text{m}$ 'ye kadar değişiklik göstermektedir. Bu bölge glikozaminoglikanlardan fakir olmasına karşın, hyaluronik asid bakımından zengindir (29).

2- Geçiş (Transisyonel, intermediate) zonu: Geçiş zonu yüzeysel zona göre daha fazla yer tutar. Yüzeysel zonun hemen altında yer alır. Buradaki hücreler daha yuvarlak ve matrikse gelişi güzel dağılım gösterirler (49). Bu tabakadaki hücreler endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı ve mitokondri içerirler. ESM daha geniş kollajen fibril, daha fazla proteoglikan içerirken yüzeysel zona göre daha az kollajen ve su bulundurur (51-53). Hücreler tek tek yada ikili hücrelerden oluşmuş izogen gruplar şeklindedir (29). Kollajen fibriller, eklem kıkırdağı yüzeyine oblik düzende olacak şekilde yerleşim gösterirler (49).

3- Derin (Radial, deep) zon: Bu zon en geniş çaplı kollojen fibrilleri, en yoğun proteoglikan içeriğini ve en az su miktarını içerir. Hücreler geçiş zonundaki gibi yuvarlaktır fakat eklem kıkırdağı yüzeyine dik konumda sütunlar şeklinde dizilim gösterirler. Bu hücreler yüzeysel zon hücrelerine göre 10 kat daha fazla aktiftirler. (51-53). Bu zondaki kollajen fibriller hücre dizilimine uyum sağlayarak paralel sütunların arasında kemiğin uzun eksenine doğrultusunda yerleşim gösterirler (29, 49). Bu zonun altındaki tidemark içeriği tam olarak bilinmemekle beraber kalsifiye dokunun başlangıcı olarak nitelendirilmektedir. Bu alanda matriks fibronektin, agrekan, Tip II ve Tip IX kollajen bakımından zengindir. Erişkin insan eklem kıkırdağında kollajen sirkülasyonu (turnover) oldukça yavaştır (55).

4- Kalsifikasyon (Calcifying, calcified, calcification) zonu: Sahip olduğu küçük kondrositler ve kalsifiye matriks ile karakterizedir. Hücreler burada endoplazmik retikulum içermezler. Bazı alanlarında tamamen kalsifiye kıkırdak ile çevrili oldukları gözlenmektedir ki bu da bize metabolik aktivitelerinin çok düşük olduğunu gösterir. Bu zon, derin zondan tidemark adı verilen düzgün yüzeyli fakat dalgalı bir yapıyla ayrılır. Subkondral kemiğe komşu ince bir kalsifiye kıkırdak tabakası olarak tanımlanır. Yumuşak hiyalin kıkırdaktan kemiğe geçişte rol oynar. Tidemark üzerinde kondrositler prolifer olup yeni hücreler oluşturarak, interstisyel büyümeyi sağlarlar. Artiküler kıkırdak yenilenmesi yeni oluşan kondrositlerin eklem yüzeyine doğru göçleriyle gerçekleşir (49). Yaşa bağlı olarak tidemark hattının yükselmesiyle artiküler kıkırdak inceler ve kalsifiye kıkırdak kemik ile yer değiştirir (29).

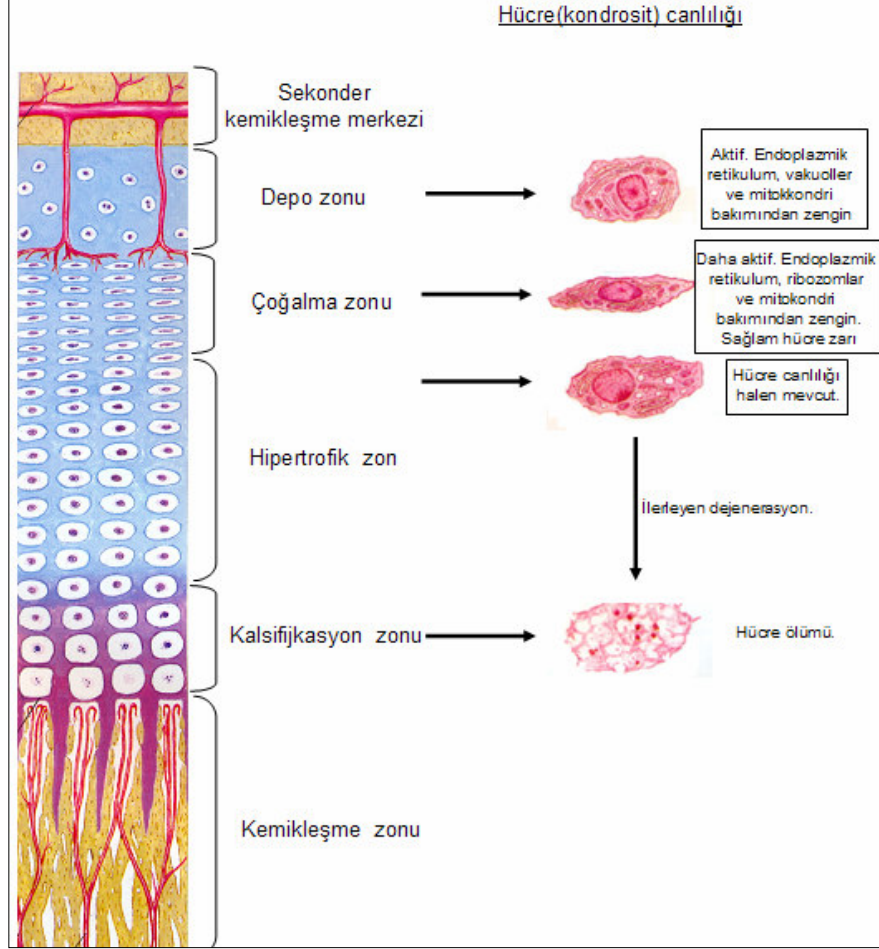


Şekil 2.11. Erişkin eklem kıkırdağı zonlarının şematik görünümü (49)

Olgun eklem kıkırdağın yenilenmesi oldukça yavaştır. Bu olay stabil olan kollajen Tip I ağına ve uzun yarılanma ömrüne sahip proteoglikan moleküllerine bağlıdır. Sağlıklı artiküler kıkırdakta metalloproteinazların aktivitesi düşüktür (49).

2.4.3.Büyüme Plağı

Büyüme plağı kıkırdak, kemik ve fibröz komponentleri de içeren bir yapıdır. Fetal kıkırdak taslağından sonra oluşan pirimer kemikleşme merkezinin iki ucunda kemiğin periferal uzamasından sorumlu iki plak şeklindedir. 5 farklı zondan oluşur (2) (Şekil 2.12.) (2).



Şekil 2.12. Epifiz plağı zonlarının şematik görünümü (2)

1- Depo (Dinlenim,Resting) zonu: Bu zonun görevi, depolama ve matriks üretimidir. Sekonder kemikleşme merkezinin hemen altında yer alır. Lipid ve diğer materyalleri depoladığı gözlenen hücreleri barındırır. Hücreler küresel şekillidirler ve tek tek yada gruplar halinde bulunabilirler. Bu zonda hücreler diğerlerine göre daha azdır ve hücreler arası matriks daha yoğundur. Matriks var olan nötral polisakaritlerle yada proteoglikan agregatlarıyla pozitif histokimyasal reaksiyon gösterir. Sitoplazma, glikojen için pozitif boyanma sergiler. Elektron mikroskopi bulgularına göre, bu zondaki hücreler yaygın bir şekilde endoplazmik retikuluma sahiptirler ki bu protein sentezinin olduğunun açık bir göstergesidir. O₂ basıncı düşüktür; bunun anlamı, kan damarları dinlenim zonunu geçer ve bu bölgeye destek sağlamazlar. Dinlenim zonundaki kondrositler proliferere olmazlar ya da nadiren bu olayı gerçekleştirirler.

2- Çoğalma (Proliferasyon, hücre kolonları) zonu: Bu zon, boyuna büyüme için matriks üretiminden ve hücrel proliferasyondan sorumludur. Kondrositler düzleşmiştir ve kondrositlerin uzun eksenleri kemiğin uzun eksenine dik olacak şekilde uzunluğuna sütunlar şeklinde sıralı bir dizilim gösterirler. Endoplazmik retikulumlar bu zonda yoğunlaşmıştır. Sitoplazma glikojen için pozitif özellik gösterir. Birkaç istisna dışında proliferasyon zonunda bulunan kondrositler kırıldık bölgesinde bulunan ve bölünebilen tek hücrelerdir. Her sütunun en üstünde bulunan hücre o sütun için 'ana' hücre olarak nitelendirilir. Proliferatif zonun en üst kısmı büyüme plağı için ana doğurucu tabaka olarak nitelendirilmektedir. Büyüme plağındaki boyuna büyüme, proliferatif zonda bulunan en üstteki hücrelerin üretim oranına ve hipertrofik zondaki kondrositlerin maksimum boyutlarına ulaşmasına bağlıdır. Çoğalma zonunun en üst tabakasının sahip olduğu zengin damar ağından dolayı PO_2 bu bölgede en yükündür. Kondrositlerdeki yüksek oksijen basıncı ve glikojen varlığı glikojen depolanmasıyla birlikte aerobik metabolizmanın varlığına işaret etmektedir.

3- Hipertrofik zon: Bu zon matriksi kalsifikasyon için hazırlar ve kalsifiye olmasını sağlar. Bu zondaki kondrositler küresel hal alıp, proliferasyon zonundaki boyutlarının yaklaşık 5 katı kadar genişleşmişlerdir. Zonun üst kısmındaki kondrosit sitoplazmaları glikojen pozitif iken, alt kısımda aniden glikojen negatife dönüşmüşlerdir. Elektron mikroskop gözlemlerine göre, zonun üst yarısındaki hücreler normal görümlü olup sitoplazmik içerikleri eksiksizdir fakat alt yarıdaki hücreler toplam sitoplazmik hacmin neredeyse %85'ini oluşturacak şekilde boşluklara sahiptirler. Hipertrofik zon avasküler yapıdadır ve bu yüzden PO_2 oldukça düşüktür. Zonun alt kısmında glikojen tamamen tükenmiştir. Mitokondriyonlar için herhangi bir enerji kaynağı bulunmamaktadır. Enerji için kalsiyumun tekrar kazanılması saklanması gereklidir, fakat buna karşın kondrositler glikojen içeriğini serbest bırakarak tamamen tüketmişlerdir. Bu basamak matriks kalsifikasyonunda rol oynuyor olabilir.

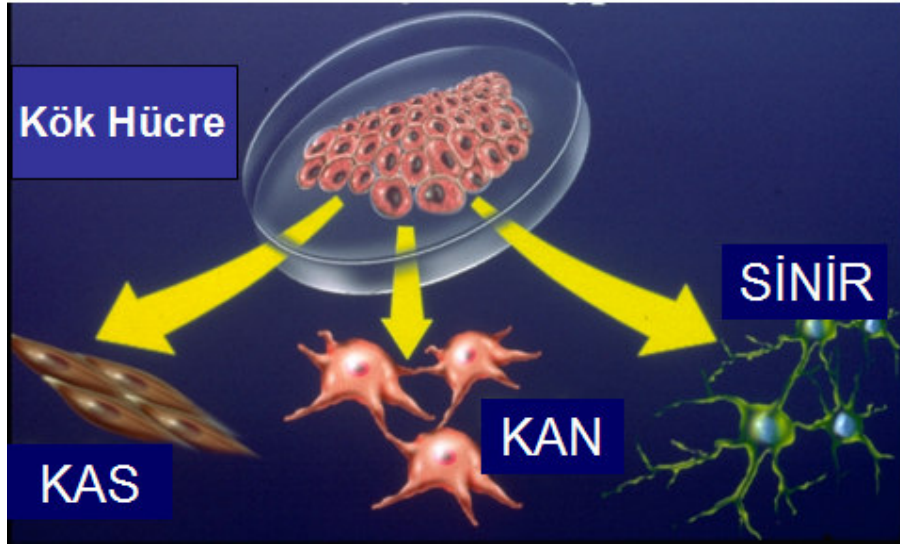
4- Kalsifikasyon zonu: Hipertrofik zonun alt kısmında kalsifikasyonun başladığı bölge, geçici kalsifikasyon zonu olarak adlandırılır. Bu zonun hücre dışı matriksinde matriks granülleri oldukça yükündür. Bu yapılar kondrositler tarafından üretilirler. Matriks granülleri küçüktürler (1,000-1,500 Å çapında) ve üç katlı bir membran ile çevrilidirler. Matriks granülleri pirofosfatı yıkan pirofosfataz gibi iş gören alkalinfosfataz bakımından zengindirler. Matriks granülleri, hipertrofik zondaki kalsiyum kaybeden mitokondriyonlar yerine kalsiyum depolamaya başlar. Buna göre mitokodriyal kalsiyum büyüme plağında kalsifikasyonun başlaması sürecine katılır denilebilir. Kalsifikasyon, hidroksiapatit kristallerinin formasyonu ile başlar. Kristallerin büyümesi ve artışıyla longitudinal bölümlerde kalsifikasyon gerçekleşir. Geçici kalsifikasyon zonunda matriks kalsifikasyonu hücreiçi matriksi metabolitlere karşı daha az geçirgen hale getirir. Büyüme plağında, hipertrofik zon sahip olduğu yüksek mineral içeriğinden dolayı en düşük geçirgenlik katsayısına sahiptir. Bu zonda, hücre membranı ile çekirdek zarı yoğun bir şekilde parçalanmış, bunun yanında birkaç mitokondri dışında sitoplazmik komponentlerde kayıp olmuş ve endoplazmik retikulum parçalarının sitoplazmaya dağılmış olduğu gözlenir (2)

5- Kemikleşme zonu: Bu bölgede endokondral kemik dokusu ortaya çıkar. Periosteumdan kaynaklanan hücrelerin bölünmesi ile oluşan osteoprogenitor hücreler ve kan kapillerleri kırıldak hücrelerinin geride bıraktıkları lakünalar içerisine girer. Osteoprogenitor hücreler, osteoblastları oluştururlar. Bu hücreler, kalsifiye kırıldak matriksinin yüzeyini aralıklarla kaplayarak kemik matriksini oluşturmaya başlarlar.

2.5. Kök Hücre

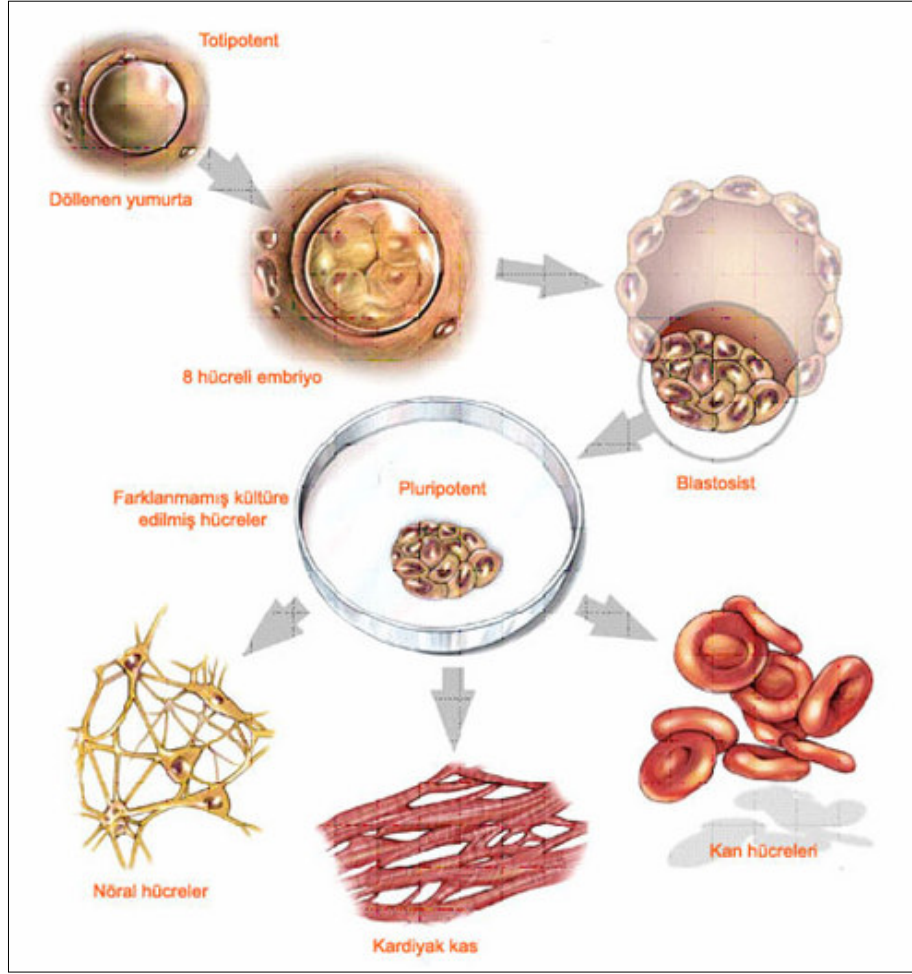
Canlı vücudunda çok uzun süre bölünerek kendini yenileyebilen, aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir.

Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler, sınırsız bölünebilme, kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir (Şekil 2.13.) (56).



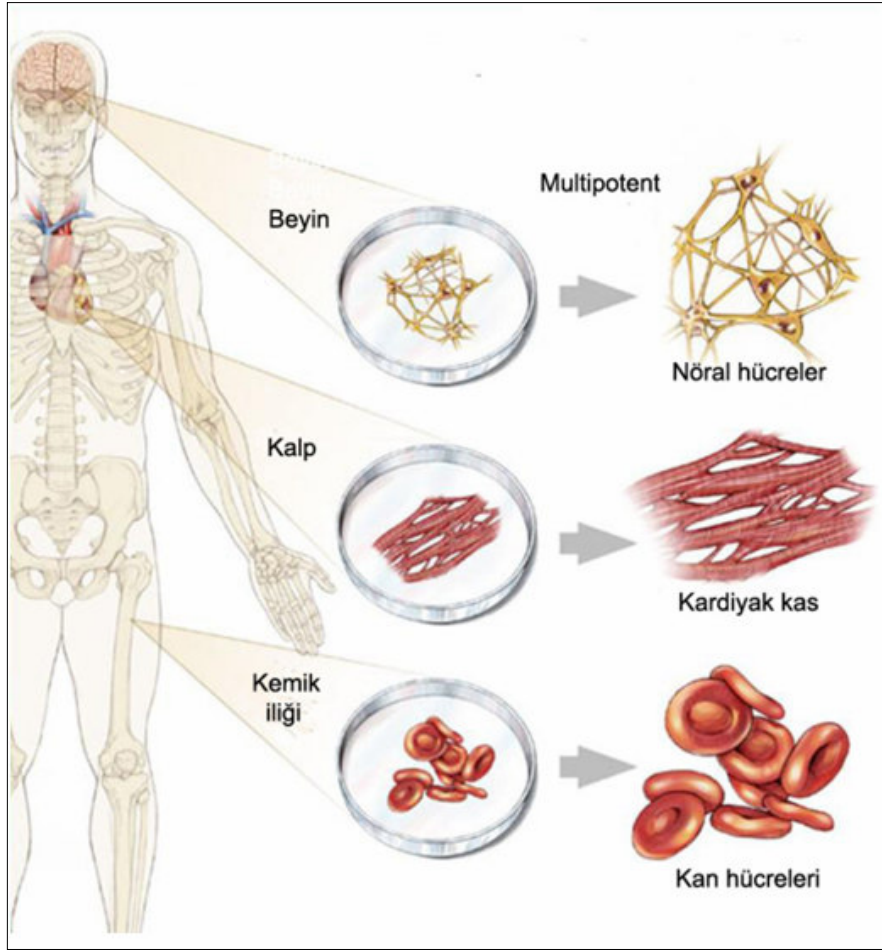
Şekil 2.13. Kök hücreler pek çok farklı hücre tipine farklılaşabilir (56).

İnsan türü, anneden ve babadan gelen gametlerin birleşmesiyle oluşan zigot adı verilen diploid hücrenin çoğalmasıyla meydana gelir. Döllenmeden yaklaşık 5 gün sonra 150 civarında hücreye sahip ve içi sıvı ile dolu bir yapı oluşur. Bu yapı blastosist olarak adlandırılır. Blastosist bir kum taneciğinden daha küçüktür ve içerisinde iki tür hücre grubu barındırmaktadır. Bu yapının dış kısmı trofoblast hücrelerince oluşturulur ve ileride plasenta ile birlikte ekstraembriyonik yapıları meydana getirir. Bu yapının iç kısmında bulunan hücreler ise iç hücre kitlesi ismini alır ve ileriki dönemlerde embriyoyu oluşturur. Bu hücre kitlesi, her üç germ yaprağına (ektoderm, mezoderm ve endoderm) ait hücre ve dokuları oluşturmak üzere çoğalıp yönleneceklerdir ve tıp dilinde pluripotent kök hücreler olarak adlandırılırlar (Şekil 2.14.) (57). Pratikte embriyonik kök hücre denince blastosist içerisindeki embriyoblast denilen ve bebeği oluşturmak üzere farklılaşmış hücreler anlaşılır.



Şekil 2.14. Pluripotent kök hücreleri üç farklı germ yaprağına ait hücre tiplerine farklılaşabilir (57)

Kök hücreler aynı zamanda embriyonun fetus aşamasında, doğumla birlikte kordon kanında ve yetişkin vücudunda da özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar. Embriyonik kök hücrelere göre gelişmenin daha sonraki basamaklarında görülen bu hücreler elde edildikleri döneme göre giderek daha sınırlı bir bölünme ve farklılaşma yeteneği gösterirler. Yetişkin kök hücreler daha ziyade elde edildikleri organ ve dokuya dönüşme eğilimindedirler ve multipotent kök hücreler olarak adlandırılırlar (Şekil 2.15.) (58). Yetişkinde her organ ve dokuda aynı sayı ve potansiyelde kök hücrelere rastlanmaz. Örneğin, beyinde bu hücreler oldukça az sayıda bulunmaktadır. Bu nedenle beyin hasarlarında bir kemik veya doku gibi organ yenilenmesi olmaz, hasar genellikle kalıcıdır ve ciddi sonuçlar doğurur. Günümüzde, araştırmacılar yetişkin dokulardan elde edilen kök hücrelerin diğer organ ve dokulara farklılaşması yönünde çalışmalar yapmaktadırlar.

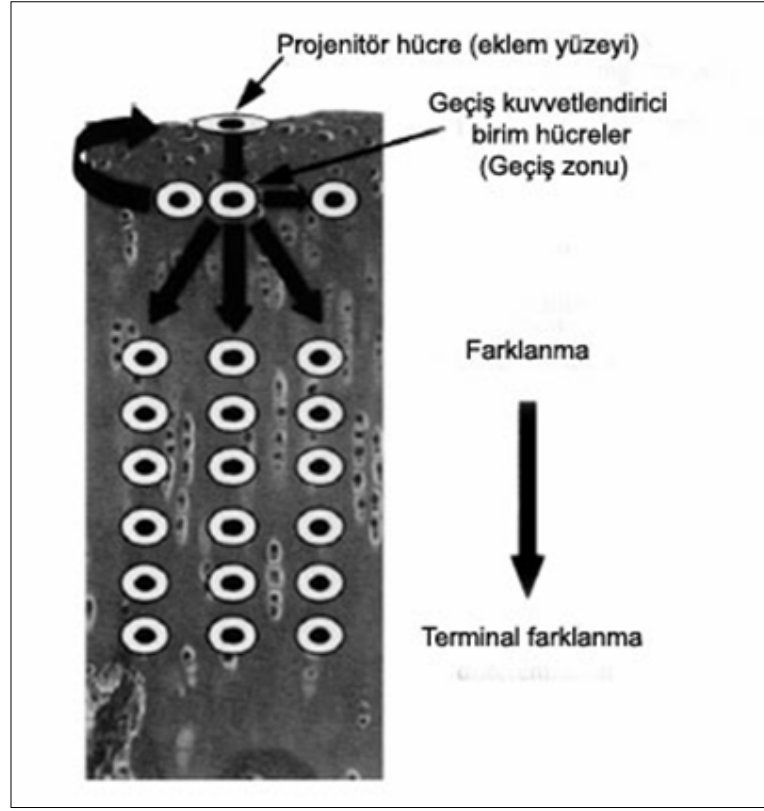


Şekil 2.15. Multipotent kök hücreleri elde edildikleri organ ve dokuya ait hücre tiplerine farklılaşabilir (58)

Erişkin kök hücreleri, pluripotent veya progenitor tipte olabilirler. Pluripotent özellikte olanlar, henüz yönlendirilmemiş hücreler olup kendilerini yenileyebilme yetenekleri vardır. Progenitör olanlar, matür hücreleri oluşturmak için bölünme, çoğalma ve farklılaşma yetenekleri mevcuttur. Multipotent, tripotent, bipotent veya unipotent hücreler olup kısmen differansiye olmuşlardır. Progenitor hücreler, yaşamları süresince ardışık olarak 50-70 defa popülasyon oluşturabilirler. Oluşturacakları doku veya hücreye ilişkin spesifik belirteçlerden bazılarını eksprese ederler (6, 59).

Kondroprogenitor hücreler, yüksek miktarda integrin $\alpha 5\beta 1$ (klasik fibronektin reseptörü) subüniti eksprese ederler. Bu hücrelerin, Notch1 transmembran reseptörü ekspresyonları ve proliferasyon hızları oldukça yüksek olup, diğer kondrositlerin yaklaşık 4 katıdır. Aynı zamanda Sox 9 (transkripsiyon faktörü) mRNA ekspresyonları da yüksektir (26, 60). Organizmada, gelişmekte olan eklem kıkırdağı eklem kıkırdağı yüzeyel zonu eklem kıkırdağının apozisyonel büyümesinden

sorumludur ve bu büyüme yüzeyel bölgenin 2-3 hücre tabakasında bulunan kondroprojenitör hücre popülasyonu ile sağlanır (Şekil 2.16.) (26, 60).



Şekil 2.16. Büyümekte olan eklem kıkırdağının eklem yüzeyinden derinlere doğru appozisyonel olarak büyümesi görülmektedir (60)

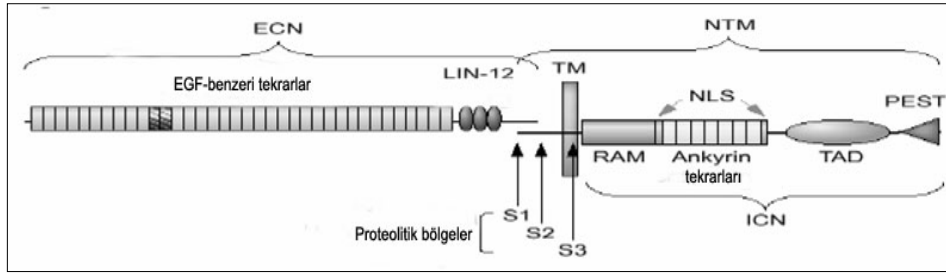
Kıkırdak ve kemik dokuları daha önce de bahsedildiği gibi mezoderm kaynaklı mezenkimal (MKH) kök hücrelerden gelişirler ve erişkinde, değişik dokularda varlıklarını sürdürürler (5, 6). Kemik iliği stromal hücreleri veya mezenkimal projenitör hücreler olarak da adlandırılan MKH'ler, kendini yenileyebilen multipotent projenitör hücrelerdir ve birkaç farklı mezenkimal soya faklanabilme özelliğine sahiptirler (7-9).

Kondrositler MKH'nin farklılaşmış hücre tipleridir. Pluripotent özellikli bu projenitör hücreler tendon hücreleri, miyosit, kemik iliği, stromal hücreleri, adiposit ve osteoblastları da oluşturabilirler (7, 24, 25).

2.6. Notch

2.6.1. Notch reseptörleri

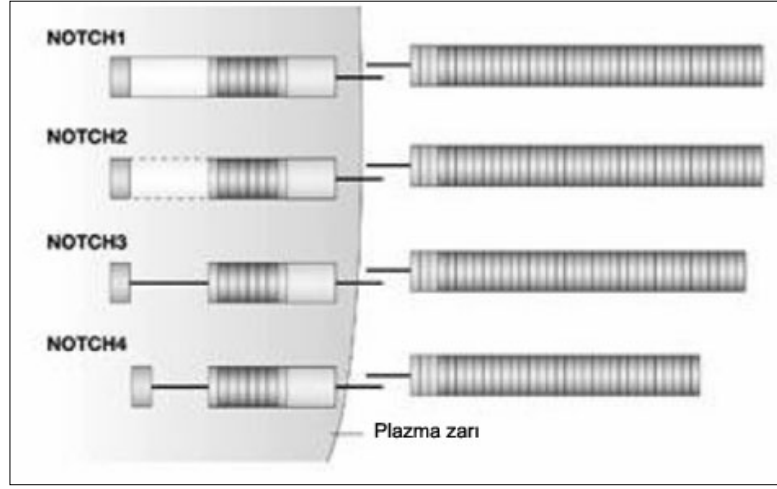
Notch reseptörü bir transmembran proteini olup membrana transportu sırasında trans-Golgede bulunan furin benzeri proteaz ile bölünmeye uğrar. Bu ilk bölünme ile birlikte yaklaşık 70 amino asit içeren bir eksternal birim oluşur. Böylece Notch reseptörü, hücre dışı ve transmembran olarak iki bölüm içerir. Geniş hücre dışı domaini 36 çift epidermal büyüme faktörü benzeri tekrar ve 3 sistein-içerikli Notch/LIN-12 tekrar içerir. Hücre dışı kısma ait olan altünite oldukça kısadır ve sistein kalıntıları içermektedir. Hücre içi bölümünde ise transmembran alt ünitesinde RAM domeynini ve ardından 6 çift ankyrin tekrar içerir. Bu bölge nükleusda transkripsiyon faktörleri ile bağlanan kısımdır. Bu bölgenin ardından da transaktivasyon domeyni ve PEST (Proline, glutamit, serin ve tironin) bölgesi gelmektedir (Şekil 2.17.) (61).



2.17.. Notch yapısını gösteren şematik çizim (61)

Notch genleri ilk olarak *Drosophila melanogaster*' de, 300-kD'luk bir transmembran reseptörü olarak tanımlanmıştır. Notch geninin evrimsel olarak sineklerden memelilere kadar korunduğu belirtilmiştir (61, 62).

Notch benzeri proteinler *Caenorhabditis elegans* (bir tür nematod)' da (LIN-12 ve GLP-1 proteinleri) deniz kestanesinde ve insan da dahil olmak üzere birçok farklı omurgalıda bulunmaktadır. İnsanlarda Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4 gibi farklı alttipleri belirlenmiştir. Değişik hayvan modellerinde yapılan deneylerde, Notch reseptörlerindeki mutasyonların gelişim bozukluklarına sebep oldukları belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, aynı etki insanlarda da gözlenebilmektedir (Şekil 2.18.) (62).



Şekil 2.18. Değişik Notch subtiplerinin yapılarına ait şematik görünüm (62)

Memelilerdeki Notch reseptörü alttipleri büyük oranda homoloji göstermekle birlikte hücre dışı ve sitoplazmik domeyinlerinde bazı farklılıklara sahiptirler. Örneğin Notch1 ve Notch2, 36 EGF-benzeri tekrar içerirken, Notch3 ve Notch4 de bu tekrar sayıları sırasıyla 34 ve 29'dur. Notch1 en güçlü transaktivasyon domeynine sahipken Notch2 daha zayıf bir transaktivasyon içeriğine sahiptir. Buna karşın Notch3 ve Notch4 bu domeyni içermezler. Ankyrin /CDC10 tekrarı en az korunan kısımdır (61, 62).

2.6.2. Notch Ligandları

Notch ligandları da transmembran proteinleridir. Bunlar Delta ve Serrate olarak adlandırılmaktadırlar. Omurgalılarda Delta ve Jagged, *C.elegans*' da LAG-2 ve APX-1 olarak adlandırılmaktadır. Her ligand reseptör ile etkileşime girecek DSL N-terminal içermektedir. DSL'yi takiben EGF-benzeri tekrar ve transmembran domeyni içerirler. Sitoplazmik domeyinleri daha kısadır ve 70-215 amino asit içerir (61, 62).

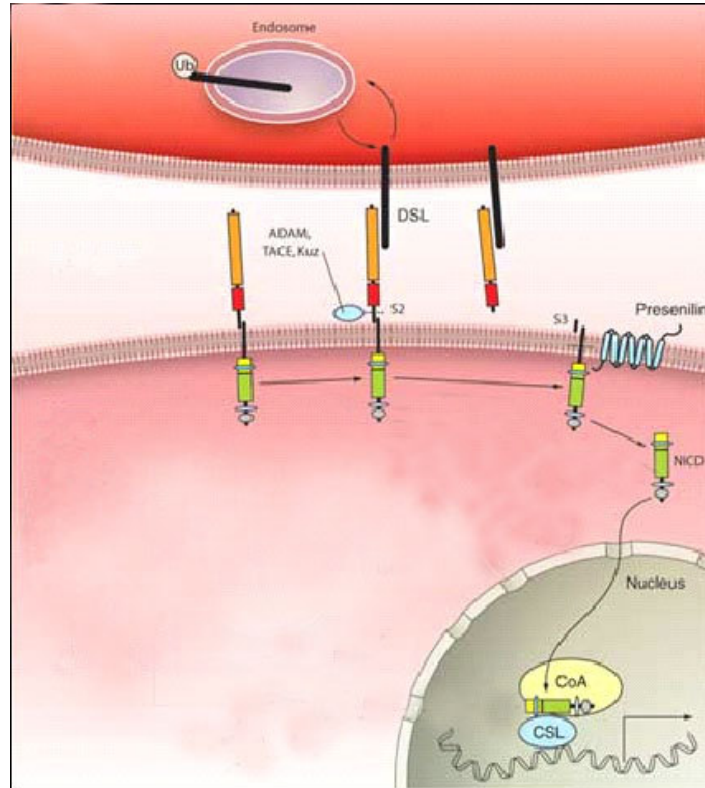
2.6.3. Notch sinyal yolağı

Genetik ve moleküler içerikli çalışmalar sonucunda Notch sinyal yolağında da rol oynayan bir çok protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden hangilerinin Notch sinyallerine yön verdikleri tam olarak bilinmemektedir. Çoğu sinyal yolağının aksine, Notch sinyal yolağında enzimatik amplifikasyon basamağı yerine Notch reseptörü doğrudan nükleusa geçerek transdüksiyonu sağlamaktadır .

Bir çok farklı çalışmanın gösterdiği gibi ligandın hücre dışı domeyini hücre yüzeyinde eksprese olmaktadır ve bu kısım Notch reseptörü taşıyan komşu hücre dışı domaini ile etkileşime girmektedir. Reseptör-ligand etkileşimiyle birlikte heterodimerik yapı engellenir ve ikinci bölünme gerçekleşir. Distintegrin ve metalloproteaz (ADAM) ailesine ait proteazlar (insanda TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) ve *Drosophilada* Kuzbanian), membran komşuluğundaki reseptörün transmembran altünitesinin ayrılmasını sağlar. Bu bölünme transmembran bölgedeki üçüncü

bölünmeyi etkiler. Bu üçüncü bölünme Presenilin, nicastrin, Aph1 ve Pen 2 proteinleri tarafından katalizlenir. Fonksiyonel sitoplazmik kısım ile Notch hücre içi domeyni (NICD) ayrılır. NICD'nın nükleusa translokasyonu gerçekleşir ve transkripsiyon faktörü olan CSL (Memeliler için CBF1, *Drosophila*'da Su(h) ve *C.Elegans*'da Lag-1) ile etkileşime girer. Notch yokluğunda CSL hedef genlerin promotor bölgesiyle kompleks oluşturarak transkripsiyonu engeller. NICD; inhibitör CIR, KyoT2 ve SMRT gibi proteinler ile rekabete girer. Onları yerinden çıkarır ve koaktivatörler ile asetillenilen histon benzeri CBP/p300, pCAF, GCN5 ve Mastemind benzeri proteinler ile transkripsiyonu başlatır (63) (Şekil: 2.19.) (64).

Notch sinyallerinin ilk hedef geni Hair/enhancer of split (HES) olup HES nörogenin, Mash ve MyoD proteinlerini baskılar veya fonksiyonel olmalarını sağlar. Notch sinyallerinin farklı dokularda farklı hedef genleri aktive ettikleri düşünülmektedir. Örneğin keratinositlerde CSL bağlayıcı bölge bulunduran p21^{Waf1}'i etkileyerek proliferasyonu engellediği ve terminal farklanmayı sağladığı gösterilmiştir. Siklin D1 geninde de CSL bağlayıcı bölge tanımlanmıştır. Ayrıca Notch sinyallerinin sıçan böbrek epiteliyal hücrelerinde upregülasyona neden olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.19. Notch sinyal yolağı (64)

Bunların yanında Notch'un, CSL bağımsız sinyal yollarına sahip olduğunun da kanıtları mevcuttur. NICD'in CSL-etkileyici bölgesini kaybederek miyogenez bloklayıcı fonksiyonunun olduğu gösterilmiştir. Deltex proteini, CSL-bağımsız sinyal yolağında yer almaktadır.

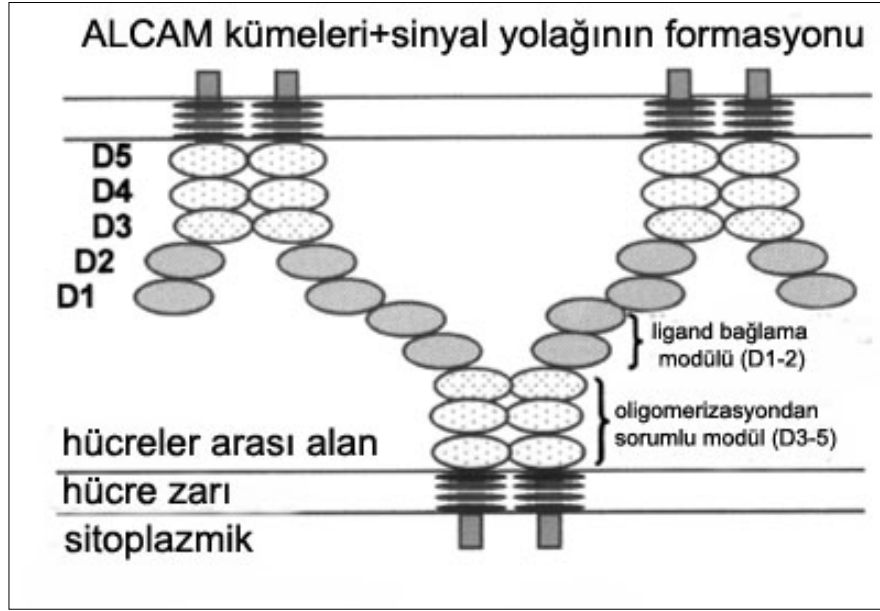
2.6.4. Notch sinyal yolağının fonksiyonu

Notch gelişim sürecinde rol alan bir yolaktır. Notch sinyal yolağı, Wnt, Hedgehog, Transforming Growth Faktör- β (TGF- β) ve reseptör tirozin kinaz/fosfataz yolları ile koordineli şekilde işleyiş gösterir. Notch sinyalleri kök hücre havuzunun sürekliliğinde, hücre proliferasyonunda, hücre kaderinin belirlenmesinde ve farlanması önem taşımaktadır. Sinyal yolladığı sürece, farklanmayı engelleyerek hücrenin mevcut durumda kalmasının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Hematopoietik hücre popülasyonunda, Notch sinyalleri Jagged1 ile etkileşerek kök hücre oranının artmasını sağlar. Notch sinyalleri, progenitor hücrelerin kök hücre karakterinde kalmalarına öncülük eder.

Notch sinyalleri, hücre kaderi belirlenmesine de katılır. Drosophila gelişiminde, nöronal ya da epidermal hücrelere dönüşecek prekürsör hücrelerin kaderi Notch sinyalleri ile belirlenir. Lateral inhibisyon yolu ile Notch reseptör ve ligandları başlangıçta tüm hücrelerde eşit şekilde eksprese edilirler fakat daha sonra konsantrasyonları değişir. Hücrede ya reseptör yada ligand baskın hale gelir. Ligand eksprese eden hücreler nöronal hücrelere dönüşürken, Notch sinyal aktif hücrelerin farklanması engellenir ve epidermal hücre olarak belirlenirler. İndükleyici hücre belirlenmesi iki farklı hücrenin ya Notch reseptörünü yada ligandını eksprese etmeleri ile gerçekleşir. İki potansiyele sahip nöral krest kök hücreleri Notch ekspresyonu ile nöron yerine glial hücrelere farklanırlar. Notch sinyalleri deride terminal farklanmayı sağlarlar (63).

2.7. ALCAM (CD166)

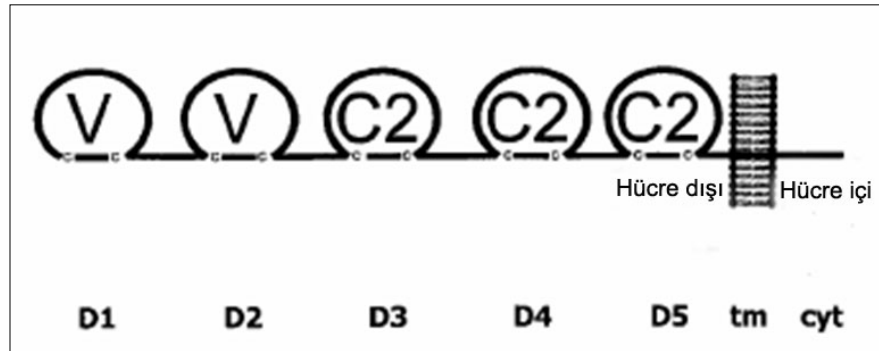
Activated Cell Adhesion Molecule (CD-166/ALCAM) immüno globulin süperfamilyasının bir üyesi olup aktive edilmiş T-hücreleri, B hücreleri, timus epitelyal hücreleri, fibroblastlar, keratinositler ve nöronlar tarafından eksprese edilir. ALCAM her iki heterofilik (ALCAM-CD6) ve homofilik (ALCAM-ALCAM) hücre-hücre bağlantılarına aracılık eder (Şekil 2.20.) (65).



Şekil 2.20. Hücreler arası homofilik ALCAM-ALCAM etkileşim modeli (65)

Hücre büyümesi, migrasyonu, organ gelişimi, hematopoez, immün cevap ve tümör gelişimde rol alır. Son bilgilere göre; ALCAM, hücre-hücre dışı matriks bağlantısını da sağlayarak, hücrenin adhezyonunu gerçekleştirir. Hücre büyümesi ve migrasyonunda da rol alır (65).

ALCAM beş farklı Ig domeyni içermektedir (D1-5): İki değişken (V-) amino-birimi ve onları takiben üç sabit (C₂-) tip domeyn içermektedir (VVC₂C₂C₂). Bunlara ilaveten bir transmembran domeyini ve C-terminali içermektedir (Şekil 2.21.) (65).



Şekil 2.21. ALCAM molekülünün yapısını gösteren şematik çizim (65)

ALCAM aracılı hücreler arası etkileşim, farklı hücrelerde bulunan karşılıklı amino-uçları (D1) arasında gerçekleşir. ALCAM aracılı adhezyonda, hücre yüzeyinde bulunan komşu moleküller ile (D4-5) yapısal düzen kuvvetlendirilir. (66). Bu bimodüler yapı hücre-hücre bağlantılarında ALCAM etkileşiminin oluşumunu destekler. (65).

2.8. Endoglin (CD 105)

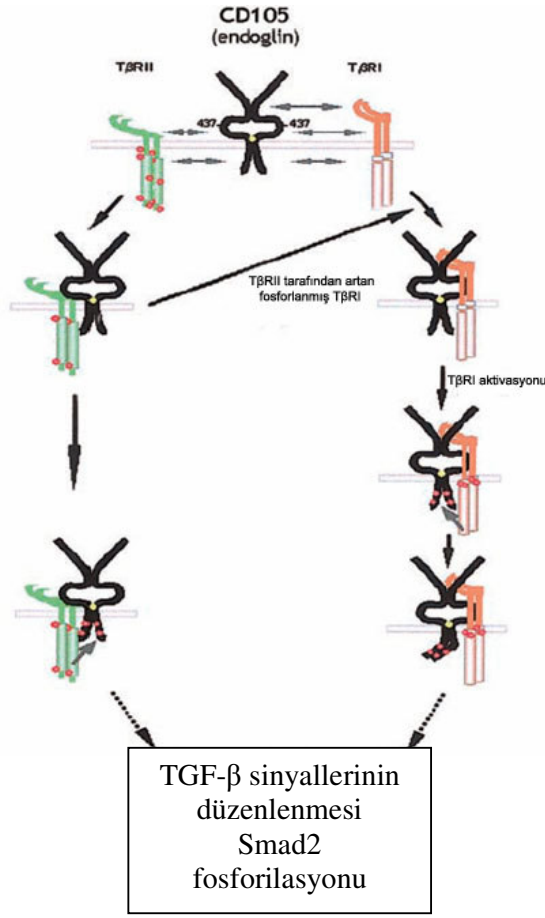
Endoglin (CD-105) bir hücre yüzeyi glikoproteini olup çoğalma, hücre göçü, hücre dışı matriks üretimi ve hematopoez gibi birçok hücre fonksiyonu düzenleyen, yara iyileşmesi ve anjiyogenezde rol alan Transforming Growth Faktör β (TGF β) ailesinin bir üyesidir. Endoglin, TGF β 1 ve TGF β 3'e yüksek afinite ile bağlanır. Endoglin çoğunlukla vasküler sistem ve bağ dokusu hücre soylarında bulunmaktadır (67).

İlk olarak Haruta ve Seon tarafından 1986'da lösemi ile ilişkili hücre yüzey glikoproteini olarak tanımlanmıştır (68). 5. Uluslararası İnsan Lökosit Diferansiyasyon Paneli'nde Endoglin, CD 105 olarak numaralandırılmıştır (67, 69). CD105, 180 kDa ağırlığında olup 95kDa ağırlığında disülfid bağları ile bağlanmış iki altüniteden oluşur. CD105 geni, 9q34 kromozomu üzerindedir (67-69).

CD105 çoğunlukla vasküler sistem ve bağ doku hücre soylarında bulunmaktadır. Term plasentadaki sinsisyotrofoblastlarda ve vasküler endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir. Ayrıca hemopoetik hücrelerde, stroma hücrelerinde, fibroblastlarda ve vasküler düz kas hücrelerinde zayıf olarak eksprese edilir (67, 68).

En yüksek CD105 düzeyi, insan umbilikal damar endotel hücrelerinde bulunmuştur. CD105 ekspresyonunun kültürdeki ile yoğunluğu, tümör endotel hücrelerinde proliferasyon belirteçlerinin (siklinA, Ki67) artması arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur (67).

CD 105'in bilinen fonksiyonlarından biri TGF- β 'ya benzer şekilde etki göstermesidir. TGF- β ile kompleks oluşturarak bu sinyal yolağında rol oynar. CD105'in etki mekanizması hakkındaki bilgi oldukça azdır. Bu yolağın karmaşıklığının nedeni serin treonin kinaz ailesine ait büyüme faktörlerinin farklı reseptörlerine bağlanmasıdır (Şekil 2.22.) (70).



Şekil 2.22. CD105'in TGF-RI ve TGF-RII ile etkileşimi (70)

Son çalışmalar CD105 ve sinyal reseptörleri arasındaki ilişkiye ışık tutmaktadır. Bernabeu grubunun önerdiği model, CD105' in TGF-reseptör kompleksindeki rolünü göz önüne sermektedir. Tam uzunluktaki (tam boy) CD105, TGF-β'ın yokluğunda TGF-RI ve TGF-RII ye bağlanabilmektedir, fakat CD105 ve TGF-RI in etkileşimi CD105 ve TGF-RII nin etkileşiminden farklıdır. TGF-RII, CD105in hücre dışı bölgesindeki 437-558 aminoasitleriyle etkileşirken; TGF-RI 437-558 bölgesi ve aminoasit 437 ile aminoasitin ucu arasındaki protein bölge ile etkileşir. TGF-RI sadece kinaz bölgesi inaktifken etkileşime girerken, TGF-RII hem aktif hem de inaktifken CD105 ile etkileşimdedir. Birleşme esnasında CD105' in sitoplazmik bölgesi TGF-RI ve TGF-RII tarafından fosforile edilir, daha sonra TGF-RII'nin reseptörü ayrılmazken TGF-RI'in kinazı reseptör kompleksinden ayrılır. Buna ilaveten CD105 ifadesi TGF-RII'nin fosforilasyon düzeyini durdururken TGF-RI'inkini artırır ve sonuç olarak Smad3ün değil de Smad2 nin fosforilasyonu artar. Smad2 çeşitli transkripsiyon faktörleriyle, koaktivatörlerle ve süpresörlerle (baskılayıcılarla) etkileşebildiği için; fosforile olmuş Smad2 gen transkripsiyonunu yönlendirmek için bir çok sinyalin toplayıcısı olabilir şeklinde yorumlanmaktadır. Bu sayede CD105, TGF-RI ve TGF-RII ile etkileşerek TGF-β fonksiyonlarını ayarlar ve Smad proteinlerinin fosforilasyonunu modifiye eder (70).

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Denekler

Araştırmada, Akdeniz Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Ünitesi'nden temin edilen daha önce hiç deneye girmemiş ve çiftleşmemiş *Rattus norvegicus* türü 90 günlük 30 dişi ve 12 erkek olmak üzere toplam 42 sıçan kullanıldı. Yapılan bu çalışmanın projesi, Adeniz Üniversitesi Hayvan Kullanım ve Bakım Kurulu tarafından incelenerek, çalışmanın bilimsel etik çerçevesinde olduğu ve çalışma için istenilen deney hayvanlarının tahsisinin uygun olduğu kararına varıldı. Normal yem ve musluk suyu ile beslenen sıçanlar dişi/erkek oranı 2/1 olacak şekilde kafeslerde 1 gece bırakıldı. Ertesi sabah dişi sıçanlara vajinal simir yapıldı. Simiri sperm pozitif olan sıçanlar gebeliğin sıfırncı gününde kabul edildi. Daha sonra embriyonik gelişimin E15. ve E19. günlerindeki fetüsler, doğum sonrası dönemin DS10. ve DS20. günlerindeki yavrular ile 90 günlük erişkin sıçanlardan epifiz kırırdağı örneklerinin elde edilmesi için takipleri yapıldı. Her çalışma grubuna altı adet denek alındı.

3.2. Doku Temini ve Hazırlanması

Gebeliğin E15 ve E19. günlerinde hayvanlar eter anestezisi altında diseke edildi. Fetuslardan ön ekstremite elde edildi. Doğum sonrası günler için de doğumdan sonra gelişim günleri takip edilen yavrular DS10., DS20. günlerde ve erişkin dönemde yine eter anestezisi altında diseke edilerek ön ekstremite alındı.

Işık mikroskobu çalışması için alınan örnekler histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler için rutin parafin takibine alındı; E15, E19 ve DS10 günlük örnekler %10'luk formalin'e alınarak 24 saat fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından 18 saat yıkama işlemi takiben dokular sırası ile %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinde birer gün tutularak dehidrasyon işleminden geçirildi. Ksilol içinde 3 kez 5 - 7'er dakikalık şeffaflaştırma işlemi takiben 58°C'de 3 defa 1'er saatlik parafin banyosunda tutuldu ve etüv dışında temiz erimiş parafinle bloklandı.

DS20 günlük ve erişkin örnekleri ise 1 hafta boyunca fikse edildi. Bir haftanın sonunda 24 saat boyunca akarsu ile yıkandı. Ardından 3 gün süre ile %25'lik formik asit ile dekalsifiye edildi ve ardından 24 saat akarsu ile yıkanarak 3 gün süreyle 0.35M sodyum sülfat solüsyonunda nötrale edildi. Tekrar 24 saat akarsu ile yıkandı ve ardından yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Ksilol ile safflaştırıldıktan sonra parafin ile bloklandı.

3.3. Işık Mikroskobu Pratik Çalışması

Beş gruba ait epifiz kırırdağı örneklerinden 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler ksilol serilerinden geçirilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi ve alçalan alkol serilerinden geçirilerek suya kadar getirildi. Ardından rutin ışık mikroskopik incelemeleri için Hematoksilen – Eozin, Alsiyan Mavisi ve Alizarin Kırmızısı ile boyandı ve Axioplan, Zeiss (Almanya) ile incelenerek fotoğraflandırıldı. Fotoğraf büyültmeleri orijinal objektif büyültmeleri şeklinde ifade edildi.

3.4. İmmünohistokimyasal Gözlemler

3.4.1. İmmünohistokimyasal Protokol

Super-frost lamalar üzerine 5 mikron kalınlığında alınan parafin kesitler bir gece 56 derecelik etüvde bekletildi. Deparafinizasyon için iki kere onar dakika ksilollerden geçirildi ve her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80 ve % 70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra, distile suda çalkalandı ve fosfat tuzu tamponunda (PBS, Ph: 7.2 -7.4) üç kere beşer dakika yıkandı. Kesitler, antijenik maskenin giderilmesi için 0,2M borik asit tamponuna (pH:7.0) konularak 60 derecelik etüvde bir gece bekletildi. Ardından çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, 3 defa 5'er dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisinden (PBS; pH: 7.2-7.4) geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için kesitler % 3'lük hidrojen peroksit ile kırkbeş dakika inkübe edildi. Distile suda çalkalanıp PBS 'te yıkanan kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin bağlanmalarını önlemek amacıyla blokama serumu (LabVision UVBlock) ile 15 dakika muamele edildi. Ardından Rabbit poliklonal CD-105 (sc-20632), rabbit poliklonal CD-166 (sc-25624), goat poliklonal Notch 1 (sc-6014) ve rabbit poliklonal Delta (sc-9102) primer antikorları (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) sırasıyla 1/100 , 1/200, 1/5, 1/200 (X µg IgG/mL) dilüsyonlarda +4°de gece boyu uygulandı. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine uygun serum (keçi ve eşek) uygulandı. Kesitler inkübasyon sonunda PBS ile üç defa beşer dakika yıkandı. Bunu sırası ile 30 dakkika biyotinli sekonder antikor (SC-2051 ve SC-2053) ve streptavidin – peroksidaz kompleksi (SC-2051 ve SC-2053) inkübasyonu takip etti. PBS ile 3 defa 5'er dakikalık yıkama ardından reaksiyonların gözlenebilmesi için di-aminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) kromojeni uygulandı (Bio-Genex, San Ramon, CA). Dehidratasyon işlemi yapıldı ve kapatıldı. Işık mikroskobuyla incelemeler yapıldı.

3.5. İstatistiksel Analiz

3.5.1. İmmünohistokimya

Beş farklı gruba ait dokularda Notch1, Delta, CD105 ve CD166 immünoboyanması pozitif olan hücre sayılarının değerlendirilmesi HSCORE ile yapıldı. İmmünohistokimyasal tekniklerle boyanan kesitler özel bir oküler skalası kullanılarak Axioplan mikroskobunda (Zeiss, Almanya) değerlendirildi. E15., E19., DS10., DS20. günler ile erişkin grupları için rastgele beş kesit seçildi. Her bir kesitte beş bölge X200 büyütmede antikorların immünohistokimyasal boyanmalarının analizi için değerlendirildi. Boyanmalar, kesitteki özel boyanmanın yoğunluğu temel alınarak semikantitatif olarak skorlandı. Değerlendirme yüzde olarak yapıldı ve

alandaki tüm hücreler aşağıda verilen yoğunluk kategorilerinden birisine dahil edildi: 0 (boyanma yok), 1+ (zayıf fakat kontrole göre görülebilir), 2+ (boyanma belirgin), 3+ (boyanma yoğun). Her bir doku için gözlemlenen HSCORE değeri yoğunluk kategorileri ile çarpılarak toplandı [$HSCORE = \sum P_i (i+1)$, i, yoğunluk skoru ve P_i , hücrelerin yüzde değerleri]. Daha sonra HSCORE değerleri grafiklendirildi. Tüm deney gruplarına ait HSCORE değerlendirilmeleri birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından uygulandı.

Elde edilen bulguların istatistiksel analizi student's t-test ile karşılaştırıldı. 0.001' den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (ortalama \pm standart hata sapması).

3.5.2. Semikantitatif Değerlendirme

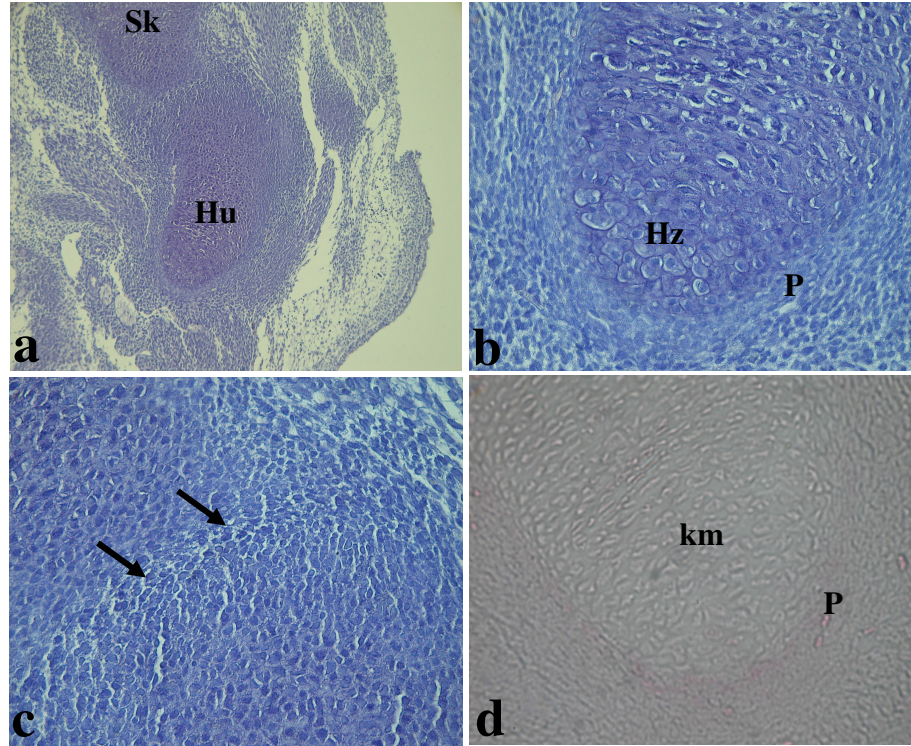
Tüm deney gruplarında pozitif immünoreaktif hücrelerin immünoboyanma yoğunlukları da semikantitatif olarak [0: Negatif; (+):Zayıf pozitif; +: Pozitif; ++: Kuvvetli pozitif; +++: Çok kuvvetli pozitif] şeklinde değerlendirildi.

BULGULAR

4.1. Epifiz Kıkırdağı Gelişimi

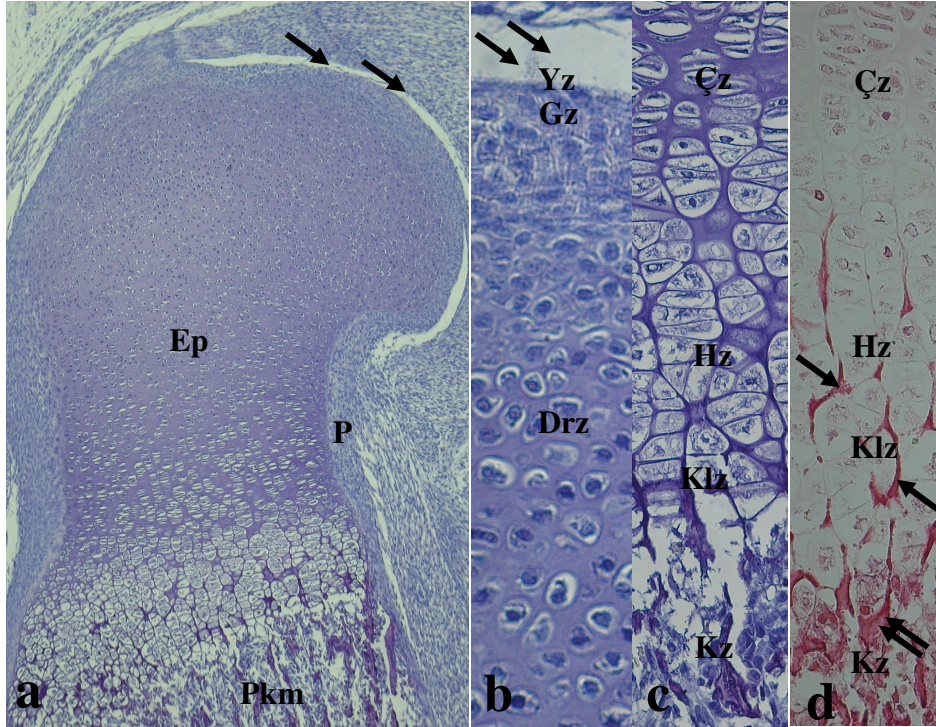
Hematoksilen-Eozin, Alsiyan Mavisi ve Alizarin kırmızısı boyamaları uygulanan Embriyonik 15 (E15), Embriyonik 19 (E19), Doğum sonrası 10 (DS10), Doğum sonrası 20 (DS20) günlük ve erişkin sıçan gruplarının ekstremitelerinde örnekleri ışık mikroskopik olarak incelendi.

E15 günlük sıçanlarda ön ekstremitelerde kıkırdak modellerinin oluştuğu (Şekil 4.1a.), kıkırdak modelde hipertrofik zonun belirginleştiği, model çevresinde 7-9 hücre sırasından oluşan bir perikondriumun yer aldığı (Şekil 4.1b.), skapula ve humerus kıkırdak modelleri arasında yer alacak eklem boşluğunun henüz şekillenmediği belirlendi (Şekil 4.1c.). Bu dönemde çevre embriyonik doku içine yerleşik kıkırdak modelde endokondral düzeyde herhangi bir kemikleşme belirtisine rastlanılmadı (Şekil 4.1d.).



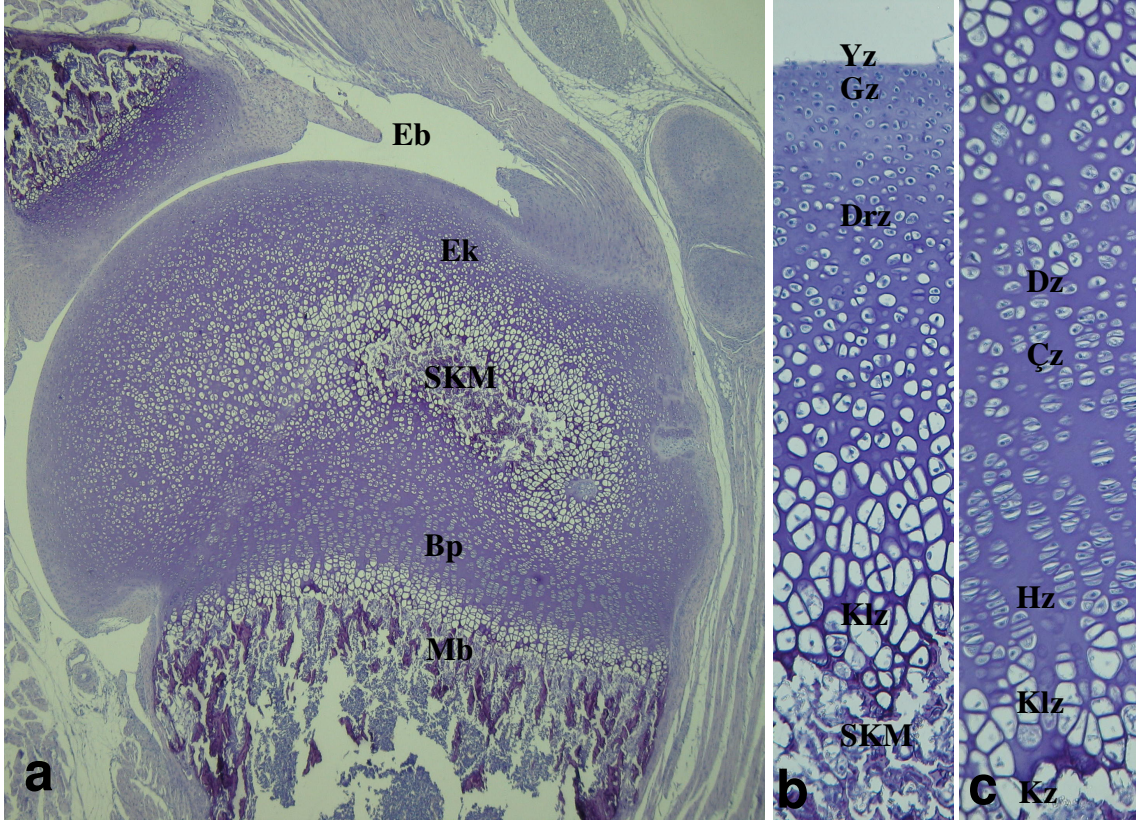
Şekil 4.1a-d.E15 günlük sıçan epifiz kıkırdağı görünümü. **a:** Ön ekstremitelerde kıkırdak modellerinin oluşumu gözlenmektedir (Sk: skapula, Hu: Humerus), H-E, X10. **b:** Kıkırdak modelde belirginleşmiş hipertrofik zon ve onun çevresindeki perikondrium (Hz: Hipertrofik zon, P: perikondrium), H-E, X40. **c:** Henüz şekillenmemiş eklem boşluğu alanları (oklarla), H-E, X40. **d:** Bu dönemde çevre embriyonik doku içine yerleşik kıkırdak modelde (km) endokondral düzeyde herhangi bir kemikleşme belirtisi gözlenmemektedir. P: perikondrium, Alizarin kırmızısı, X40

Embriyonik 19 günlük sıçan humerusunda eklem boşluğu ve epifiz kırırdağı zonlarının tamamen belirginleştiği gözlemlendi. Bu dönemde kırırdağ modelde eklem kırırdağının yüzeyel ve geçiş zonları ile depo, çoğalma, hipertrofik ve kemikleşme zonlarının tamamen belirginleştiği, primer kemikleşme merkezinin tümüyle ortaya çıktığı belirlendi (Şekil 4.2a.). Bu dönemde epifiz kırırdağı yüzeyel zonu birkaç sıra yassı hücreden, geçiş zonu yine birkaç kat şeklinde düzenlenmiş yuvarlak hücrelerden oluşmaktaydı. Depo zonu, genellikle tek-tek görünüm sergileyen hücreler içermekteydi (Şekil 4.2b.). Çoğalma zonu hücreleri, kırırdağ modelin uzun eksenine paralel hücresel sütunlar şeklinde uzanan kondrosit dizilerinden oluşmaktaydı. Hipertrofik zonda kondrositler genişleyerek hipertrofik şekil almışlardı. Bu zonda, lakünalar genişlemiş olduğundan komşu hücre sütunlarını ayıran septalar oldukça ince bölmeler şeklindeydi. Kalsifikasyon zonu, çekirdekleri piknotikleşmiş ve dejenere olmuş kondrositler, genişliğini koruyan lakünalar, yer yer kalsifiye olmuş ince kırırdağ matriksi alanlarından oluşmaktaydı. Kemikleşme zonu, kan hücreleri tarafından doldurulan kapillerler, osteoblastlarla kaplanmış kalsifiye kırırdağ alanları içermekteydi (Şekil 4.2c.). Ayrıca kemikleşme zonunda bol miktarda kemik trabekülleri de gözlenmekteydi (Şekil 4.2d.) .



Şekil 4.2a-d. E19 günlük sıçan humerus epifiz kırırdağı. **a:** Genel görünüm. Oklar: eklem boşluğu, Ep: Epifiz kırırdağı, Pkm: Primer kemikleşme merkezi. H-E, X10. **b:** Eklem kırırdağı yüzeyel zonu (Yz), geçiş zonu (Gz) ile depo zonu (Dz). H-E, X40. **c:** Sütunlar şeklindeki çoğalma zonu (Çz), genişlemiş kondrositlerden oluşan hipertrofik zon (Hz), dejenere olmuş kondrositlerden oluşan kalsifikasyon zonu (Klz) ile kemikleşme zonu (Kz) gözlenmektedir. H-E, X20. **d:** Kalsifiye olmuş ince kırırdağ matriksi alanları (oklarla) ve kemik trabeküllerini (çift oklarla) içeren kemikleşme zonu gözlenmektedir. Alizarin kırmızısı boyaması, X20.

Doğum sonrası 10 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağında sekonder kemikleşme merkezi tamamen ortaya çıkmış, eklem kırırdağı, sekonder kemikleşme merkezi ve büyüme plağı alanları tüm zonlarıyla birlikte gözlenmekteydi (Şekil 4.3a.). Bu dönemde, eklem kırırdağında, yüzeysel, geçiş, derin ve kalsifikasyon zonları gözlenirken, büyüme plağında depo, çoğalma, hipertrofik, kalsifikasyon ve kemikleşme zonları ayırt edildi (Şekil 4.3b,c.).

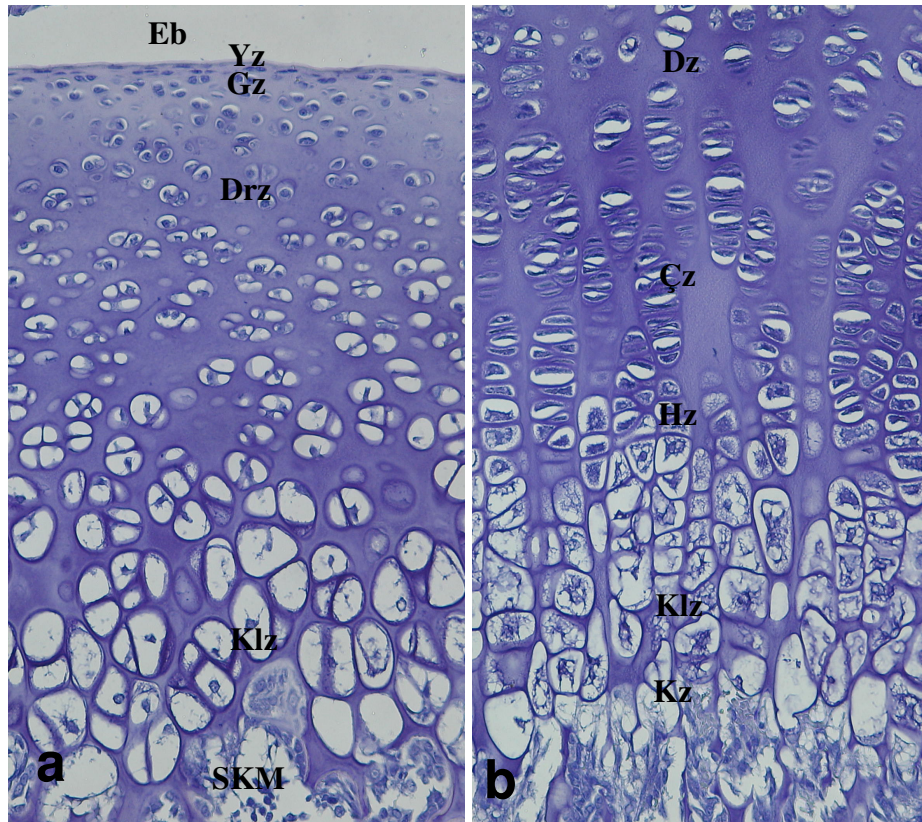


Şekil 4.3a-c. Hematoksilen-Eozin ile boyanmış doğum sonrası 10 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı. **a:** Genel görünüm. X2,5. Eb: eklem boşluğu, Ek: eklem kırırdağı, SKM: sekonder kemikleşme merkezi, Bp: büyüme plağı, Mb: metafiz bölgesi. **b:** Eklem kırırdağı bölgesi. X10. Yz: yüzeysel zon, Gz: geçiş zonu, Drz: derin zon, Klz: kalsifikasyon zonu, SKM: sekonder kemikleşme merkezi. **c:** Büyüme plağı. X10. Dz: depo zonu, Çz: çoğalma zonu, Hz: hipertrofik zon, Klz: kalsifikasyon zonu, Kz: kemikleşme zonu.

Doğum sonrası 20 günlük dönemde, sekonder kemikleşme merkezinin epifizin büyük bir kısmını oluşturduğu, eklem kıkırdağı ve büyüme plağını oluşturan tüm zonların tümüyle netlik kazandığı gözlemlendi.

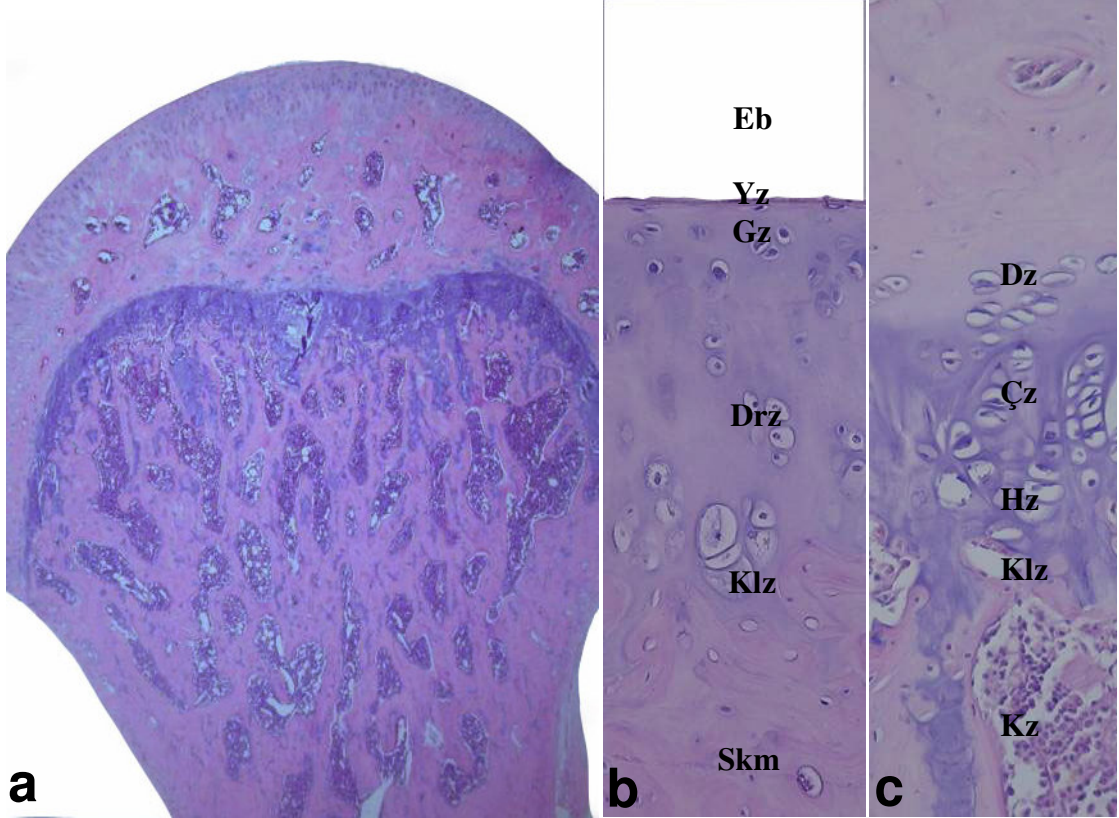
Bu dönemde, eklem kıkırdağının yüzeyel zonu, eklem yüzeyine komşu alanda yeralan son derece yassı hücrelerden oluşmaktaydı. Geçiş zonu, yüzeyel zonu hemen altında yüzeyel hücrelere göre daha yuvarlak görünümlü olan tek tek veya ikili hücrelerden oluşmaktaydı. Derin zon, geçiş zonunda olduğu gibi yuvarlak fakat eklem kıkırdağı yüzeyine dik konumda yerleşik sütunlar şeklinde dizilim gösteren hücrelerden ve geniş matriks alanlarından oluşmaktaydı. Kalsifikasyon zonu, Hematoksilen-Eozin boyamalarında diğer zonlara göre daha soluk boyanan bir matriks ile nispeten diğer zonlardakilere oranla daha küçülmüş kondrositlerden oluşmaktaydı (Şekil 4.4a.).

Büyüme plağının genel görünümüne baktığımızda, depo zonu tekli hücrelerden oluşurken, çoğalma zonu hücreleri epifiz kıkırdağı uzun eksenine paralel sütunlar şeklinde düzenlenmiş hücre dizilerinden, hipertrofik zon genişlemiş hücre gruplarından, kalsifikasyon zonu diğer zonlara göre daha soluk boyanmış matriks içeren ve dejenere olmuş kondrositlerden oluşmaktaydı (Şekil 4.4b.).



Şekil 4.4a,b Hematoksilen-Eozin ile boyanmış doğum sonrası 20 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı. **a:** Eklem kıkırdağı. X20. Eb: eklem boşluğu, Yz: yüzeyel zon, Gz: geçiş zonu, Drz: derin zon, Klz: kalsifikasyon zonu, SKM: sekonder kemikleşme merkezi. **b:** Büyüme plağı. X20. Dz: depo zonu, Çz: çoğalma zonu, Hz: hipertrofik zon, Klz: kalsifikasyon zonu, Kz: kemikleşme zonu.

Erişkin dönemde eklem kıkırdağı normal görünüm sergilerken, sekonder kemikleşme merkezinin hemen hemen tamamıyla kemikleştiği, büyüme plağının gerileyerek ince bir tabaka şeklini aldığı ve yer yer dejenere olduğu ve zonal bütünlüğünün kısmen kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 4.5a-c.).



Şekil 4.5a-c. Hematoksilen-Eozin ile boyanmış erişkin sıçan humerusu epifiz kıkırdağı **a:** genel görünüm, X10. **b:** Eklem kıkırdağı. X20. Yz: yüzeysel zon, Gz: geçiş zonu, Drz: derin zon, Klz: kalsifikasyon zonu, SKM: sekonder kemikleşme merkezi. **c:** Büyüme plağı. X20. Eb: Eklem boşluğu, Dz: depo zonu, cz: çoğalma zonu, Hz: hipertrofik zon, Klz: kalsifikasyon zonu, kz: kemikleşme zonu.

4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular

Gelişmekte olan ve erişkin sıçan humerusu epifiz kırırdağı dokularında Notch1, Delta, CD 105 ve CD 166 kök hücre belirteçlerinin immünoboyanma yoğunluklarının dağılımları semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve tablo 4.1.-4.2.-4.3. ve 4.4.'de özetlendi.

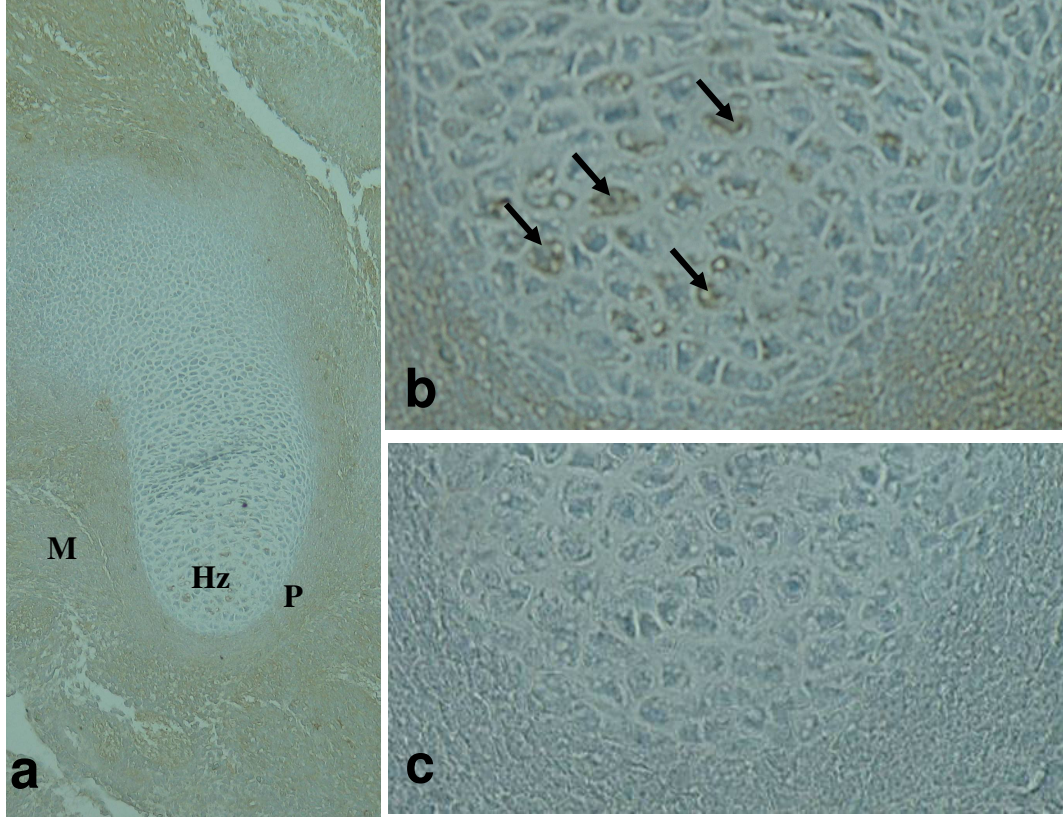
4.2.1. Notch1

Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında Notch1 immünoboyanma yoğunluklarının dağılımı semikantitatif olarak değerlendirildi ve tablo 4.1.'de verildi.

EPİFİZ KIRIRDAĞI BÖLGELERİ		E15	E19	DS10	DS20	Erişkin
EKLEM KIRIRDAĞI	Yüzeysel Zon	0	0	0	0	+++
	Geçiş Zonu	0	(+)	+	+	+++
	Derin Zon	0	0	+++	+++	+++
	Kalsifikasyon Zonu	0	0	(+)	0	0
SEKONDER KEMİKLEŞME MERKEZİ		0	0	+++	+++	+++
BÜYÜME PLAĞI	Depo Zonu	0	+++	(+)	0	0
	Çoğalma Zonu	0	+	(+)	0	0
	Hipertrofik Zon	+	++	++	(+)	0
	Kalsifikasyon Zonu	0	0	0	0	0
	Kemikleşme Zonu	0	+++	+++	++	+++

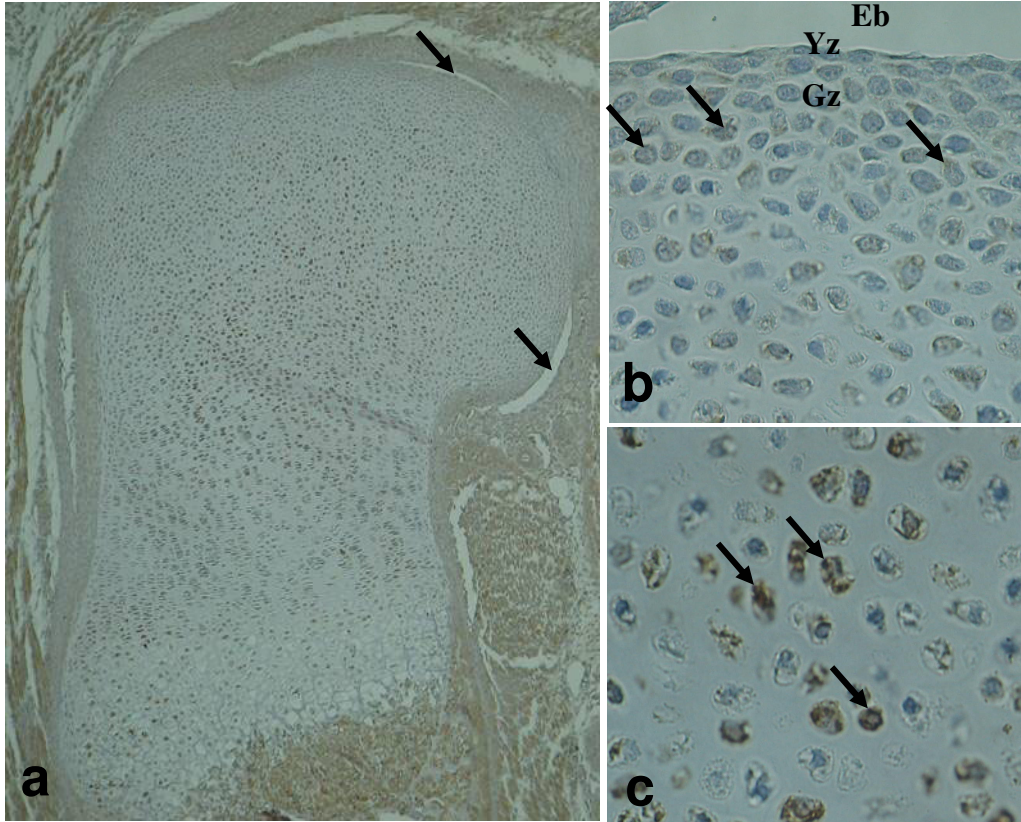
Tablo 4.1. Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında Notch1 immünoboyanma yoğunluklarının semikantitatif dağılımı. E: Embriyonik DS: Doğum sonrası. 0:Negatif; (+): Zayıf Pozitif; +: Pozitif; ++: Yoğun Pozitif; +++: Çok Yoğun Pozitif; 0: Bölge mevcut değil.

E15 günde, çevre mezenkimal bağ doku, perikondrium ve epifiz kırırdağı dokusunda Notch1 immunoboyanması sadece hipertrofik kondrositlerde gözlendi. Diğer bölgelerde belirgin bir immunolokalizasyon gözlenmedi (Şekil 4.6a-c.).

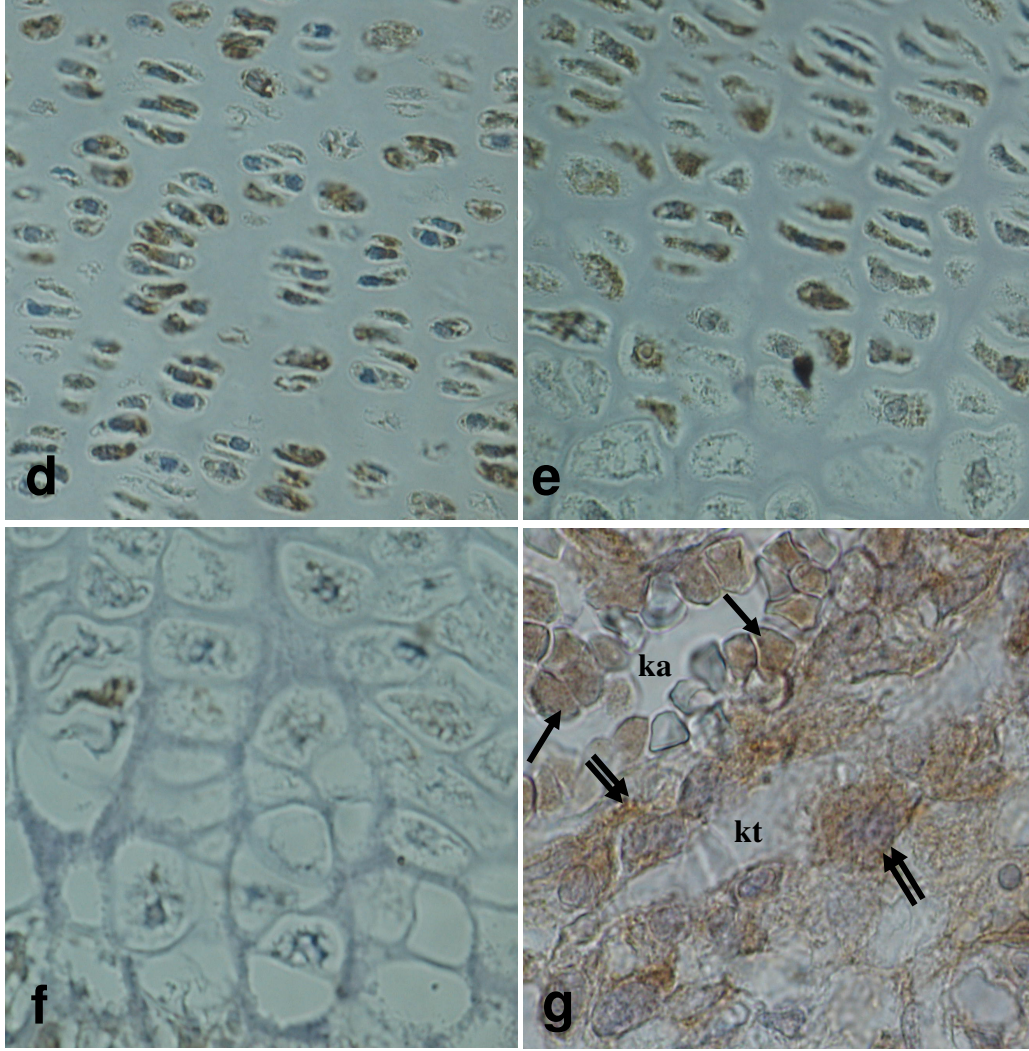


Şekil 4.6a-c. Embriyonik 15. günde, çevre mezenkimal bağ doku, perikondrium ve epifiz kırırdağı dokusunda Notch1 immuno lokalizasyonu. **a:** Genel görünüm. M: Mezenkimal bağ doku, P: perikondrium. Hz: hipertrofik zon. 10X. **b:** Şekil a'da işaretli hipertrofik zonda yer alan Notch1 pozitif hipertrofik hücreler (oklarla) gözlenmektedir X40. **c:** Negatif kontrol kesiti. X40.

E19 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı dokusunda, Notch1 immunoboyanma yoğunluğu eklem boşluğu komşuluğundaki yüzeysel zonda negatif, geçiş zonunda zayıf , depo zonunda çok yoğun pozitif, çoğalma zonunda pozitif, hipertrofik zonda yoğun pozitif ve kemikleşme zonunda çok yoğun pozitif şeklinde gözlemlendi. Bununla birlikte kalsifikasyon zonunda boyanma gözlemlenmedi. Kemikleşme bölgesinde, özellikle kemik trabekülleri çevresinde yerleşik olan osteoblastlar ve kapiller içerisindeki bazı eritrositlerde yoğun Notch1 immunoboyanması gözlemlendi (Şekil 4.7a-g.).

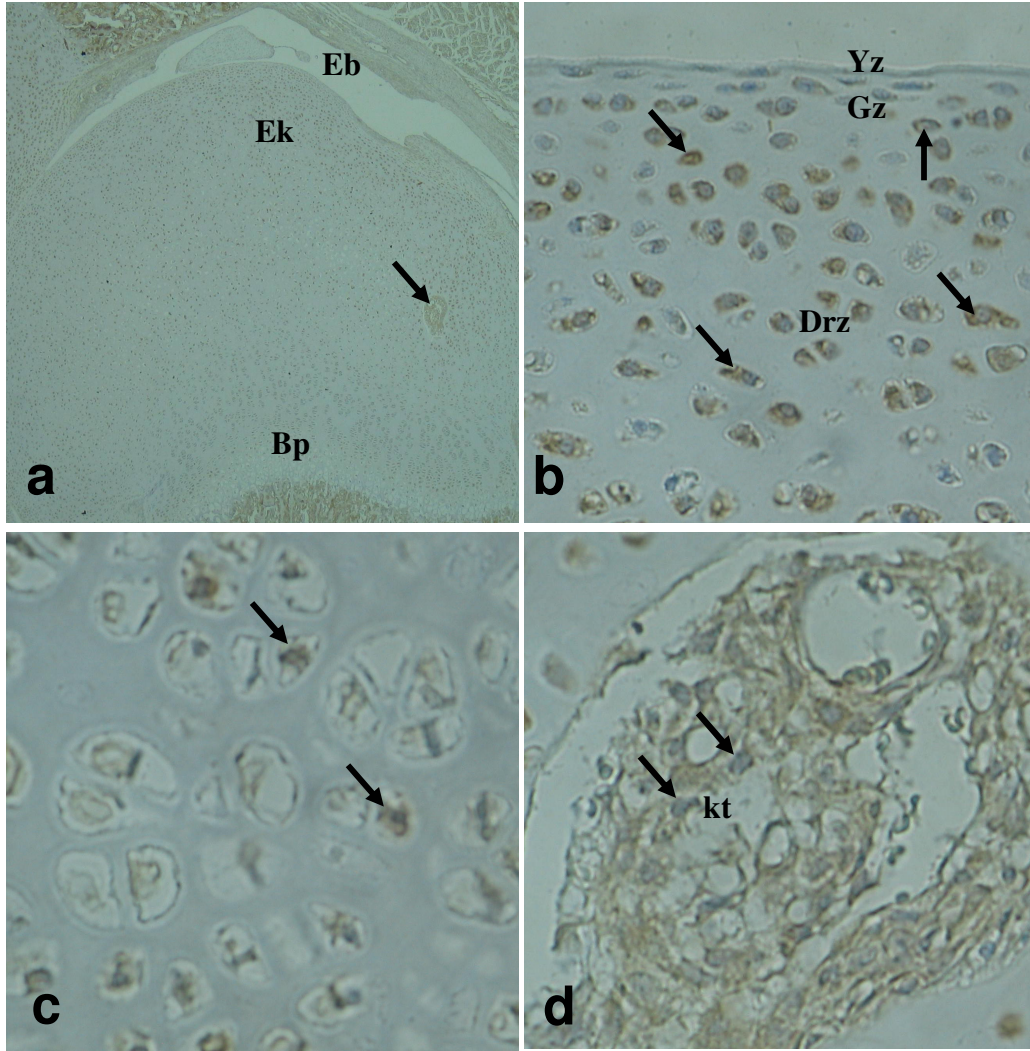


Şekil 4.7a-c. Embriyonik 19. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda Notch1 immuno lokalizasyonu. **a:** Genel görünüm (oklar: eklem boşluğu), 5X. **b:** Eklem kıkırdağında, eklem boşluğu (Eb) komşuluğundaki yüzeysel zonda (Yz) negatif, geçiş zonunda (Gz) zayıf Notch1 immunoboyanmaları (oklarla). X40. **c:** Epifiz kıkırdağı depo zonunda çok yoğun Notch1 immunoboyanmaları (oklarla) X40.

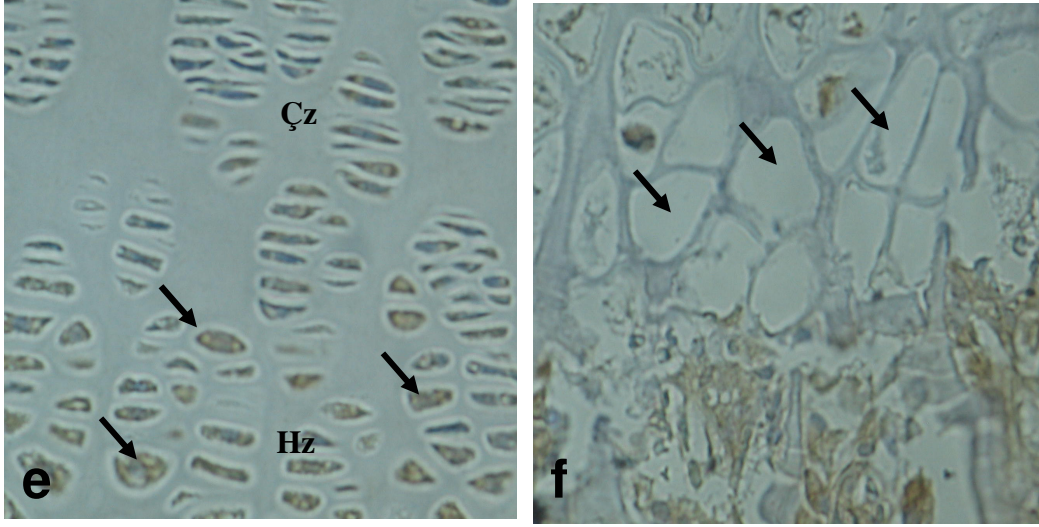


Şekil 4.7d-g. Embriyonik 19. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda Notch1 immunolokalizasyonu. **(d)** Çoğalma zonunda yoğun pozitif X40 **(e)** Hipertrofik zonda yoğun pozitif X40 **(f)** Kalsifikasyon zonunda negatif X40 **(g)** Kemikleşme zonunda çok yoğun pozitif X100. Kemikleşme bölgesinde, özellikle kemik trabekülleri (kt) çevresinde yerleşik olan osteoblastlar (çift oklarla) ve kapiller (ka) içerisindeki bazı eritrositlerde (oklarla) yoğun Notch1 immunoboyanması dikkat çekicidir.

Doğum sonrası 10 günlük grupta Notch1 immunolokalizasyonu, eklem kıkırdağının yüzeysel zonunda negatif, geçiş zonunda pozitif, derin zonunda çok yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda zayıf pozitif olarak gözlemlendi (Şekil 4.8a-c.). Sekonder kemikleşme merkezinde Notch1 immunoboyanması, kemik trabekülü çevresindeki osteoblastlarda çok yoğun pozitif reaksiyon verdi (Şekil 4.8d.). Büyüme plağında, çoğalma zonu hücrelerinde zayıf, hipertrofik zon hücrelerinde yoğun pozitif Notch1 immunoboyanması gözlenirken, kalsifikasyon zonu hücrelerinde immunoboyanma gözlenmedi (Şekil 4.8e,f.).

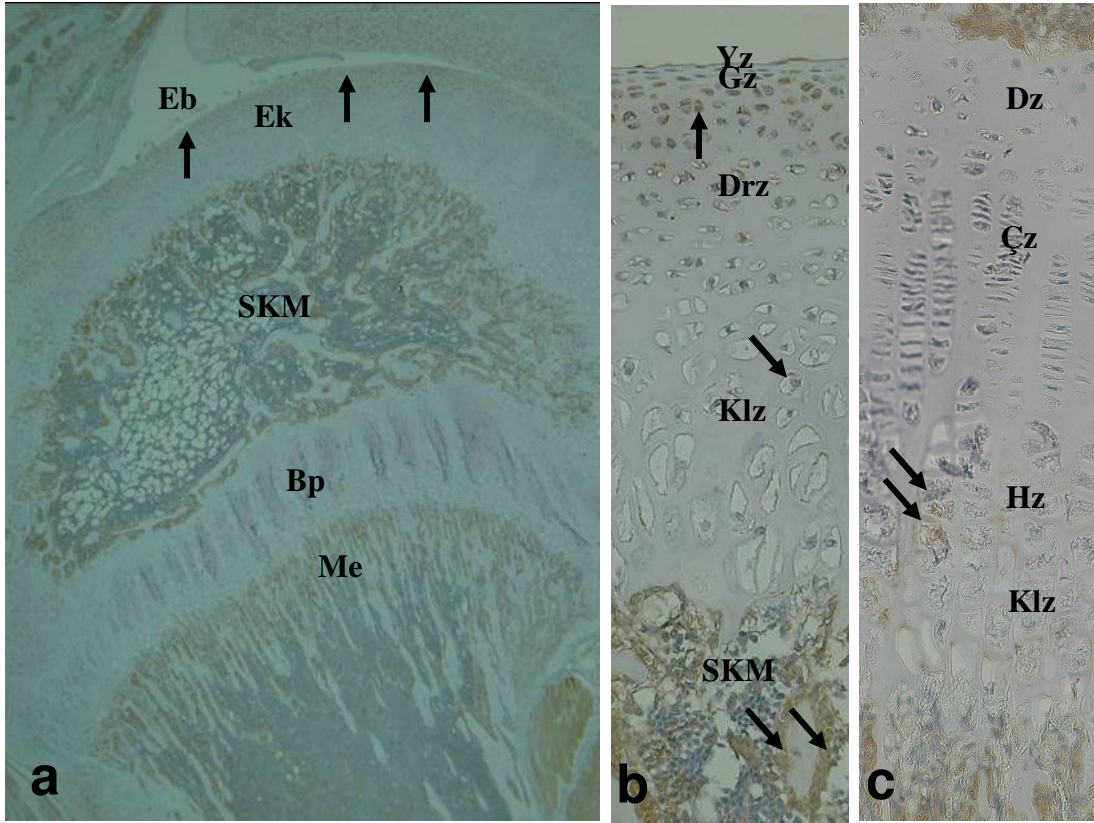


Şekil 4.8a-d. Doğum sonrası 10. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda Notch1 immunoboyanması. **a:** Genel görünüm (Eb: eklem boşluğu, Ek: eklem kıkırdağı, sekonder kemikleşme merkezi (okla), (Bp:büyüme plağı) X2,5. **b:** Eklem kıkırdağının yüzeysel zonunda (Yz) negatif, geçiş zonunda (Gz) pozitif (oklarla), derin zonunda (Drz) çok yoğun pozitif Notch1 immunoboyanması (oklarla). X40. **c:** Kalsifikasyon zonunda zayıf pozitif Notch1 immunoboyanması (oklarla). X40. **d:** Sekonder kemikleşme merkezinde, kemik trabekülü (kt) çevresindeki osteoblastlarda (oklarla) çok yoğun pozitif reaksiyon verdiği gözlenen Notch1 immunoboyanması gözlenmektedir. X40.



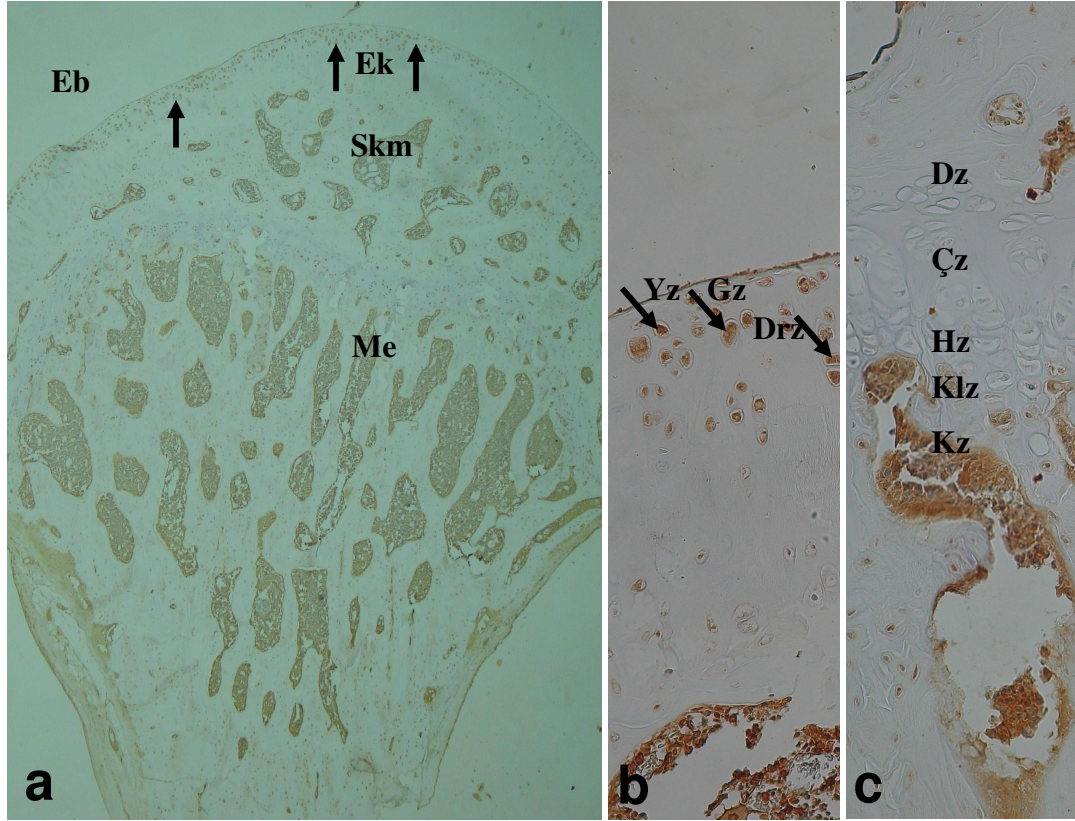
Şekil 4.8e-f. e: Doğum sonrası 10. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda büyüme plağı bölgesine, çoğalma zonu (Çz) hücrelerinde zayıf, hipertrofik zon (Hz) hücrelerinde yoğun pozitif (oklarla) Notch1 immunoboyanması. X40. f: Notch1 immunoboyanması göstermeyen kalsifikasyon zonu hücreleri (oklarla) gözlenmektedir X40.

Doğum sonrası 20 günlük grupta Notch1 pozitif immunoboyanmasının daha çok eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın olan geçiş ve derin zonlarında yoğunlaştığı belirlendi (Şekil 4.9a.). Bu dönemde, Notch1 pozitif immunoboyanması eklem kıkırdağı yüzeyel zonunda negatif, geçiş zonunda pozitif ve derin zonu hücrelerinde yoğun pozitif gözlenirken, kalsifikasyon zonunda negatifti. Sekonder kemikleşme merkezi osteoblastlarında ise çok yoğun pozitif immunoboyanma gözlendi (Şekil 4.9b.). Büyüme plağına ait depo, çoğalma ve kalsifikasyon zonlarında immunoboyanma gözlenmezken, hipertrofik zonda zayıf immunoboyanma gözlendi. Büyüme plağı kemikleşme zonunda ise osteoblastlarda yoğun aktivite gözlendi (Şekil 4.9c.).



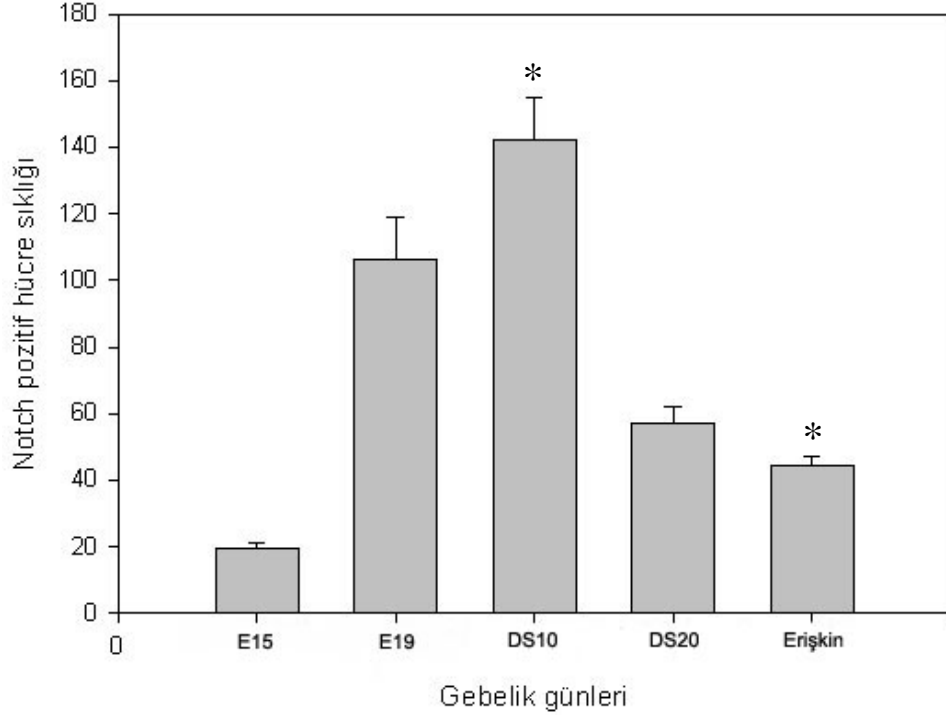
Şekil 4.9a-c. Doğum sonrası 20 günlük grupta Notch1 pozitif immunoboyanması. **a:** Eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın zonlardaki yoğunlaşan Notch1 pozitif immunoboyanması (oklarla). Eb: eklem boşluğu, Ek: eklem kıkırdağı, Skm: sekonder kemikleşme merkezi, Bp: Büyüme plağı, Me: metafiz bölgesi. X2,5. **b:** Eklem kıkırdağı yüzeyel zonunda (Yz) negatif, geçiş zonunda (Gz) pozitif ve derin zon (Drz) hücrelerinde yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda negatif gözlenen Notch1 pozitif immunoboyanması (oklarla). Ayrıca, sekonder kemikleşme merkezi (Skm) osteoblastlarında çok yoğun pozitif Notch1 immunolokalizasyonu (oklarla) gözlenmektedir. X20. **c:** Büyüme plağına ait depo (Dz), çoğalma (Çz) ve kalsifikasyon (Klz) zonlarında immunoboyanma gözlenmezken, hipertrofik zonda (Hz) zayıf Notch1 immunoboyanması (oklarla). X20.

Doğum sonrası erişkin sıçan humerusu epifiz kırırdağında, Notch1 pozitif immunoboyanması hemen hemen sadece eklem kırırdağının eklem yüzeyine yakın olan yüzeyel, geçiş ve derin zonlarında yoğunlaştığı belirlendi (Şekil 4.10a.). Bu dönemde, Notch1 pozitif immunoboyanması, eklem kırırdağının yüzeyel, geçiş ve derin zonun geçiş zonuna yakın üst bölümlerinde çok yoğun pozitif gözlenirken, kalsifikasyon zonunda negatifti (Şekil 4.10b.). Büyüme plağının tüm zonlarında immunoboyanma gözlenmezken, kemikleşme zonunda yoğun Notch1 aktivitesi gözlendi (Şekil 4.10c.).



Şekil 4.10a-c. Doğum sonrası erişkin sıçan humerusu epifiz kırırdağında Notch1 pozitif immunoboyanması. **a:** Eklem kırırdağının eklem yüzeyine yakın olan bölgelerinde yoğunlaşan Notch1 pozitif immunoboyanması (oklarla). Eb: eklem boşluğu, Ek: eklem kırırdağı, Skm: sekonder kemikleşme merkezi, Me: metafiz bölgesi. X2,5. **b:** Eklem kırırdağı yüzeyel zonu (Yz), geçiş (Gz) ve derin zonun geçiş zonuna yakın üst bölümlerinde çok yoğun pozitif gözlenen Notch1 pozitif immunoboyanması (oklarla). X20. **c:** Büyüme plağının tüm zonlarında gözlenmeyen Notch1 immunoboyanması. X20. Dz: depo zonu, Çz: çoğalma zonu, Hz: hipertrofik zon, Klz: kalsifikasyon zonu, Kz: kemikleşme zonu.

H-SCORE analizi ile Notch1 pozitif hücre sıklığı değerlendirildiğinde, DS20.güne kadar olan gelişim dönemlerinde Notch1 pozitif hücre sıklığı anlamlı bir şekilde giderek arttığı ve bu dönemden erişkin döneme doğru anlamlı bir şekilde düşmeye başladığı belirlendi ($p<0.001$).



Şekil 4.11. Notch1 pozitif hücre sıklığı. Şekilde Notch1 pozitif hücre sıklığının DS10. güne kadar anlamlı olarak arttığı, bu dönemden sonra anlamlı bir şekilde düşmeye başladığı görülmektedir (* $p<0,001$).

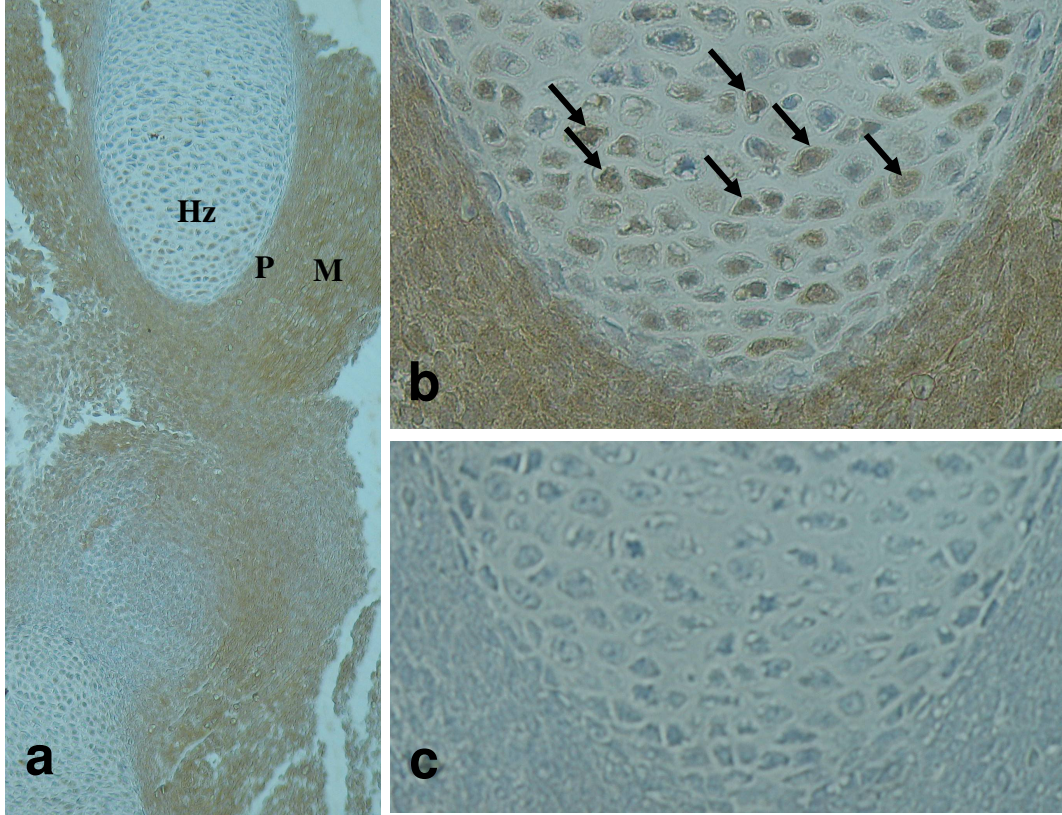
4.2.2 Delta

Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında Delta immunoyoğunluklarının dağılımı semikantitatif olarak değerlendirildi ve tablo 4.2.'de verildi.

EPIFİZ KIRIRDAĞI BÖLGELERİ		E15	E19	DS10	DS20	Erişkin
EKLEM KIRIRDAĞI	Yüzeysel Zon	0	(+)	0	0	+++
	Geçiş Zonu	0	(+)	(+)	+	+++
	Derin Zon	0	0	+	++	+++
	Kalsifikasyon Zonu	0	0	(+)	0	0
SEKONDER KEMİKLEŞME MERKEZİ		0	0	++	++	++
BÜYÜME PLAĞI	Depo Zonu	0	++	(+)	(+)	0
	Çoğalma Zonu	0	++	+	(+)	0
	Hipertrofik Zon	++	+++	++	(+)	0
	Kalsifikasyon Zonu	0	(+)	0	0	0
	Kemikleşme Zonu	0	+++	++	++	++

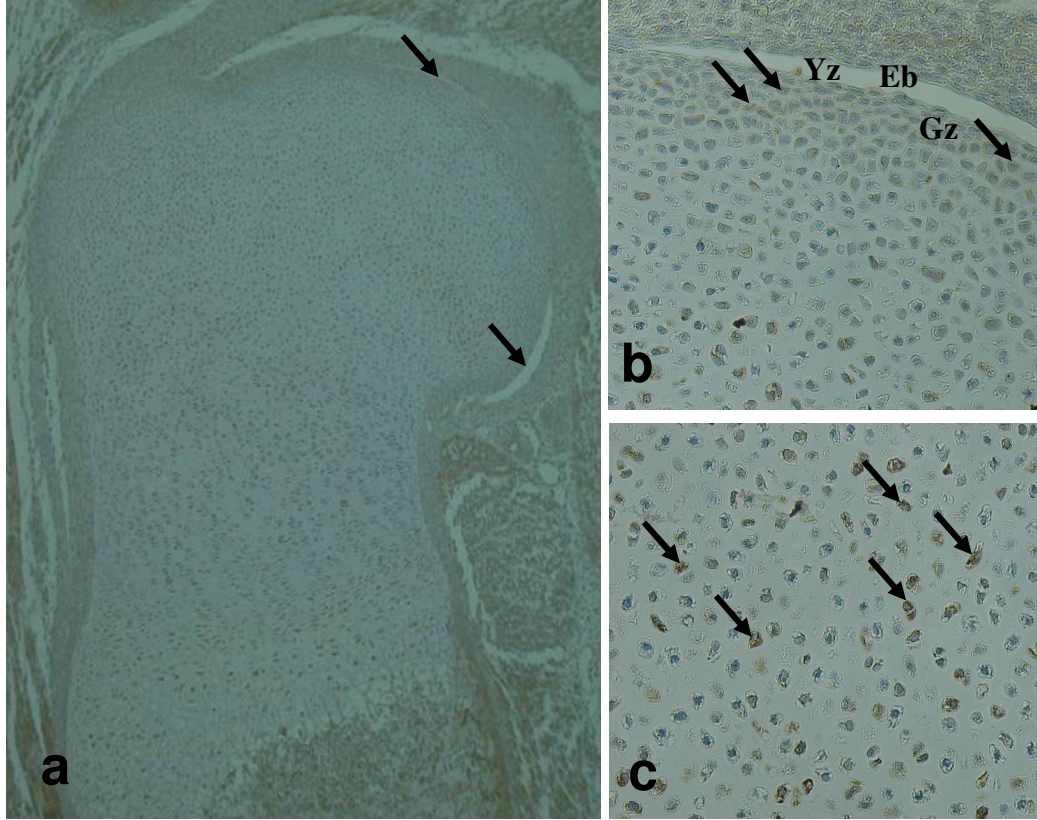
Tablo 4.2. Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında Delta immunoyoğunluklarının semikantitatif dağılımı. E: Embriyonik, DS: Doğum sonrası. 0:Negatif; (+): Zayıf Pozitif; +: Pozitif; ++: Yoğun Pozitif; +++: Çok Yoğun Pozitif; 0: Bölge mevcut değil.

Embriyonik 15. günde, Notch1 immunoboyanmasında olduğu gibi çevre mezenkimal bağ doku, perikondrium ve kıkırdak modelin sadece hipertrofik hücrelerinde lokalize olduğu görüldü. Bununla birlikte, Delta boyanmaları Notch1 boyanmasına göre daha yoğun gözlemlendi (Şekil 4.12a-c.).

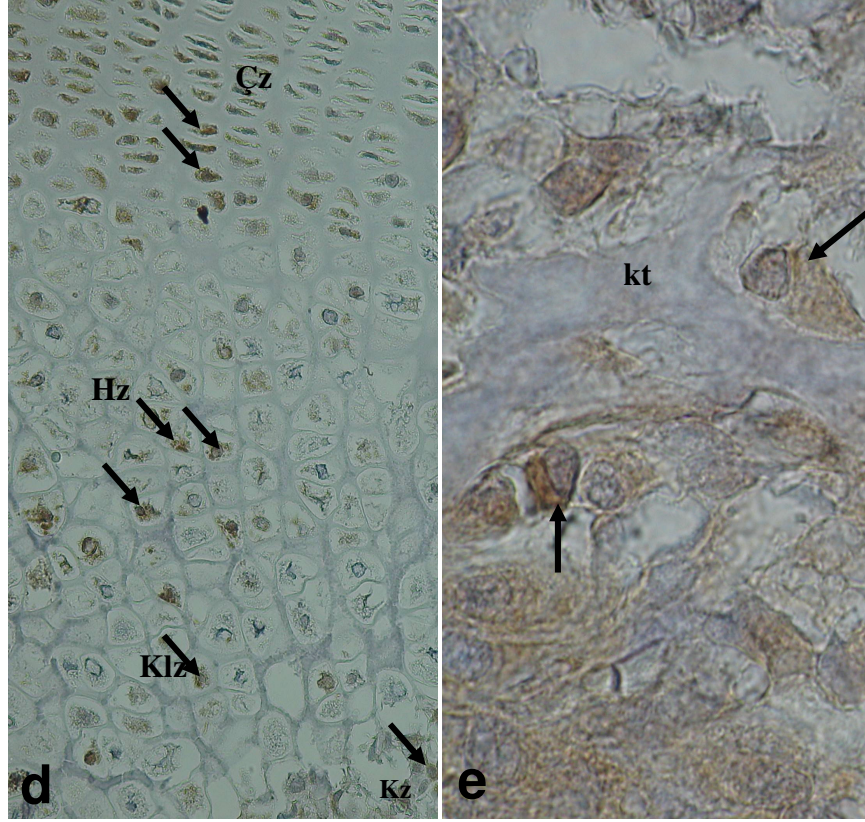


Şekil 4.12a-c. Embriyonik 15. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda Delta immuno lokalizasyonu. **a:** Genel görünüm. M: mezenkimal bağ doku, P: perikondrium, Hz: hipertrofik zon., 10X. **b:** Şekil a' da işaretli alanda yer alan Notch-1 yoğun pozitif hipertrofik hücreler (oklarla) gözlenmektedir. X40. **c:** Negatif kontrol X40.

E19 günlük sıçan humerusu epifiz kırırdağı dokusunda, eklem boşluğu komşuluğundaki yüzeyel ve geçiş zonlarında zayıf Delta immunoboyanmaları gözlenirken, depo zonunda ve çoğalma zonunda yoğun pozitif, hipertrofik zonda ve kemikleşme zonunda çok yoğun pozitif immunoboyanma gözlemlendi. Bununla birlikte kalsifikasyon zonunda zayıf yoğunlukta Delta immunoboyanması gözlemlendi. Kemikleşme bölgesinde, özellikle kemik trabekülleri çevresinde yerleşik olan osteoblastlarda çok yoğun Delta immunoboyanması gözlemlendi (Şekil 4.13a-d.).

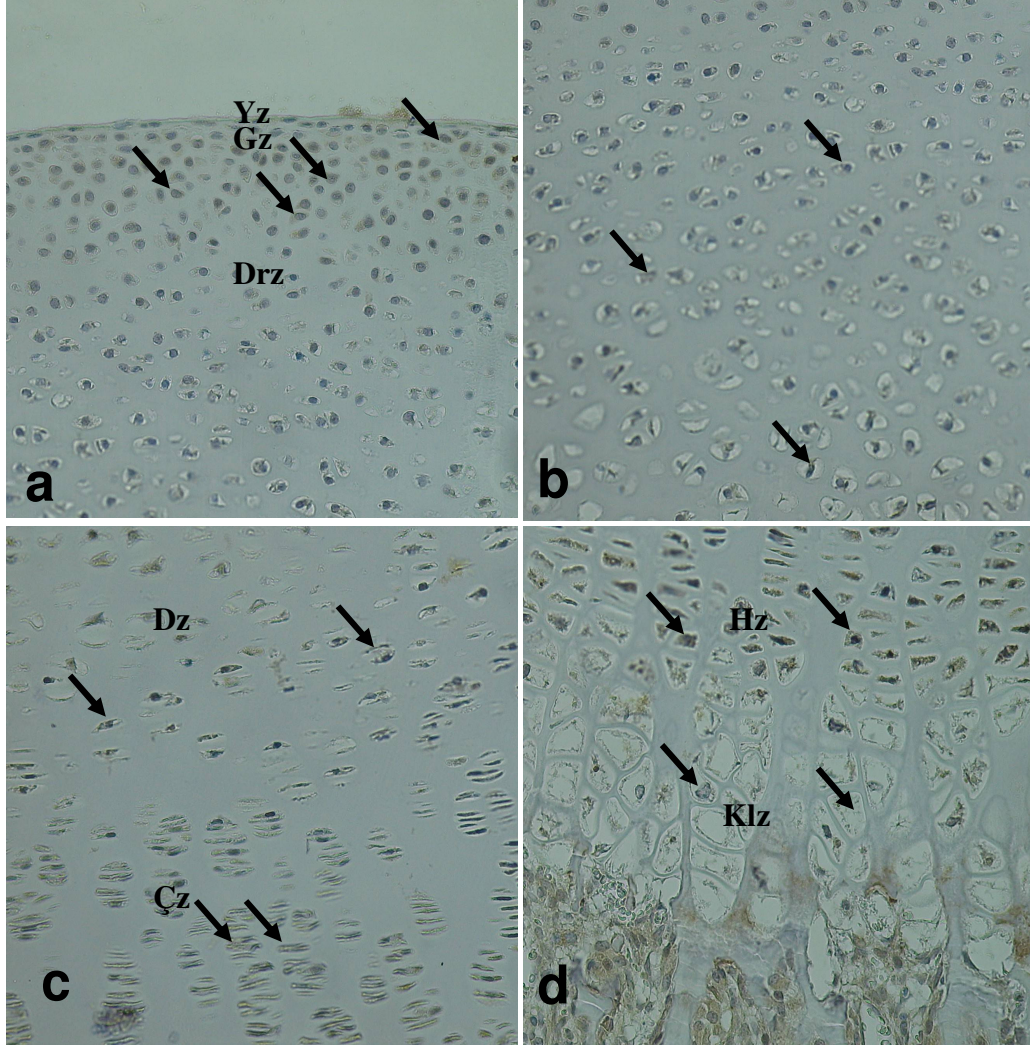


Şekil 4.13a-c. Embriyonik 19. güne ait epifiz kırırdağı dokusunda Delta immuno lokalizasyonu. **a:** Genel görünüm (oklar: eklem boşluğu, 5X. **b:** Eklem kırırdağında, eklem boşluğu (Eb) komşuluğundaki yüzeyel (Yz) ve geçiş (Gz) zonlarındaki zayıf Delta immunoboyanmaları (oklarla). X40. **c:** Depo zonunda yoğun Delta immunoboyanmaları (oklarla). X40.



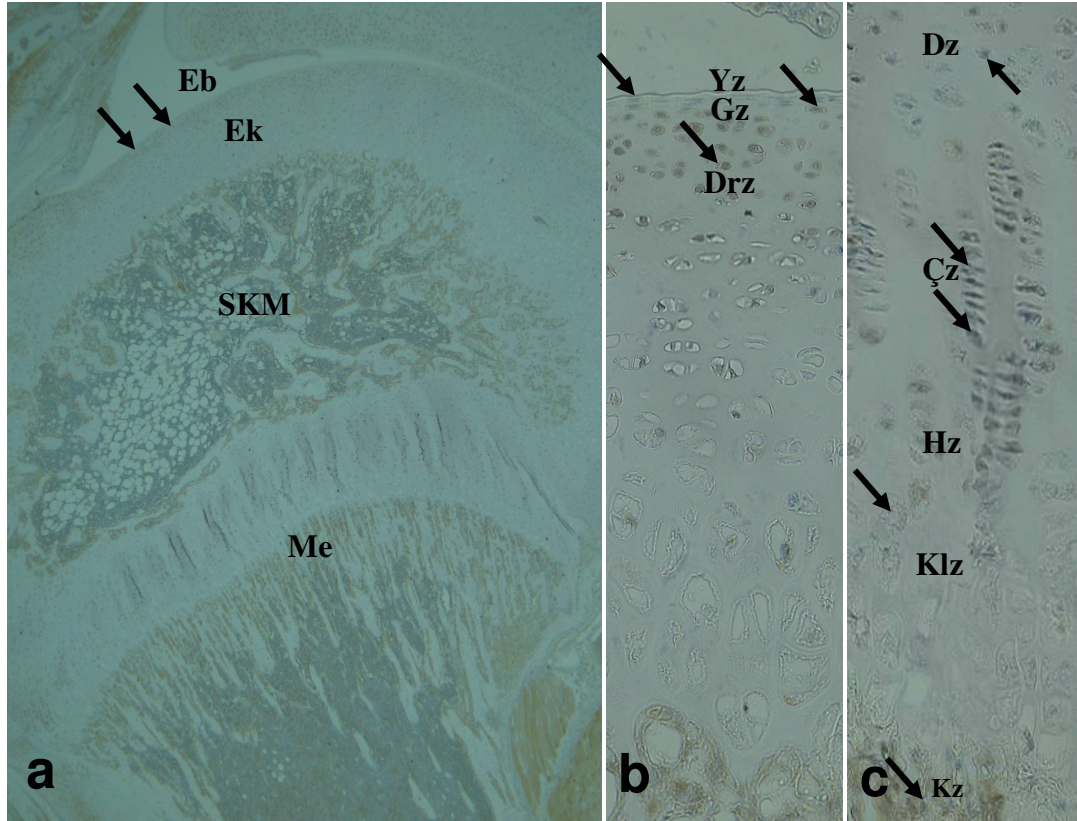
Şekil 4.13d,e. Embriyonik 19. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda Delta immuno lokalizasyonu. **d:** Çoğalma zonunda (Çz) ve hipertrofik zonda (Hz) yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda (Klz) zayıf pozitif kemikleşme (Kz) zonunda yoğun pozitif Delta immunoboyanması (oklarla) gözlenmektedir. X20. **e:** Kemikleşme bölgesinde, özellikle kemik trabekülleri (Kt) çevresinde yerleşik olan osteoblastlarda (oklarla) çok yoğun Delta immunoboyanması olması dikkat çekicidir. X100

Delta immunolokalizasyonu, doğum sonrası 10 günlük grupta eklem kıkırdağının yüzeyel zonunda negatif, geçiş zonunda zayıf pozitif, derin zonunda pozitif, kalsifikasyon zonunda zayıf pozitif şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.14a,b.). Büyüme plağında, depo zonunda zayıf pozitif, çoğalma zonu hücrelerinde pozitif, hipertrofik zon hücrelerinde yoğun pozitif Delta immunoboyanması gözlenirken, kalsifikasyon zonu hücrelerinde immunoboyanma gözlenmedi. Kemikleşme zonunda ise yoğun pozitif Delta immunoboyanma yoğunluğu gözlemlendi (Şekil 4.14c,d.).



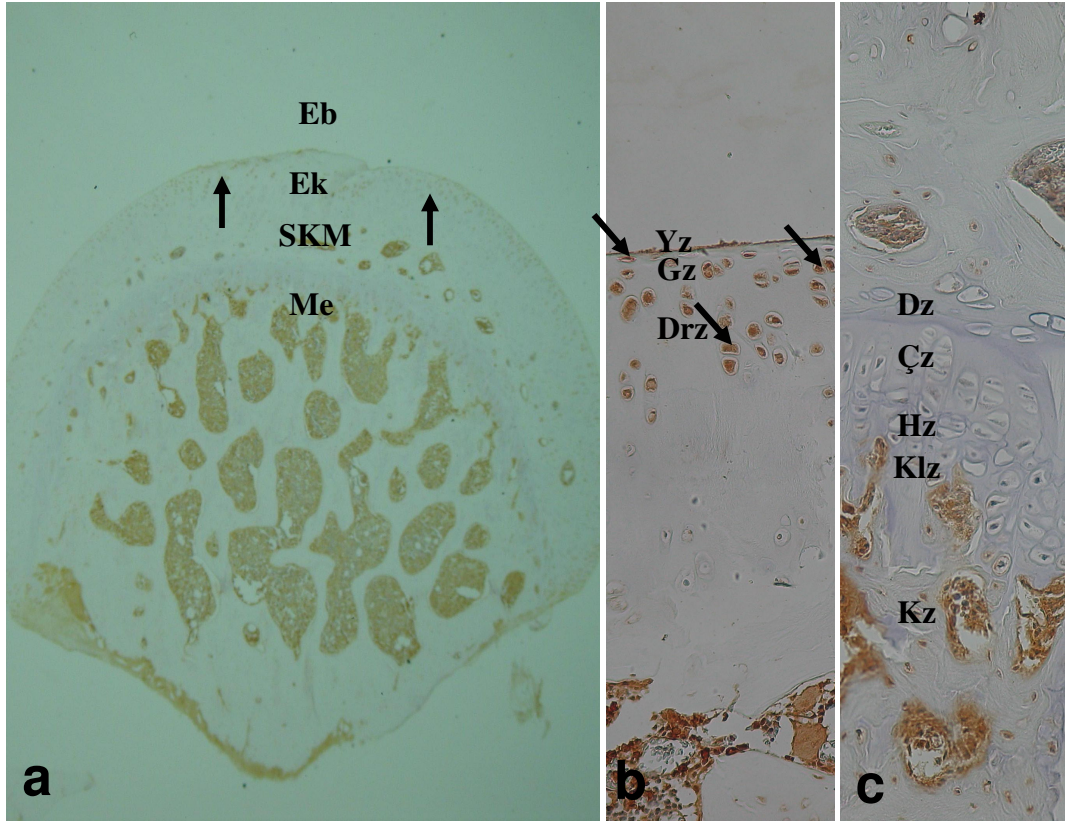
Şekil 4.14a-d. Doğum sonrası 10. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda Delta immunoboyanması. X20 **a:** Eklem kıkırdağının yüzeyel zonunda (Yz) negatif, geçiş zonunda (Gz) zayıf pozitif (oklarla), derin zonunda (Drz) pozitif Delta immunoboyanması (oklarla). **b:** Kalsifikasyon zonunda zayıf pozitif Delta immunoboyanması (oklarla). **c:** Büyüme plağının, depo zonunda (Dz) zayıf pozitif, çoğalma zonu (Çz) hücrelerinde pozitif Delta immunoboyanması. **d:** Hipertrofik zon (Hz) hücrelerinde yoğun pozitif Delta immunoboyanması gözlenirken, kalsifikasyon zonu (Klz) hücrelerinde immunoboyanma gözlenmemektedir. Kemikleşme zonunda gözlenen yoğun pozitif Delta immunoboyanması gözlenmektedir.

Doğum sonrası 20 günlük grupta Delta immunoboyanmasının Notch1 immunoboyanmasında olduğu gibi daha çok eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın olan geçiş ve derin zonlarında yoğunlaştığı belirlendi (Şekil 4.15a.). Bu dönemde, Delta immunoboyanması eklem kıkırdağı yüzeyel zonunda negatif, geçiş zonunda pozitif ve derin zon hücrelerinde yoğun pozitif gözlenirken, kalsifikasyon zonunda negatif (Şekil 4.15b.). Büyüme plağı depo, çoğalma ve hipertrofik zonlarında zayıf immunoboyanma gözlenirken, kalsifikasyon zonlarında immunoboyanma gözlenmedi. Büyüme plağı kemikleşme zonunda ise yoğun aktivite gözlendi (Şekil 4.15c.).



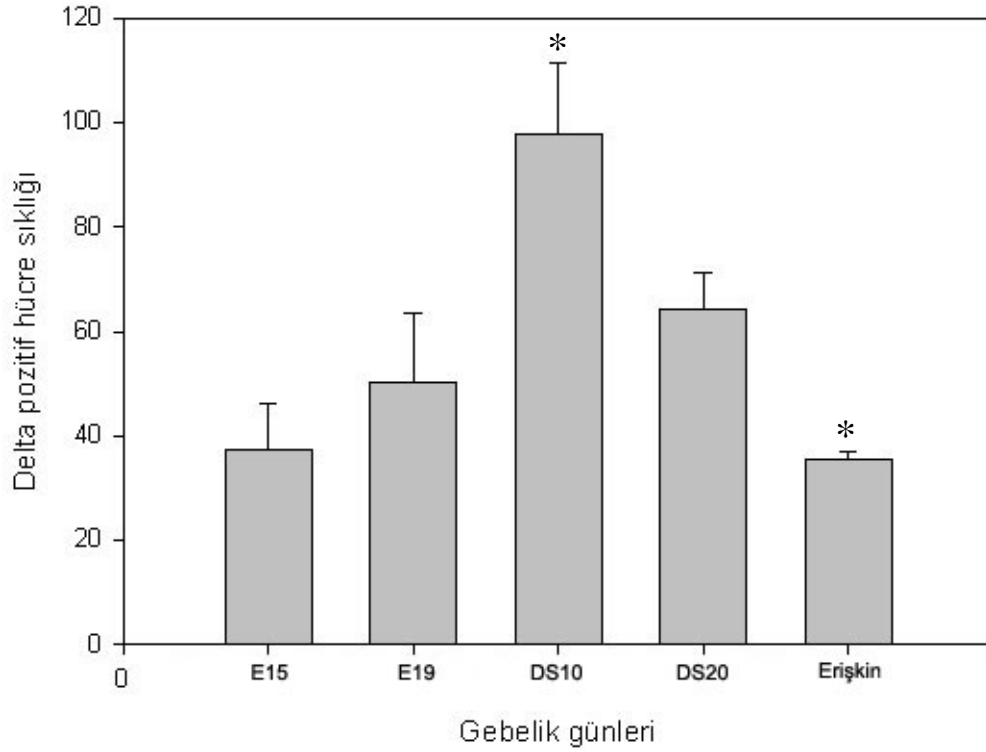
Şekil 4.15a-c.Doğum sonrası 20 günlük grupta Delta immunoboyanması. **a:** Eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın olan geçiş ve derin zonlarında yoğunlaşan Notch1 immunoboyanması (oklarla). Eb: eklem boşluğu, Ek: eklem kıkırdağı, Skm: sekonder kemikleşme merkezi, Me: metafiz bölgesi. X2,5. **b:** Eklem kıkırdağı yüzeyel zonunda (Yz) negatif, geçiş zonunda (Gz) pozitif ve derin zon (Drz) hücrelerinde yoğun pozitif kalsifikasyon zonunda negatif gözlenen Notch1 pozitif immunoboyanması (oklarla). X20. **c:** Büyüme plağı depo (Dz), çoğalma (Çz) ve hipertrofik (Hz) zonlarında zayıf, kalsifikasyon (Klz) zonunda immunoboyanma gözlenmezken, kemikleşme (Kz) zonunda yoğun immunoboyanması (oklarla). X20.

Doğum sonrası erişkin sıçan humerusu epifiz kırırdağında, Delta pozitif immunoboyanması, aynı gelişim dönemi Notch1 immunoboyanmasında olduğu gibi hemen hemen sadece eklem kırırdağının eklem yüzeyine yakın olan yüzeyel, geçiş ve derin zonlarında yoğunlaştığı belirlendi (Şekil 4.16a.). Bu dönemde, Delta immunoboyanması eklem kırırdağı yüzeyel zonda pozitif, geçiş ve derin zonun geçiş zonuna yakın üst bölümlerinde çok yoğun pozitif gözlenirken, kalsifikasyon zonunda negatifti (Şekil 4.16b.). Büyüme plağının tüm zonlarında immunoboyanma gözlenmezken, kemikleşme zonunda yoğun Delta immunolokalizasyonu gözlendi (Şekil 4.16c.).



Şekil 4.16a-c. Doğum sonrası erişkin sıçan humerusu epifiz kırırdağında Delta immunoboyanması. **a:** Eklem kırırdağının eklem yüzeyine yakın olan bölgelerinde yoğunlaşan Delta immunoboyanması (oklarla). Eb: eklem boşluğu, Ek: eklem kırırdağı, Skm: sekonder kemikleşme merkezi, Me: metafiz bölgesi. X2,5. **b:** Eklem kırırdağı yüzeyel zonu (Yz), geçiş (Gz) ve derin (Drz) zonun geçiş zonuna yakın üst bölümlerinde çok yoğun pozitif gözlenen Delta pozitif immunoboyanması (oklarla). X20. **c:** Büyüme plağı zonlarının tümünde gözlenemeyen ancak kemikleşme zonunda yoğun gözlenen Delta immunoboyanması. X20. Dz: depo zonu, Çz: çoğalma zonu, Hz: hipertrofik zon, Klz: kalsifikasyon zonu, Kz: kemikleşme zonu.

H-SCORE analizi ile Delta pozitif hücre sıklığı değerlendirildiğinde, Notch-1 pozitif hücre sıklığı bulgusuna benzerlik gösteren bir bulgu ile karşılaşıldı; Delta pozitif hücre sıklığının doğum sonrası 20.güne kadar anlamlı bir şekilde giderek arttığı ve bu dönemden sonra erişkin döneme doğru giderek düşmeye başladığı belirlendi ($p<0.001$).



Şekil 4.17. Delta pozitif hücre sıklığının doğum sonrası 20.güne kadar anlamlı bir şekilde giderek arttığı ve bu dönemden sonra erişkin döneme doğru giderek düştüğü görülmektedir (* $p<0.001$).

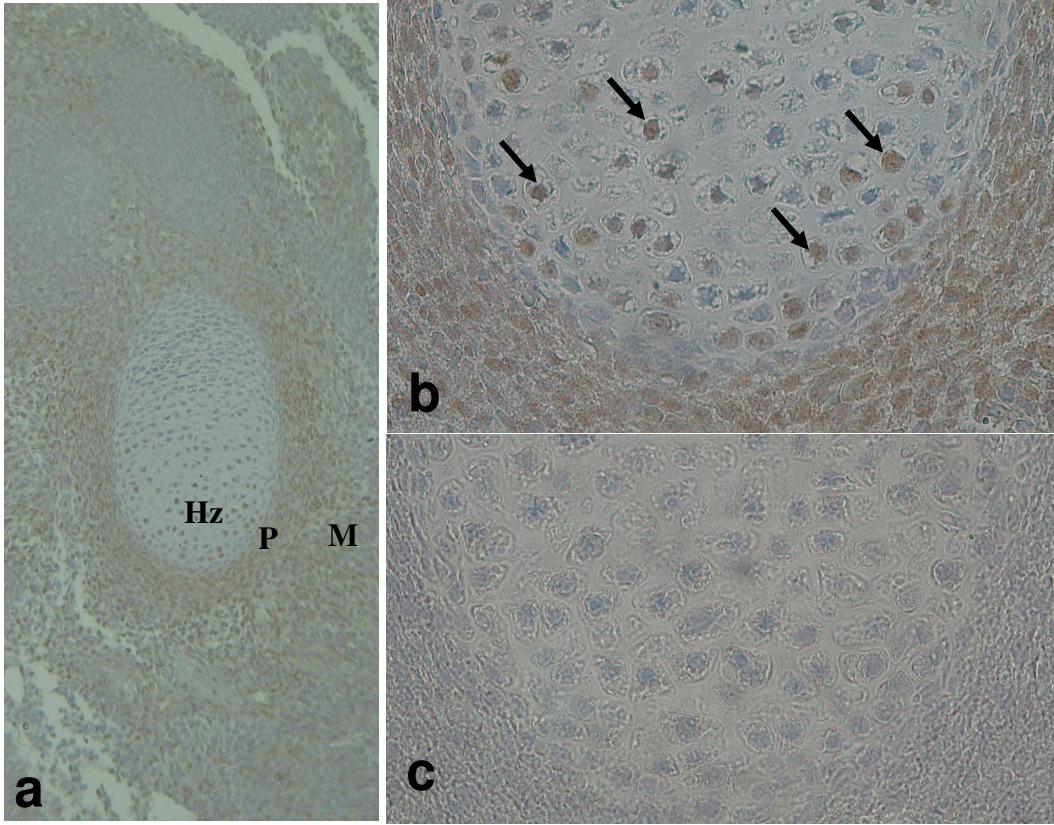
4.2.3 . CD105

CD105 gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kıkırdağı dokularında Delta immunoyoğunluklarının dağılımları semikantitatif olarak değerlendirildi ve tablo 4.3.'de verildi.

EPİFİZ KIKIRDAĞI BÖLGELERİ		E15	E19	DS10	DS20	Erişkin
EKLEM KIKIRDAĞI	Yüzeyel Zon	0	++	(+)	(+)	+++
	Geçiş Zonu	0	++	++	+++	+++
	Derin Zon	0	0	+++	+++	++
	Kalsifikasyon Zonu	0	0	(+)	0	0
SEKONDER KEMİKLEŞME MERKEZİ		0	0	++	++	+++
BÜYÜME PLAĞI	Depo Zonu	0	++	+	(+)	0
	Çoğalma Zonu	0	(+)	(+)	(+)	0
	Hipertrofik Zon	++	++	+	+	0
	Kalsifikasyon Zonu	0	(+)	0	0	0
	Kemikleşme Zonu	0	+++	+++	+++	+++

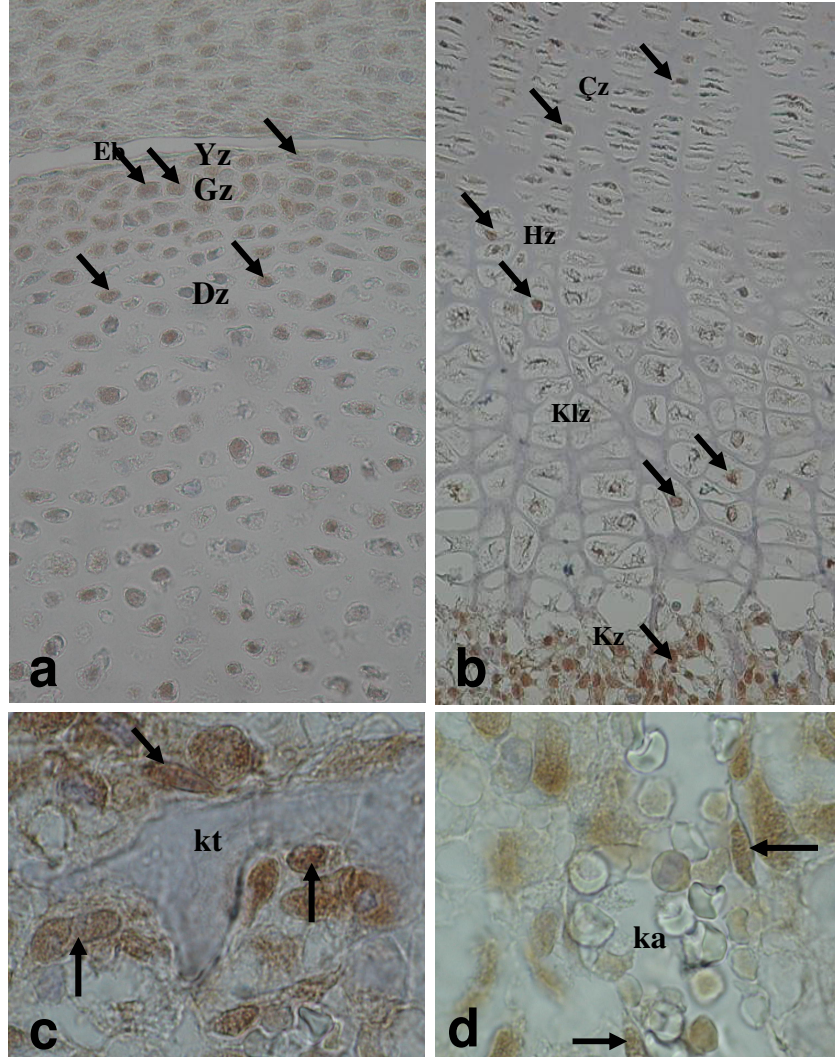
Tablo 4.3. Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kıkırdağı dokularında CD105 immunoyoğunluklarının semikantitatif dağılımları. E: Embriyonik, DS: Doğum sonrası. 0:Negatif; (+): Zayıf Pozitif; +: Pozitif; ++: Yoğun Pozitif; +++: Çok Yoğun Pozitif; 0: Bölge mevcut değil.

Embriyonik 15. günde, CD105 immunoboyanmasının Notch1 ve Delta immunoboyanmalarında olduğu gibi çevre mezenkimal bağ doku, perikondrium ve sadece kıkırdak modelin hipertrofik hücrelerinde lokalize olduğu görüldü. CD105 immunoboyanması, Delta boyanmasına benzerlik göstererek yoğun pozitif şiddette gözlemlendi (Şekil 4.18a-c.).



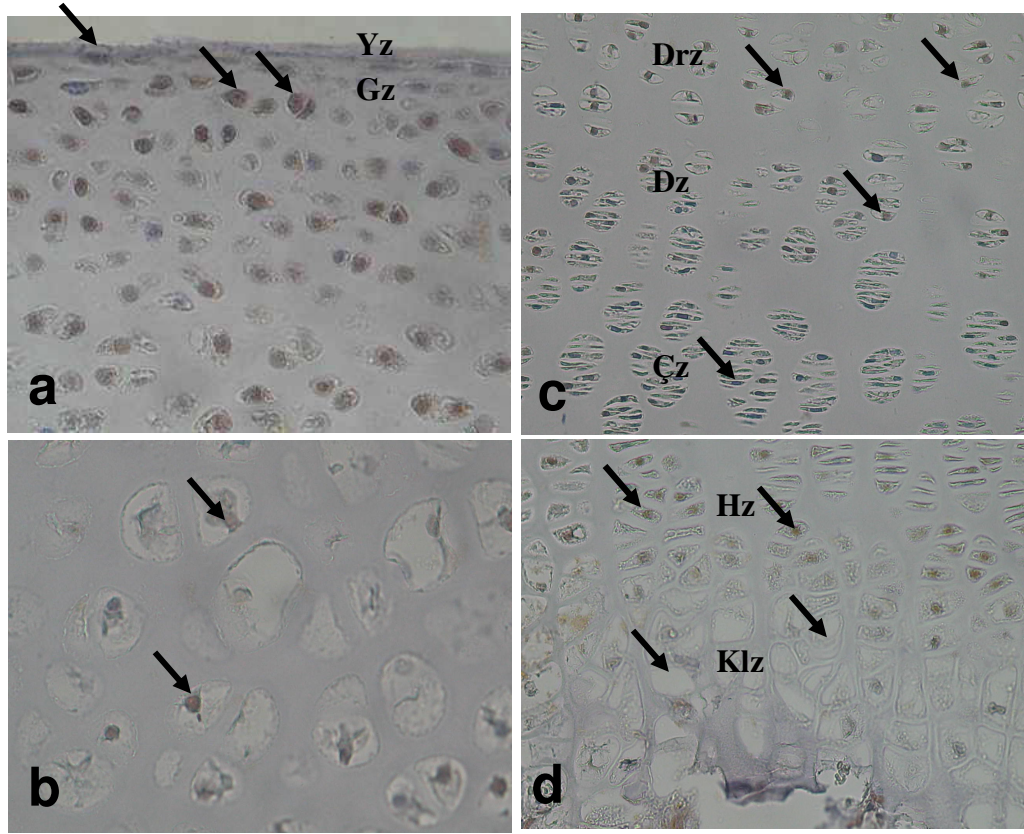
Şekil 4.18a-c. Embriyonik 15. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda CD105 immuno lokalizasyonu. **a:** Genel görünüm. M: Mezenkimal bağ doku, P: perikondrium, Hz: hipertrofik zon, 10X. **b:** Şekil a' da işaretli hipertrofik zonda yer alan CD105 pozitif hipertrofik hücreler (oklarla) gözlenmektedir. X40. **c:** Negatif kontrol X40.

Embriyonik 19. günde, tüm epifiz kıkırdağı total olarak incelendiğinde, CD105 immunoboyanmasının aynı döneme ait Notch1 ve Delta immunoboyanmalarından daha yoğun bir aktivite gösterdiği belirlendi. Bu dönemde, epifiz kıkırdağının yüzeyel, geçiş ve depo zonlarında yoğun pozitif CD105 immunoboyanması gözlemlendi (Şekil 4.19a.). CD105 immunoboyanma yoğunluğu çoğalma zonunda zayıf, hipertrofik zonda yoğun iken, kalsifikasyon zonunda zayıf pozitif, kemikleşme zonunda çok yoğun pozitif gözlemlendi (Şekil 4.19b.). Ayrıca, kemikleşme bölgesinde, özellikle kemik trabekülleri çevresinde yerleşik olan osteoblastlar ve kapiller endotel hücrelerinde yoğun CD105 immunoboyanması dikkat çekiciydi (Şekil 4.19c,d.).



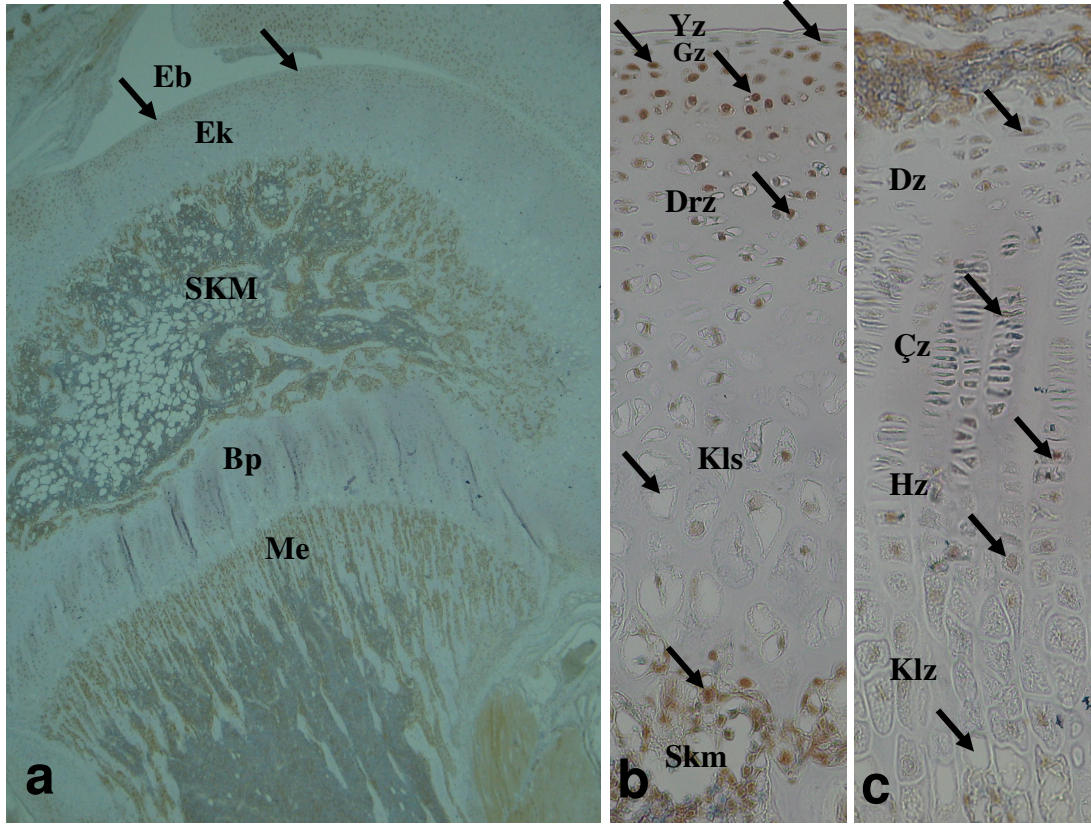
Şekil 4.19a-d. Embriyonik 19. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda CD105 immuno lokalizasyonu. **a:** Epifiz kıkırdağında, eklem boşluğu (Eb) komşuluğundaki yüzeyel (Yz), geçiş (Gz) ve depo (Dz) zonlarındaki yoğun CD105 immunoboyanmaları (oklarla). X20. **b:** Çoğalma zonunda (Çz) zayıf, hipertrofik zonda (Hz) yoğun, kalsifikasyon zonunda (Klz) zayıf pozitif, kemikleşme zonunda (Kz) çok yoğun pozitif gözlenen CD105 immunolokalizasyonu. X20. **c,d :** Kemikleşme bölgesinde, özellikle kemik trabekülleri (Kt) çevresinde yerleşik olan osteoblastlar (Şekil c'de oklarla) ve kapiller (ka) endotel hücrelerinde (Şekil d'de oklarla) çok yoğun CD105 immunoboyanması olması dikkat çekicidir. X100.

Doğum sonrası 10 günlük sıçan eklem kıkırdağının yüzeyel zonunda zayıf pozitif, geçiş zonunda ise yoğun pozitif, derin zonunda çok yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda zayıf pozitif CD105 immunoboyanması gözlemlendi (Şekil 4.20a,b.). Büyüme plağında, depo zonunda pozitif, çoğalma zonu hücrelerinde zayıf pozitif CD105 immunoboyanması gözlenirken (Şekil 4.20c.), hipertrofik zonda pozitif yoğunlukta gözlemlendi. Kalsifikasyon zonu hücrelerinde immunoboyanma gözlenmedi (Şekil 4.20d.).



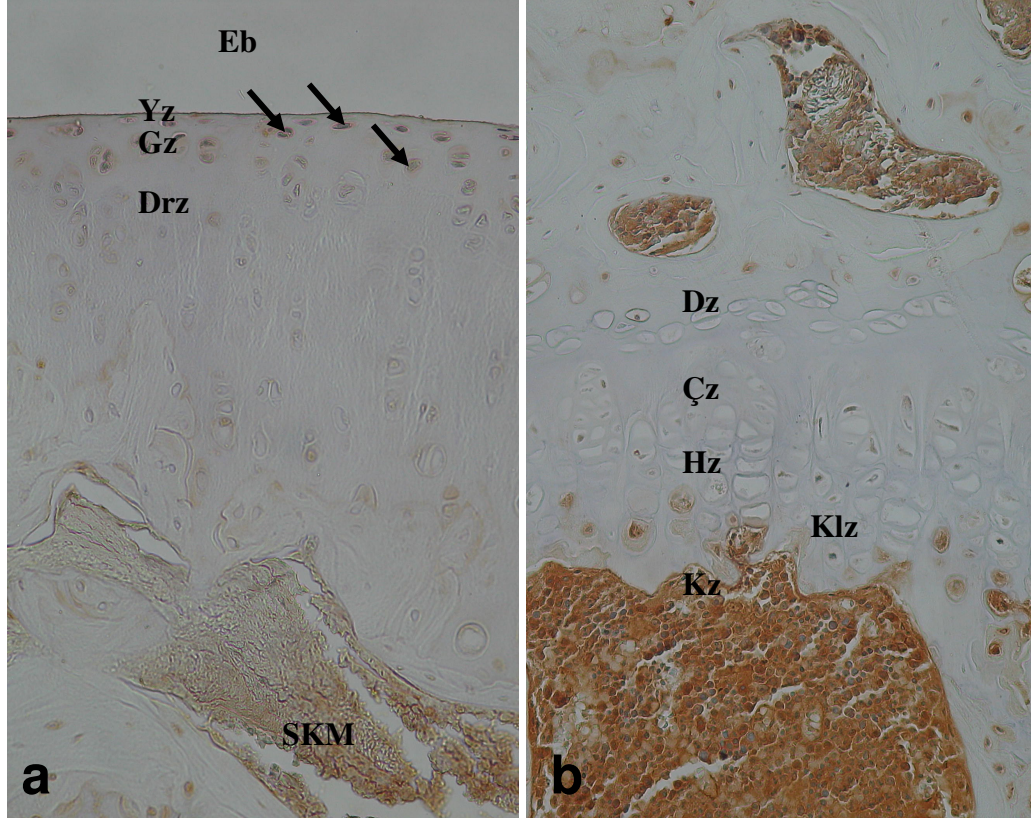
Şekil 4.20a-d. Doğum sonrası 10. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda CD105 immunoboyanması. **a,b:** Eklem kıkırdağının yüzeyel zonunda (Yz) pozitif, geçiş zonunda (Gz) yoğun pozitif (Şekil a'da oklarla), derin (Drz) zonunda çok yoğun pozitif (Şekil b'de oklarla) X20. **c:** Büyüme plağında, depo zonunda (Dz) pozitif, çoğalma zonu (Çz) hücrelerinde zayıf pozitif (oklarla). X20. **d:** Hipertrofik zonda (Hz) pozitif (oklarla), kalsifikasyon zonunda ise (Klz) immunoboyanma gözlenmemektedir X20.

Doğum sonrası 20. günde, CD105 immunoboyanması Notch1 ve Delta immunoboyanmalarında olduğu gibi daha çok eklem kıkırdağının eklem boşluğuna komşu bölgelerinde yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 4.21a.). Bu dönemde eklem kıkırdağı yüzeysel zonunda zayıf pozitif, geçiş ve derin zonlarında çok yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda ise negatif immunoboyanma gözlemlendi. Sekonder kemikleşme merkezinde çok yoğun pozitif aktivite gözlemlendi (Şekil 4.21.). Büyüme plağında, depo ve çoğalma zonlarında zayıf, hipertrofik zonda pozitif, immunoboyanma yoğunluğu gözlenirken kalsifikasyon zonunda, immunoboyanma gözlenmedi (Şekil 4.21c.).



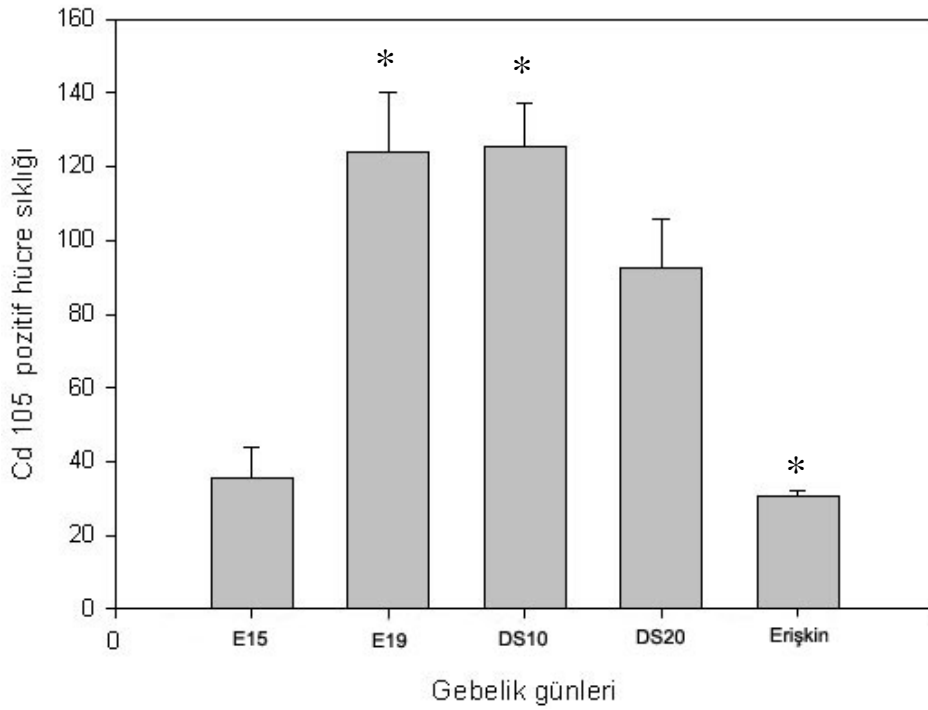
Şekil 4.21a-c. Doğum sonrası 20 günlük grupta CD105 immunoboyanması. **a:** Eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın olan bölgelerinde yoğunlaşan CD105 immunoboyanması (oklarla). Eb: eklem boşluğu, Ek: eklem kıkırdağı, Skm: sekonder kemikleşme merkezi, Bp: büyüme plağı, Me: metafiz bölgesi. X2,5. **b:** Eklem kıkırdağı yüzeysel zonunda (Yz) zayıf, geçiş zonunda (Gz) ve derin zon (Drz) hücrelerinde çok yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda negatif (oklarla), sekonder kemikleşme merkezinde (Skm) ise çok yoğun pozitif (oklarla) immunolokalizasyonu gözlenmektedir. X20. **c:** Büyüme plağı depo (Dz), çoğalma (Çz) zonlarında zayıf pozitif, hipertrofik zonda (Hz) pozitif CD105 immunolokalizasyonu (oklarla) gözlenirken, kalsifikasyon (Klz) zonunda immunoboyanma gözlenmemektedir. X20.

Doğum sonrası erişkin humerusu eklem kıkırdağının yüzeyel ve geçiş zonlarında çok yoğun, derin zonun üst bölgesinde yoğun pozitif CD105 immunoboyanması gözlenirken, kalsifikasyon zonunda immunoboyanma gözlenmedi (Şekil 4.22a.). Bu dönemde, büyüme plağının tüm zonlarında CD105 immunoboyanması gözlenmedi (Şekil 4.22b.).



Şekil 4.22a,b. Doğum sonrası erişkin sıçan humerusu epifiz kıkırdağında CD105 pozitif immunoboyanması. **a:** Eklem kıkırdağı yüzeyel (Yz) ve geçiş (Gz) zonlarında çok yoğun, derin zonun geçiş zonuna yakın üst bölümlerinde yoğun pozitif gözlenen CD105 immunoboyanması (oklarla). (Eb: eklem boşluğu, Skm: sekonder kemikleşme merkezi). X20. **b:** Büyüme plağının tüm zonlarında gözlenemeyen CD105 immunoboyanması. X20. Dz: depo zonu, Çz: çoğalma zonu, Hz: hipertrofik zon, Klz: kalsifikasyon zonu, Kz: kemikleşme zonu. Me: metafiz bölgesi.

H-SCORE analizi ile CD105 pozitif hücre sıklığı değerlendirildiğinde; E19. ve DS10. günlerdeki CD105 pozitif hücre sıklığı E15. günlük epifiz kıkırdağındaki pozitif hücre sıklığına göre anlamlı bir şekilde daha yüksekti. Erişkin epifiz kıkırdağındaki CD105 pozitif hücre sıklığı ise E19. ve DS10. günlerdeki pozitif hücre sıklığına göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.001$).



Şekil 4.23. CD105 pozitif hücre sıklığı. Şekilde, E19. ve DS10. günlerdeki CD105 pozitif hücre sıklığının E15. günlük ve erişkin epifiz kıkırdağındaki CD105 pozitif hücre sıklığına göre anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir (* $p<0.001$).

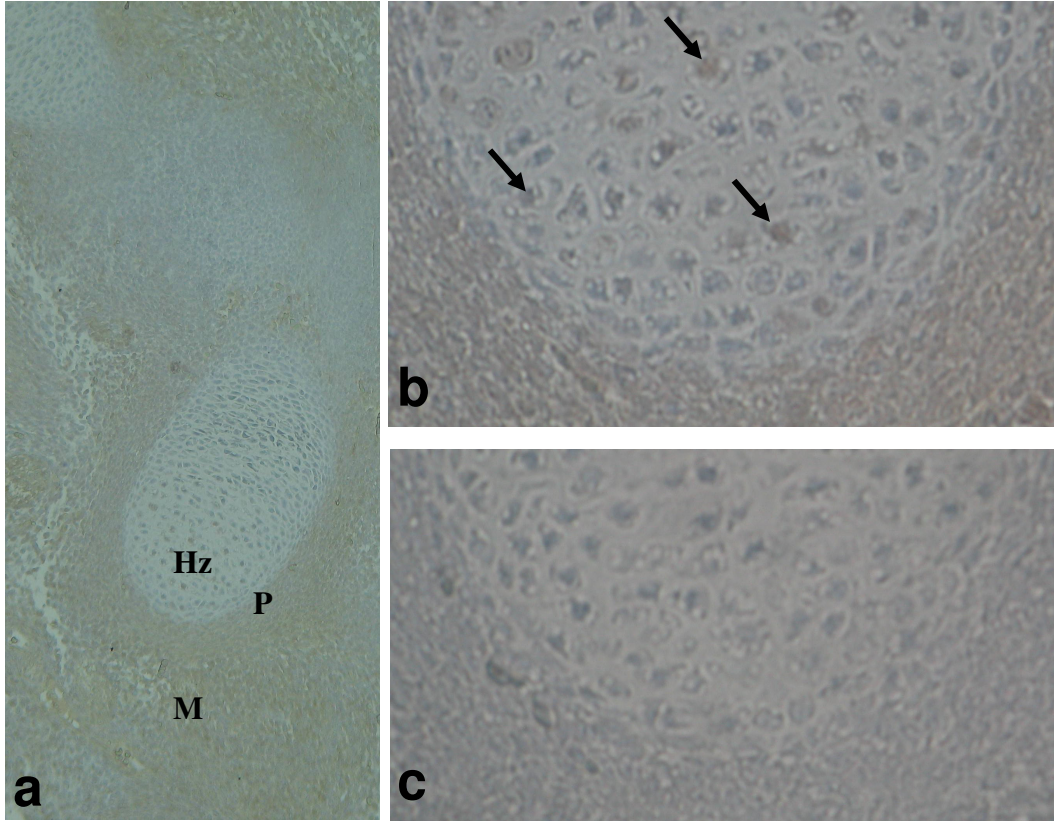
4.2.4 CD166

Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında CD166 immunoyoğunluklarının dağılımı semikantitatif olarak değerlendirildi ve tablo 4.4.'de verildi.

EPIFİZ KIRIRDAĞI BÖLGELERİ		E15	E19	DS10	DS20	Erişkin
EKLEM KIRIRDAĞI	Yüzeysel Zon	θ	+++	+	(+)	+++
	Geçiş Zonu	θ	+++	+++	++	+++
	Derin Zon	θ	θ	++	++	++
	Kalsifikasyon Zonu	θ	θ	(+)	0	0
SEKONDER KEMİKLEŞME MERKEZİ		θ	θ	++	++	++
BÜYÜME PLAĞI	Depo Zonu	θ	++	+	0	0
	Çoğalma Zonu	θ	(+)	+	0	0
	Hipertrofik Zon	+	+++	++	(+)	0
	Kalsifikasyon Zonu	θ	(+)	0	0	0
	Kemikleşme Zonu	θ	+++	+++	+++	+++

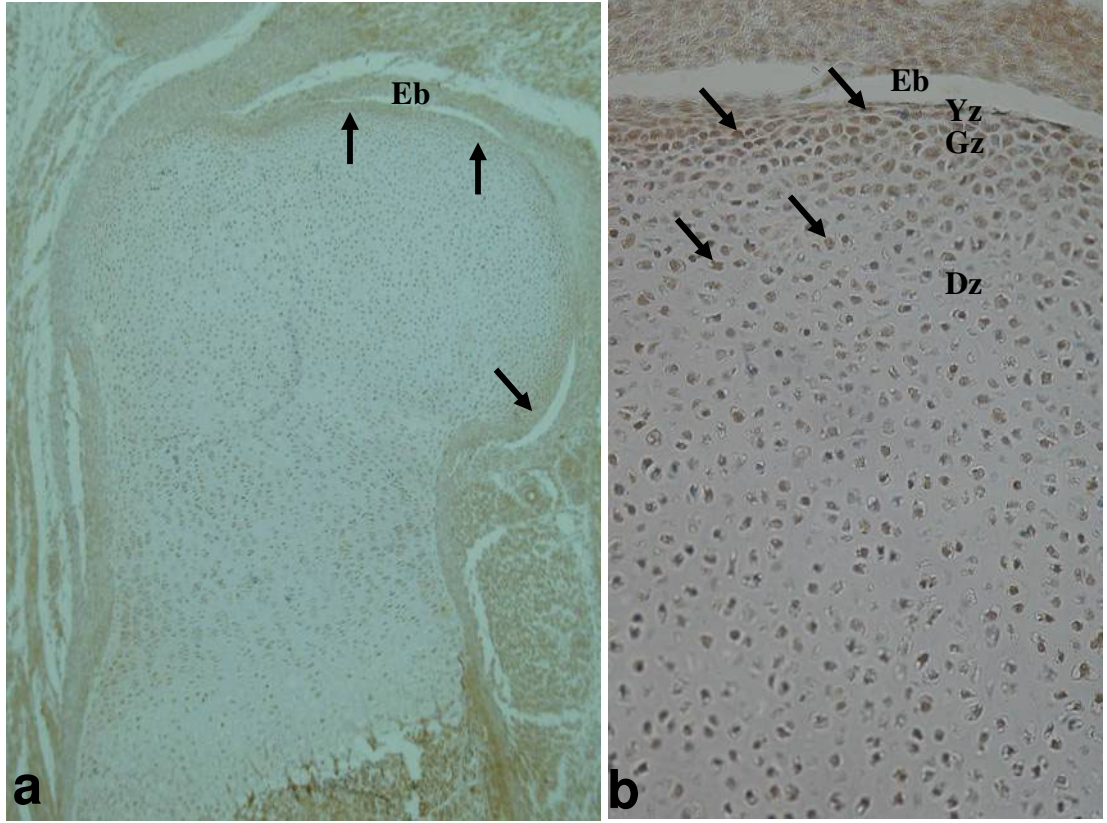
Tablo 4.4. Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizi kırırdağı dokularında CD166 immunoyoğunluklarının semikantitatif dağılımı. E: Embriyonik, DS: Doğum sonrası. 0:Negatif; (+): Zayıf Pozitif; +: Pozitif; ++: Yoğun Pozitif; +++: Çok Yoğun Pozitif; θ: Bölge mevcut değil.

Embriyonik 15. günde, CD166 immunoboyanmasının çevre mezenkimal bağ doku, perikondrium ve kıkırdak modelin sadece hipertrofik hücrelerinde lokalize olduğu görüldü. Lokalizasyonun yoğunluğu, Notch1 immunoboyanması ile benzerlik gösterdi (Şekil 4.24a-c.).

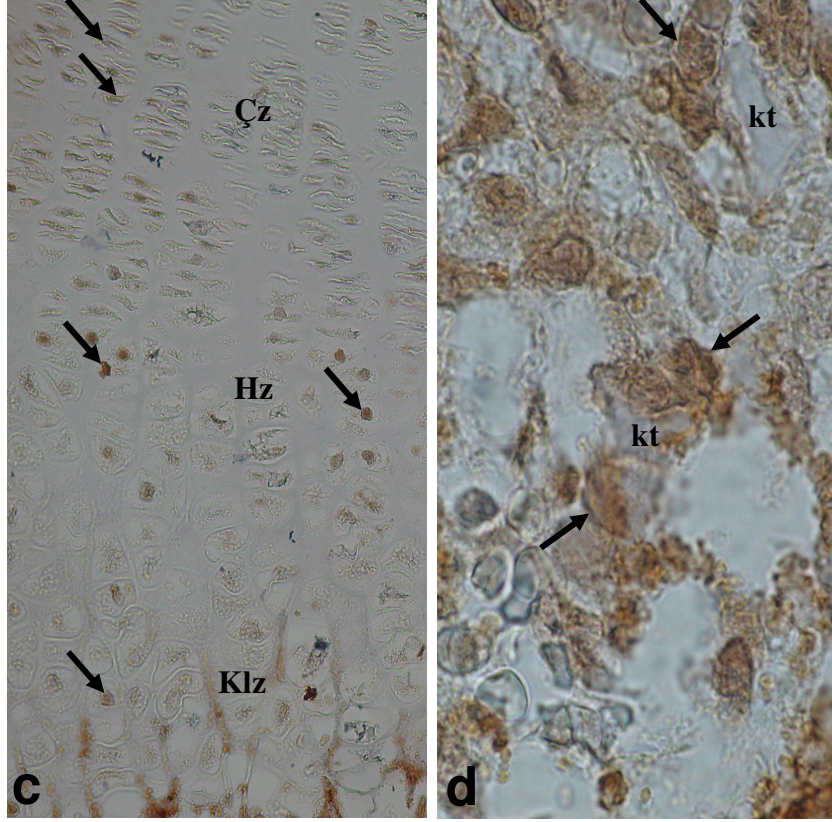


Şekil 4.24a-c. Embriyonik 15. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda CD166 immuno lokalizasyonu. **a:** Genel görünüm. M: Mezenkimal bağ doku, P: perikondrium, Hz: hipertrofik zon, 10X. **b:** Şekil a'da işaretli hipertrofik (Hz) zonda yer alan CD166 pozitif hipertrofik hücreler (oklarla) gözlenmektedir. X40. **c:** Negatif kontrol X40.

E19 günlük sıçan humerusu epifiz kıkırdağı dokusunda, CD166 immunoboyanmasının daha çok eklem boşluğu komşuluğundaki alanlarda yoğunlaştığı belirlendi (Şekil 4.25a). Bu dönemde, yüzeysel ve geçiş zonlarında çok yoğun CD166 immunoboyanmaları gözlenirken, epifiz kıkırdağının depo zonunda yoğun pozitif lokalizasyon gözlemlendi (Şekil 4.25b.). Epifiz kıkırdağı çoğalma zonunda zayıf pozitif, hipertrofik zonda ve kemikleşme zonunda çok yoğun pozitif immunoboyanma gözlenirken, kalsifikasyon zonunda zayıf pozitif CD166 immunoboyanması vardı (Şekil 4.25c). Kemikleşme bölgesinde, özellikle kemik trabekülleri çevresinde yerleşik olan osteoblastlarda yoğun pozitif CD166 immunoboyanması gözlemlendi (Şekil 4.25d).

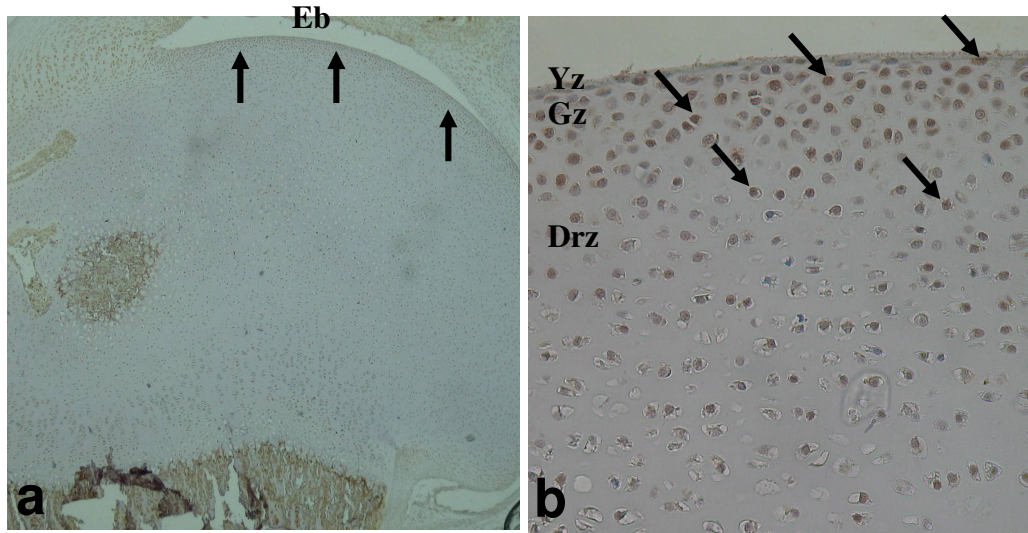


Şekil 4.25a,b. Embriyonik 19. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda CD166 immuno lokalizasyonu. **a:** CD166 immunoboyanmalarının daha çok eklem boşluğuna (Eb) yakın bölgelerde lokalize olduğu görülmektedir (oklarla). **b:** Eklem kıkırdağında, eklem boşluğu (Eb) komşuluğundaki yüzeysel (Yz) ve geçiş (Gz) zonlarındaki çok yoğun, depo zonunda ise yoğun pozitif CD166 immunoboyanmaları (oklarla). X40.

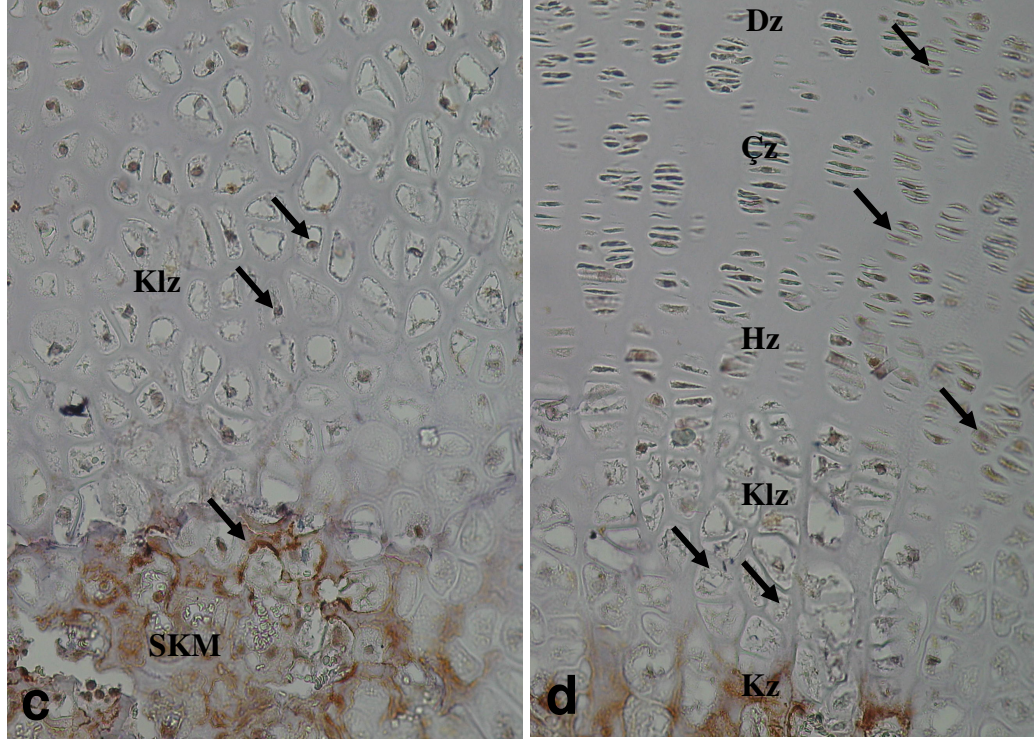


Şekil 4.25c,d. c:Embriyonik 19. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda çoğalma zonunda (Çz) zayıf pozitif, hipertrofik zonda (Hz) çok yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda (Klz) zayıf pozitif CD166 immunoboyanması. X40. d:Kemikleşme bölgesinde, özellikle kemik trabekülleri çevresinde yerleşik olan osteoblastlarda (oklarla) yoğun CD166 immunoboyanması dikkat çekicidir. X100

Doğum sonrası 10. günde, CD166 immunoboyanması hem eklem kıkırdağı ve hem de büyüme plağı zonlarında yoğun bir şekilde gözlenmekle birlikte immunoboyanmaların, daha çok eklem kıkırdağının eklem boşluğuna yakın bölgelerinde yoğunlaşmışığı görüldü (Şekil 4.26a.). Bu dönemde eklem kıkırdağı geçiş zonlarında çok yoğun, derin zonda yoğun CD166 immunolokalizasyonu gözlemlendi (Şekil 4.26b.). Eklem kıkırdağı kalsifikasyon zonunda immunoboyanma zayıf pozitif, sekonder kemikleşme merkezinde çok yoğun pozitif immunoboyanma vardı (Şekil 4.26c.). Büyüme plağının depo ve çoğalma zonlarında pozitif yoğunlukta gözlenirken, hipertrofik zonda yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda negatif ve kemikleşme zonunda çok yoğun pozitif CD166 immunoboyanma yoğunluğu gözlemlendi (Şekil 4.26d.).



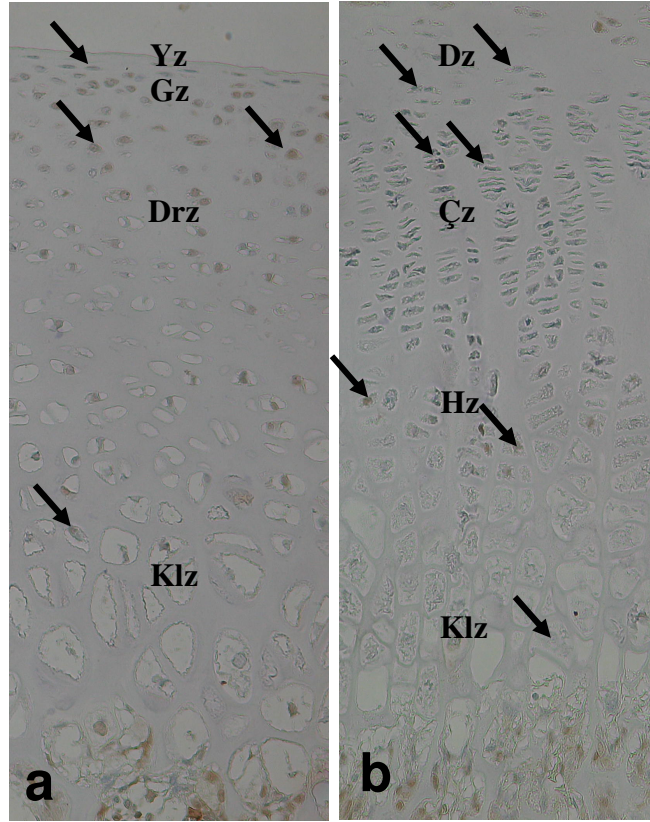
Şekil 4.26a,b. Doğum sonrası 10. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda CD166 immunoboyanması. **a:** CD166 immunoboyanmalarının daha çok eklem kıkırdağının eklem boşluğuna (Eb) yakın bölgelerinde yoğunlaştığı gözlenmektedir (oklarla). X2,5. **b:** Eklem kıkırdağının yüzeysel zonunda (Yz) pozitif, geçiş zonunda (Gz) çok yoğun, derin zonda yoğun pozitif CD166 immunoboyanması (oklarla). X40.



Şekil 4.26c,d. Doğum sonrası 10. güne ait epifiz kıkırdağı dokusunda CD166 immunoboyanması. **c:** Eklem kıkırdağı kalsifikasyon zonunda (Klz) zayıf pozitif, sekonder kemikleşme merkezinde (SKM) çok yoğun pozitif CD166 immunoboyanması (oklarla). X40. **d;** büyüme plağının depo (Dz), çoğalma (Çz) ve hipertrofik zonlarda (Hz) yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda (Klz) negatif ve kemikleşme zonunda (Kz) çok yoğun pozitif CD166 immunoboyanması (oklarla) X40.

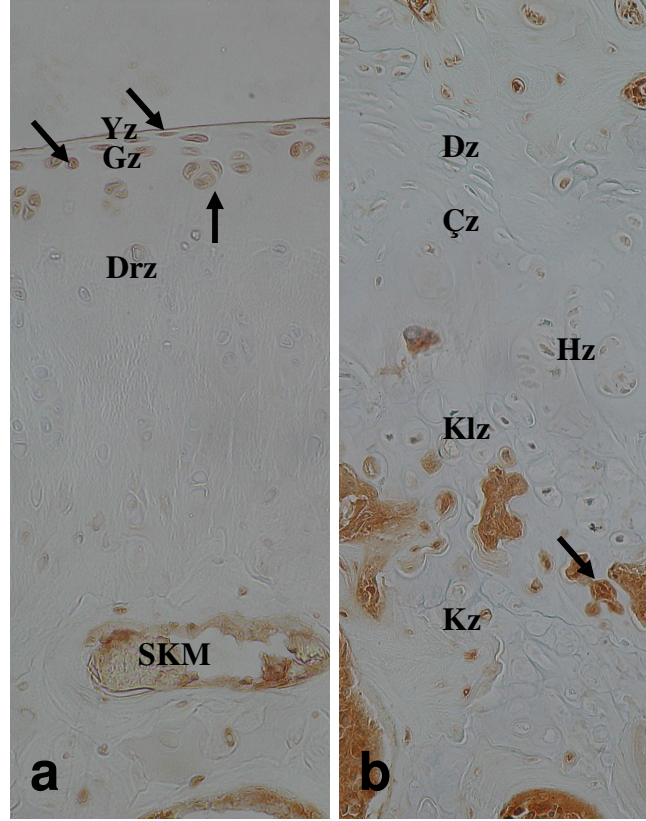
Doğum sonrası 20. günde, eklem kıkırdağı yüzeyel zonlarında zayıf, geçiş ve derin zonlarında yoğun pozitif immunoboyanma gözlenirken kalsifikasyon zonunda ise CD166 immunoboyanmasına rastlanmadı (Şekil 4.27a.).

CD166 immunoboyanması büyüme plağının, depo ve çoğalma zonlarında negatif, hipertrofik zonda zayıf pozitif yoğunlukda gözlenirken, kalsifikasyon zonunda immunoboyanma gözlenmedi (Şekil 4.27b.).



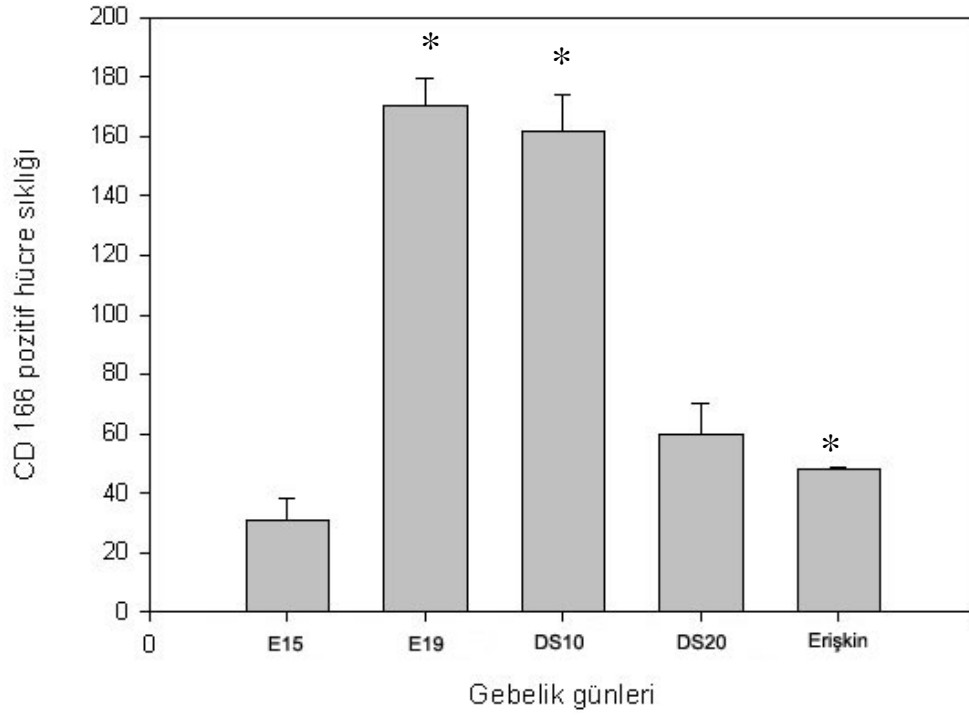
Şekil 4.27a,b. Doğum sonrası 20 günlük grupta CD166 pozitif immunoboyanması. **a:** Eklem kıkırdağı yüzeyel zonlarında (Yz) zayıf, geçiş zonunda (Gz) ve derin zonda (Drz) yoğun pozitif, kalsifikasyon zonunda (Klz) ise negatif gözlenen CD166 immunoboyanması (oklarla). X20. **b:** Büyüme plağında, depo (Dz) ve çoğalma (Çz) zonlarında negatif, hipertrofik zonda (Hz) zayıf pozitif yoğunluk gözlenirken (oklarla), kalsifikasyon (Klz) zonunda CD166 immunoboyanması gözlenmemektedir. X20.

Erişkin epifiz kırırdağında, CD166 immunoboyanmasının çalışılan diğer belirteçlerde olduğu gibi, daha çok eklem kırırdağının eklem boşluğuna yakın zonlarında yoğunlaştığı belirlendi. Bu dönemde eklem kırırdağı yüzeyel ve geçiş zonlarında çok yoğun pozitif, derin zonun üst bölgesinde yoğun CD166 immunoboyanması gözlenirken, kalsifikasyon zonunda negatif, sekonder kemikleşme merkezinde yoğun CD166 immunoboyanması gözlendi (Şekil 4.28a.). Büyüme plağında kemikleşme zonu dışındaki tabakalarda immunoboyanma gözlenmezken, kemikleşme zonunda yoğun CD166 aktivitesi gözlendi (Şekil 4.28b.).



Şekil 4.28a,b. Doğum sonrası erişkin sıçan humerusu epifiz kırırdağında CD166 pozitif immunoboyanması. **a:** Eklem kırırdağı yüzeyel zonu (Yz) ve geçiş (Gz) zonlarında çok yoğun, pozitif, derin zonun (Drz) üst bölgesinde yoğun, kalsifikasyon zonunda (Klz) negatif, sekonder kemikleşme merkezinde (Skm) yoğun CD166 immunoboyanması (oklarla) gözlenmektedir. X20. **b:** Büyüme plağında kemikleşme zonu (Kz) dışındaki tabakalarda immunoboyanma gözlenmezken, kemikleşme zonunda yoğun CD166 aktivitesi. X20

H-SCORE analizi ile CD166 pozitif hücre sıklığı değerlendirildiğinde, CD105 pozitif hücre sıklığı bulgusuna benzerlik gösteren bir bulgu ile karşılaştı; E19. gündeki CD166 pozitif hücre sıklığı çalışılan diğer belirteçlere oranla daha yüksek bulundu. Bu dönemdeki CD166 pozitif hücre sıklığı, gelişimin DS10. gününde de varlığını sürdürmekteydi. DS10. günden sonraki dönemde gelişim sürecine bağlı olarak yine anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiği gözlemlendi ($p<0.001$).



Şekil 4.29. CD105 pozitif hücre sıklığı. Şekilde, E19. gündeki CD166 pozitif hücre sıklığı çalışılan diğer belirteçlere oranla daha yüksek olduğu ve ayrıca DS10. günden sonraki dönemde gelişim sürecine bağlı olarak yine anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiği gözlenmektedir (* $p<0.001$).

TARTIŞMA

Organizmada kemik gelişiminin ilk dönemlerinde, epifiz bölgesinde önce sekonder kemikleşme merkezinin geliştiği, sonrasında ise eklem yüzeyinden aposizyonla eklem kıkırdağının büyüdüğü ve bu olayın eklem yüzeyel zon kondrositlerinin proliferasyonu ile gerçekleştiği gösterilmiştir (26).

Eklem kıkırdağının hem kondrosit morfolojisi hem de matriks biyokimyası, yüzeyel zondan kalsifiye zona doğru değişkenlik gösterir. Yüzeyel zon, yassı şekilli ve proteoglikan-4 salgılayan hücreler içerir. Orta zon, dik sütunlar şeklinde düzenlenmiş yuvarlak hücreleri içerir. Bu hücreler tip II kollajen ve agrekan yanında kıkırdak orta zon proteini de (cartilage intermediate layer protein, CILP) ekspres eder. Derin zon ve kalsifiye zon kondrositleri ekstremitte büyümesi süresince tip X kollajen ve alkalın fosfataz ekspres ederler (71-76). Değişik çalışmalar, eklem kıkırdağının yüzeyel zonunun, eklem kıkırdağı dokusunun gelişimi ve büyümesinin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığını göstermiştir (60, 77). Ayrıca, in vivo çalışmalarda, eklem kıkırdağı yüzeyel zonunun, eklem kıkırdağının aposizyonel büyümesinden sorumlu olduğunu ve bu büyümenin yüzeyel bölgenin 2-3 hücre tabakasında bulunan kondroprojenitör hücre popülasyonu ile gerçekleştiği gösterilmiştir (26, 60). Ayrıca, bu hücre popülasyonunun çoğunlukla Notch1 membran reseptörünü ekspres ettiği de vurgulanmıştır (27, 78).

Büyüme plağı, eklem kıkırdağında olduğu gibi hiyalin kıkırdak yapısındadır. Büyüme plağı, sekonder kemikleşme merkezinden diyafize doğru 5 bölgeye (zona) ayrılır; dinlenim (depo, rezerv) zonu, çoğalma (proliferasyon) zonu, hipertrofik zon, kalsifiye zon ve kemikleşme zonu. Memelilerde, uzun kemiklerin boyuna büyümeleri büyüme plağında oluşur (4, 37). Büyüme plağında dinlenim zonunun, kök hücre benzeri hücreler içermesinden dolayı endokondral kemikleşmede son derece önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (79).

Notch sinyal yolağı, sinir sistemi, vasküler sistem, hematopoietik sistem, somitler, kas, deri ve pankreas gibi birçok farklı dokuda hücre kaderi ile ilgili kararlarda rol oynar. Birçok durumda, Notch sinyalinin hücre farklılaşmasının bloklanması, hücreyi farklılaşmamış durumda kalmaya zorlar. Bu nedenle, Notch sinyali, farklılaşmaya karşı bir güvenlik görevlisi olarak değerlendirilmiştir (80). Ayrıca Notch1 ligandı Delta-like-1, epiderminin bazal katındaki keratinositlerde kök hücrelerdekine oranla daha düşük düzeyde ekspres olmaktadır. Yüksek Delta-like-1 ligandı ekspresyonu, kök hücre fenotipini tetiklemektedir (81). Notch ailesine ait reseptörler, osteoblastik farklılaşmada da rol oynamaktadır. Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada kortizolün etkisiyle Notch1'in mRNA düzeyinin osteoblastik MC3T3 hücrelerinde arttığı gösterilmiştir (82).

Son zamanlarda yayımlanan kaynaklar; Notch sinyal yolağının sadece hücrenin farklılaşmamış durumunda kalmasını sağlamadığı aynı zamanda hücrenin

proliferasiyona yönlendirilmesi veya farklılaşma aşamasında da görev alabileceğini göstermektedir. Örneğin, Notch sinyali nöroenezin ilk basamaklarında nöral potansiyel için gerekli hücre sayısının oluşabilmesi için hücrenin proliferasyona yönlendirilmesinde rol oynar, fakat daha sonraki aşamalarda, hangi hücre tipinin oluşacağını da belirleyebilir. Bu durumda araştırmacıların karşısına önemli bir soru çıkmaktadır. Bu soru, hücre gelişiminin hangi evresinde Notch reseptörü, hangi evresinde ilgili ligandının daha aktif olacağı ve aktivasyonu etkileyen faktörlerin neler olduğudur? (83).

Farelerde *in vivo*'da yapılan çalışmalar Notch fonsiyonunun anlaşılmasına yardımcı olmuştur; Notch1 ve 2 mutant farelerden elde edilen yavrularda embriyonik ölümler görülürken, Notch 3 ve 4 mutant farelerin yavrularında fenotipik değişiklik görülmemiştir (84). Bununla birlikte Notch 4^{-/-}; Notch 1^{-/-} homozigot mutant farelerde, Notch 1^{-/-} homozigot mutant farelerdekinden daha ciddi defektler oluşmuştur. Notch 1^{-/-}; Notch 3^{-/-} homozigot mutant farelerde ciddi bir değişiklik görülmemiştir (84). Delta1^{-/-}; Serrata^{-/-} homozigot mutant farelerde embriyonik olarak ölümler meydana gelmiştir (85, 86).

Hemangioblastlarda, Notch1 ve 4 eksprese olurken Notch2 eksprese olmamaktadır. Aksine Hematopoyetik progenitor hücrelerde Notch1 ve 2 eksprese olurken Notch4 eksprese olmamaktadır. Özetle bu sonuçlar göstermektedir ki, Notch1 hematopoyetik kök hücrelerin gelişimi için esastır. Notch sinyalinin, kemik iliği içerisinde hematopoyetik kök hücre (HKH) gelişiminde benzer bir rol alıp almadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, Notch sinyali, kemik iliğinde potansiyel kök hücre oluşumuna katılabilir (87-91).

Yukarıda adı geçen daha önceki çalışmaların sonuçlarına göre, Notch reseptörleri ve onların ligandlarının değişik tip dokulardaki fonksiyonları ve kök hücre gelişimindeki olası rolleri halen tartışmalıdır.

Biz çalışmamızda, Notch1 ve onun ligandı olan Delta ekspresyonunun erişkin sıçan eklem kırırdağında yüzeysel zonda diğer bölgelere oranla daha yüksek olduğunu gözledik. Bu bulgularımız, daha önceki hayvan eklem kırırdağlarında yapılmış çalışmaların (27, 60, 78) bulgularıyla uyumludur. Bulgularımız ışığında, erişkin sıçan eklem kırırdağı yüzeysel bölgesi progenitor hücre belirteci sayılan Notch1 ve onun ligandı Delta'yı yüksek düzeyde eksprese eden hücreler içermektedir. Nitekim, Notch ve Delta'nın birlikte ekspresyonunun hücrelerin farklılaşmamış durumda kalmalarını sağladığı ve kendilerini yenileyebilme yeteneklerini stimüle ettiği belirtilmiştir (91, 92).

Yaptığımız bu çalışmayla, gelişmekte olan sıçan epifiz kırırdağında, Notch1 ve Delta'yı çok yoğun eksprese eden hücrelerin, değişik gelişim yaşlarında zonal farklılıklar gösterdiği, E15. günde, mezenkimal bölgeler, perikondrium ve epifiz kırırdağı hipertrofik zonunda yoğunlaştığı, E19. günde, perikondrium, periosteum, epifiz kırırdağının eklem yüzeyine yakın bölgeleri, depo zonu, hipertrofik zon, kemikleşme zonunun eritrosit öncülleri ve osteoblastlarında yoğunlaştığı, DS10. günden başlayarak eklem kırırdağının yüzeye yakın bölgeleri hariç eklem kırırdağının ve büyüme plağının tüm zonlarında giderek azaldığı ve erişkin eklem

kıkırdağında eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın olan yüzeyel, geçiş ve üst derin zonlarında yoğunlaştığını gözlemledik.

Embriyonik dönemin endokondral kemikleşme aşaması öncesine rastlayan E15. gününde, kondrogenez sürecinin gerçekleşmekte olduğu kıkırdağ modelin çevre bölgelerinde ve primer kemikleşme merkezinin oluşacağı kıkırdağ modelin orta bölgelerindeki hipertrofik hücrelerde hem Notch1 hem de Delta'nın birlikte ekspresyonuna ilişkin bulgularımız, Notch-Delta etkileşimine bağlı sinyal yolağının hem kondrogenez hem de endokondral kemikleşmede etkin bir rol alabileceğinin bir göstergesi olabilir. Bu bulgumuzu destekleyen daha önce yapılmış bir çalışmada (93); Notch'un, kondrogenezin erken dönemlerinde önemli bir rol üstlenebileceği ve kondrogenik yönlendirmeyi başlatabileceği, perikondriumun, osteoblastlar ve kondrositlere kaynaklık eden kök hücrelere depo görevi gördüğü, dolayısıyla, Notch1'in perikondrium ve hipertrofik kıkırdağ hücrelerinde eksprese olarak bu iki hücrenin oluşumuna katkı yapabileceği belirtilmiştir.

E19. günde Notch1 ve Delta immunolokalizasyonunu özellikle epifiz kıkırdağının depo zonunda yoğun gözledik . 2002 yılında yapılan bir çalışmada (79), büyüme plağı dinlenim zonunun kök hücre benzeri hücreler içermesinden dolayı endokondral kemikleşmede son derece önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. Ayrıca bu çalışmada, dinlenim zonunda yer alan bu hücrelerin çoğalma zonu hücrelerine kaynaklık ettiği, salgıladıkları bir morfogon sayesinde çoğalma zonu hücrelerinin uzun kemik modeline paralel diziler şeklinde düzenlenmelerini sağladığı ve ayrıca çoğalma zonu hücrelerinin yeterli sayıya ulaşmaya kadar farklanmalarını önleyen bir morfogon sentezledikleri vurgulanmaktadır. Dolayısıyla, oldukça hızlı kondrogenez ve endokondral kemikleşme sürecinin gerçekleştiği embriyonal dönemin 19. gününde, epifiz kıkırdağının tüm bölgelerinde özellikle depo zonunda, Notch1 ve Delta immunolokalizasyonu, depo zonunda bulunduğu hipotez edilen kök hücre- benzeri hücrelerle ilişkili olabilir.

Notch sinyalinin, kemik iliği içerisinde hematopoietik kök hücre (HKH) gelişiminde bir rol alıp almadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, Notch sinyali, kemik iliğinde potansiyel kök hücre oluşumuna katılabilir. Domuz kemik iliğinde progenitor hücrelerin Notch1'in aktif formunu eksprese etmeleri, hematopoietik kök hücrelerin (HKM) kendilerini yenileme veya progenitor hücrelerin in vivo veya in vitroda ölümsüzlük yeteneklerini artırır (94). Üstelik, domuz veya insan hematopoietik kök hücreleri (HKM) çözülebilir Jagged1, Jagged 2 veya Delta1 ile birlikte kültürü yapıldığında hematopoietik kök hücrelerin (HKM) kendilerini yenileyebilme yeteneklerinin arttığı görülmüştür (87-91, 95-99). Bu çalışmaların sonuçlarıyla ilgili olarak, biz çalışmamızda epifiz kıkırdağı kemikleşme zonu osteoblastları ve bazı eritrositlerde Notch1 immunolokalizasyonu gözledik. Dolayısıyla bu bölgede osteositlere veya ergin eritrositlere farklanacak olan kemik iliği kökenli öncül hücrelerde Notch1'in eksprese olması doğal görünmektedir .

Notch1 ve Delta eksprese eden hücrelerin DS10. günden başlayarak eklem kıkırdağının yüzeye yakın bölgeleri hariç eklem kıkırdağının ve büyüme plağının tüm zonlarında giderek azaldığı ve erişkin eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın olan yüzeyel, geçiş ve üst derin zonlarında yoğunlaştıklarına ilişkin bulgularımız

daha önce bu konuyla ilişkili çalışmaların (60, 100, 101) bulgularıyla uyumluluk göstermektedir; daha önce eklem kırıkdağı ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda yeni doğan tavşan diz eklemine S-fazındaki kondrositlerin timidin bağlanmasıyla proliferatif tablosu belirlenmeye çalışılmıştır (102-105). Artiküler yüzeyde ve subkondral plağın hemen üstünde proliferatif hücreler belirlenmiştir. Benzer şekilde Oreja ve ark. 1995'te yapmış oldukları bir çalışmada 6 haftalık tavşanlarda yüzeyel zonun proliferatif aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (100). Eklem yüzeyindeki proliferatif kondrositlerin apozisyonel büyüme katıldığını fakat subkondral plak üzerindeki hücrelerin hangi mekanizmada rol aldıkları bilinmemektedir (60). Sekonder kemikleşme merkezinin oluştuğu dönemde artiküler kırıkdağı apozisyonel olarak büyüme devam etmekte ve bu olayı eklem yüzeyindeki kondrositlerin proliferasyonu sağlamaktadır (26, 60). Yine bu çalışmada yüzeyde bulunan projenitör hücrelerin bölünme sonrası oluşturduğu hücrelerin bir kısmı yine yüzey zonunda kalarak kök hücre niteliğini korurken diğer hücre geçiş zonuna katılarak terminal farklanmaya desteklik sağlayarak gelişimi düzenlemektedir. Bunu destekler nitelikte başka bir çalışmada, yüzeyel zondaki hücrelerin mitotik aktivite göstererek yatay düzlemde eklem kırıkdağı tabakasının lateral genişlemesini sağladığı, dikey düzlemde ise hem geçiş zonu hemde üst derin zon için hızla bölünen hücrelere kaynaklık ettiği vurgulanmaktadır. Bu şekilde doğum sonrası büyüme fazını desteklediği önerilmektedir. Kısaca doğum sonrası gelişim sürecinde, eklem kırıkdağı sadece bir tabaka olarak değil aynı zamanda bir yüzey büyüme plağı gibi rol oynamaktadır (101).

Archer ve ark. 1994'te yapmış oldukları bir çalışmada, eklem kırıkdağının apozisyonel olarak büyüdüğü PCNA, IGF1-2 ve IGF bağlayıcı protein immunoboyanmaları ile gösterilmiştir. Gelişim döneminin ilk günlerinde hipertrofik kondrositlerin yanında epifizin büyük bölümünde reaksiyon gözlenirken, daha sonraki günlerde reaksiyonlar yüzeyel zonlarda sınırlı kalmıştır (26).

Tüm bu çalışmalar ve bizim çalışmamızın bulgularına göre; erişkin epifiz kırıkdağında dahi Notch1 ve onun ligandı olan Delta aktivasyonlarının mevcut olduğu, bu belirteçleri eksprese eden hücrelerin eklem kırıkdağının eklem yüzeyine komşu bölgelerinde lokalize olduğu anlaşılmaktadır.

Bir çok defa yaptığımız literatür taramalarımıza göre; bugüne kadar hücre canlılığı, adhezyonu, büyümesi, ESM ile ilişkisi ve migrasyonu ile yakından ilişkili olduğu bilinen ve ayrıca MKH'ler tarafından büyük oranda eksprese edilen CD105 ve CD166'yı eksprese eden hücrelerin gelişmekte olan epifiz kırıkdağı dokusunda mevcudiyeti ve zonal dağılımını konu alan herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Dolayısıyla bizim bu çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularımız orjinaldir ve daha önce hiçbir çalışmada yayımlanmamıştır. Bizim çalışmamızda, CD105 ve CD166 immunolokalizasyonunu genellikle Notch1 ve Delta eksprese edilen bölgelerde gözledik, Notch1 ve Delta immunolokalizasyonunda olduğu gibi, CD105 ve CD166 eksprese eden hücrelerin DS10. günden başlayarak eklem kırıkdağının yüzeye yakın bölgeleri hariç eklem kırıkdağının ve büyüme plağının tüm zonlarında giderek azaldığını ve erişkin eklem kırıkdağının eklem yüzeyine yakın olan yüzeyel, geçiş ve üst derin zonlarında yoğunlaştıklarını saptadık.

Bu bulgularımız göstermektedir ki, epifiz kıkırdağı bünyesinde birlikte eksprese olan Notch1, Delta, CD-105 ve CD-166 gibi belirteçler epifiz kıkırdağı hücrelerinin canlılığı, hücre-ESM ilişkisi, göçleri ve sonuçta epifiz kıkırdağının sağlıklı bir şekilde büyüebilmesinde önemli bir rol üstleniyor olabilirler.

Sonuç olarak, gelişmekte olan ve erişkin sıçan epifiz kıkırdağının Notch1, Delta, CD105 ve CD166 belirteçlerini eksprese eden progenitör hücre özelliğini yansıtan hücreler içerebileceği, bu hücrelerin gelişmekte olan epifiz kıkırdağının sağlıklı büyümesini ve olgunlaşmasını, erişkin epifiz kıkırdağında ise gerektiğinde rejenerasyonu ve tamirinde görev alabilecekleri vurgulanabilir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada belirlenen E15., E19., DS10., DS20. günlerde ve erişkin dönemde elde edilen sıçan humerusu proksimal epifizlerinde Notch1, Delta, CD105 ve CD166' nın lokalizasyonları immünohistokimyasal tekniklerle belirlendi ve aşağıdaki sonuçlara varıldı:

1) Sağlıklı gelişmekte olan sıçan epifiz kıkırdağında Notch1 ve Delta'yı çok yoğun eksprese eden hücrelerin değişik gelişim yaşlarında zonal farklılıklar gösterdiği, E15. günde mezenkimal bölgeler, perikondrium ve epifiz kıkırdağı hipertrofik zonunda yoğunlaştığı, E19. günde perikondrium, periosteum, epifiz kıkırdağının eklem yüzeyine yakın bölgeleri, depo zonu, hipertrofik zon, kemikleşme zonunun eritrosit öncülleri ve osteoblastlarında yoğunlaştığını, DS10. günden itibaren eklem kıkırdağının yüzeye yakın bölgeleri hariç eklem kıkırdağının ve büyüme plağının tüm zonlarında giderek azaldığını ve erişkin eklem kıkırdağında eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın olan yüzeyel, geçiş ve üst derin zonlarında yoğunlaştığı,

2) CD105 ve CD166 immunolokalizasyonunu genellikle Notch1 ve Delta eksprese edilen bölgelerde lokalize olduğu, Notch1 ve Delta immunolokalizasyonunda olduğu gibi, CD105 ve CD166 eksprese eden hücrelerin DS10. günden itibaren eklem kıkırdağının yüzeye yakın bölgeleri hariç eklem kıkırdağının ve büyüme plağının tüm zonlarında giderek azaldığı ve erişkin eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın olan yüzeyel, geçiş ve üst derin zonlarında yoğunlaştığı,

3) Notch1, Delta, CD105 ve CD166 immunolokalizasyonuna göre; erişkin sıçan epifiz kıkırdağında da kök hücre aktivasyonlarının mevcut olabileceği, bu belirteçleri eksprese eden olası kök hücrelerin, erişkin epifiz kıkırdağında sadece eklem kıkırdağının eklem yüzeyine yakın bölgelerde lokalize olduğu sonuçlarına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Masoud I, Shapiro F, Moses A. Tibial epiphyseal development: a cross-sectional histologic and histomorphometric study in the New Zealand white rabbit. *J Orthop Res* 1986;4(2):212-20.
2. Netter FH. *The Ciba Collection Of Medical Illustrations*. Vol 8. New Jersey: CIBA-GEIGY CORPORATION, 1987.
3. LC J. *Basic Histology* 10th edition, 2003.
4. Ustunel I, Demir R. A histochemical study on the enzymatic activity in the proximal epiphysis of the humerus during the prenatal and postnatal periods in rats. *Ann Anat* 1995;177(1):73-83.
5. Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, et al. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med* 2002;195(12):1549-63.
6. Young. *Adult Stem Cells*. *Anat Rec*. 2004;276A:75-102.
7. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9(5):641-50.
8. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71-4.
9. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181(1):67-73.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
11. Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2003;82(12):951-6.
12. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 2004;13(4):436-48.
13. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284(5417):1168-70.

14. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290(5497):1779-82.
15. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290(5497):1775-9.
16. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410(6829):701-5.
17. Poulsom R, Alison MR, Cook T, et al. Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003;14 Suppl 1:S48-54.
18. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418(6893):41-9.
19. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;78(1):55-62.
20. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, et al. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9(6):841-8.
21. Huss R. Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9(6):783-93.
22. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176(1):57-66.
23. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, et al. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004;50(5):1522-32.
24. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, et al. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1997(342):254-69.
25. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 2005;11(7-8):1198-211.
26. Archer CW, Morrison H, Pitsillides AA. Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage. *J Anat* 1994;184 (Pt 3):447-56.
27. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 6):889-97.

28. Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, et al. Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol* 2005;202(3):731-42.
29. Williams PL, Bennister LH, Berry MM, et al. *Gray's Anatomy*, 38 ed: ELBS, 1995.
30. <http://www.webbooks.com/eLibrary/Medicine/Physiology/Skeletal/Skeletal.htm>.
31. Carlson BM. *Human Embryology & Developmental Biology* second ed, 1999.
32. Persaud M. *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*, 6. baskı ed: Nobel Tıp Kitabevi, 2002.
33. (<http://embryology.med.unsw.edu.au/wwwhuman/Stages/Allst.htm>).
34. Sadler. *Langman Medikal Embriyoloji*. 2005:167-91.
35. (http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap14/Chapter_14.html).
36. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*: Palme Yayıncılık, 2006.
37. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology* 10th edition, 2003.
38. Hickok NJ, Haas AR, Tuan RS. Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microsc Res Tech* 1998;43(2):174-90.
39. Hall BK, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol* 1995;39(6):881-93.
40. Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 2000;22(2):138-47.
41. Cserjesi P, Brown D, Ligon KL, et al. Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* 1995;121(4):1099-110.
42. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, et al. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 1995;9:15-20.
43. Tickle C. Vertebrate limb development and possible clues to diversity in limb form. *J Morphol* 2002;252(1):29-37.
44. Yoon BS, Lyons KM. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2004;102(14):5062-7.

45. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, et al. Bmp1a and Bmp1b have overlapping functions and essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(14):5062-7.
46. Oberlender SA, Tuan RS. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* 1994;120(1):177-87.
47. Oberlender SA, Tuan RS. Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes Commun* 1994;2(6):521-37.
48. Tufan AC, Tuan RS. Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. *Faseb J* 2001;15(8):1436-8.
49. Ross MH, Pawlina W. *Histology / A Text and Atlas / With correlated cell and molecular biology*, fifth ed: LIPPINCOTT WILLIAMS&WILKINS, 2005.
50. Eroschenko VP. *Di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle*: Palme Yayıncılık, 2001.
51. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998;47:477-86.
52. Buckwalter JA. Articular cartilage. *Instr Course Lect* 1983;32:349-70.
53. Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000;21(5):431-40.
54. Skiöldebrand. Studies of articular cartilage macromolecules in the equine middle carpal joint, in joint pathology and training. 2004.
55. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, et al. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001(391 Suppl):S26-33.
56. <http://theinternationalists.blogspot.com/2006/08/stem-cell-research.html>.
57. <http://www.csa.com/discoveryguides/stemcell/overview.php>.
58. http://www.russiablog.org/2007/06/investing_in_russia_background.php.
59. Seruya M, Shah A, Pedrotty D, et al. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant* 2004;13(2):93-101.

60. Hayes AJ, MacPherson S, Morrison H, et al. The development of articular cartilage: evidence for an appositional growth mechanism. *Anat Embryol (Berl)* 2001;203(6):469-79.
61. Nam Y, Aster JC, Blacklow SC. Notch signaling as a therapeutic target. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6(4):501-9.
62. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003;3(10):756-67.
63. Yalcin O. Expression of Notch Signaling Pathway Receptors and Ligands in Human Breast Cancer Cell Lines and Human Breast Tumors. M.Sc. in Molecular Biology and Genetics, 2004.
64. <http://scienceblogs.com/pharyngula/2006/12/notch.php>.
65. Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* 2002;81(6):313-21.
66. van Kempen LC, Nelissen JM, Degen WG, et al. Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *J Biol Chem* 2001;276(28):25783-90.
67. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, et al. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* 2001;188(1):1-7.
68. Balza E, Castellani P, Zijlstra A. Lack of specificity of endoglin expression for tumor blood vessels. *Int J Cancer* 2001;94:579-85.
69. Kumar P, Wang JM, Bernabeu C. CD105 and angiogenesis. *J Pathol* 1996;178:363-366.
70. Duff SE, Li C, Garland JM, et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003;17:984-992.
71. Duance VC. Surface of articular cartilage: immunohistological studies. *Cell Biochem Funct* 1983;1(3):143-4.
72. Schmid TM, Linsenmayer TF. Developmental acquisition of type X collagen in the embryonic chick tibiotarsus. *Dev Biol* 1985;107(2):373-81.
73. Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE. Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res* 1988;18(3):223-34.

74. Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, et al. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 1994;311(1):144-52.
75. Eerola I, Salminen H, Lammi P, et al. Type X collagen, a natural component of mouse articular cartilage: association with growth, aging, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1287-95.
76. Lorenzo P, Neame P, Sommarin Y, et al. Cloning and deduced amino acid sequence of a novel cartilage protein (CILP) identifies a proform including a nucleotide pyrophosphohydrolase. *J Biol Chem* 1998;273(36):23469-75.
77. Ward AC, Dowthwaite GP, Pitsillides AA. Hyaluronan in joint cavitation. *Biochem Soc Trans* 1999;27(2):128-35.
78. Hayes AJ, Dowthwaite GP, Webster SV, et al. The distribution of Notch receptors and their ligands during articular cartilage development. *J Anat* 2003;202(6):495-502.
79. Abad V, Meyers JL, Weise M, et al. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 2002;143(5):1851-7.
80. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999;284(5415):770-6.
81. Lowell S, Jones P, Le Roux I, et al. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol* 2000;10(9):491-500.
82. Pereira RM, Delany AM, Durant D, et al. Cortisol regulates the expression of Notch in osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002;85(2):252-8.
83. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(9):678-89.
84. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, et al. Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genesis* 2003;37(3):139-43.
85. Hrabe de Angelis M, McIntyre J, 2nd, Gossler A. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 1997;386(6626):717-21.
86. Xue Y, Gao X, Lindsell CE, et al. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 1999;8(5):723-30.

87. Karanu FN, Murdoch B, Miyabayashi T, et al. Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* 2001;97(7):1960-7.
88. Kumano K, Chiba S, Kunisato A, et al. Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* 2003;18(5):699-711.
89. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425(6960):841-6.
90. Varnum-Finney B, Brashem-Stein C, Bernstein ID. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood* 2003;101(5):1784-9.
91. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, et al. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004;5(3):247-53.
92. Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol* 2004;14(5):320-8.
93. Watanabe N, Tezuka Y, Matsuno K, et al. Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch. *J Bone Miner Metab* 2003;21(6):344-52.
94. Stier S, Cheng T, Dombkowski D, et al. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 2002;99(7):2369-78.
95. Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, et al. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* 1998;91(11):4084-91.
96. Carlesso N, Aster JC, Sklar J, et al. Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics. *Blood* 1999;93(3):838-48.
97. Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, et al. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000;192(9):1365-72.
98. Karanu FN, Yuefei L, Gallacher L, et al. Differential response of primitive human CD34- and CD34+ hematopoietic cells to the Notch ligand Jagged-1. *Leukemia* 2003;17(7):1366-74.
99. Ohishi K, Varnum-Finney B, Bernstein ID. Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. *J Clin Invest* 2002;110(8):1165-74.

- 100.** Oreja MTC, Rodriguez MQ, Abelleria AC, et al. Variation in articular cartilage in rabbits between weeks 6 and 8. *Anat Rec* 1995;241:34-38.
- 101.** Hunziker EB, Kapfinger E, Geiss J. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neof ormation during postnatal development. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(4):403-13.
- 102.** Mankin HJ. Localisation of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. I. Growth in immature cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1962a;44:682-688.
- 103.** Mankin HJ. Localisation of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. II. Repair in immature cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1962b;44:688-698.
- 104.** Mankin HJ. Localisation of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. II. Mature articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1963;45:529-540.
- 105.** Mankin HJ. Mitosis in articular cartilage of immature rabbits; histologic, stathmokinetic (colchicine) and autoradio-graphic study. *Clin Orthop* 1964;34:17-183.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Denizli' de doğdu. 1992 yılında Namık Kemal İlkokulu' ndan, 1996 yılında Akdeniz koleji orta kısmından ve 1999 yılında Antalya Lisesi' nden mezun oldu. 2004 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirerek lisans eğitimini tamamladı. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne bağlı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programına başladı. 11-10-2005 tarihinde aynı Enstitüye Araştırma Görevlisi olarak atandı, halen Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.