

**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ ERİŞKİN İNSAN  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN TGF- $\beta$ 1 İLE UYARILMIŞ  
KONDROJENİK DEĞİŞİMİ SÜRECİNDE, C-TİPİ NATRİÜRETİK  
PEPTİD SİNYAL YOLUNUN OLASI ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**BERNA TEZCAN**

**Danışman : Prof. Dr. ERİNÇ ARAL  
İkinci Danışman : Prof. Dr. A. ÇEVİK TUFAN**

**EYLÜL-2011**



T.C.  
ESKİŞEHİR OŐMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ  
HİSTOLOĞİ-EMBRİYOLOĞİ ANABİLİM DALI

TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ ERİŞKİN İNSAN  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN TGF- $\beta$ 1 İLE UYARILMIŞ  
KONDROJENİK DEĞİŞİMİ SÜRECİNDE, C-TİPİ NATRİÜRETİK  
PEPTİD SİNYAL YOLUNUN OLASI ROLÜNÜN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

BERNA TEZCAN

Danışman : Prof. Dr. ERİNÇ ARAL  
İkinci Danışman : Prof. Dr. A. ÇEVİK TUFAN

PROJE NO : 108S189

## KABUL VE ONAY SAYFASI

BERNA TEZCAN'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ ERİŞKİN İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN TGF- $\beta$ 1 İLE UYARILMIŞ KONDROJENİK DEĞİŞİMİ SÜRECİNDE, C-TİPİ NATRIÜRETİK PEPTİD SİNYAL YOLUNUN OLASI ROLÜNÜN İNCELENMESİ" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih: 23/09/2011

Üye: Prof. Dr. CENGİZ BAYÇU

Üye: Prof. Dr. ERİNÇ ARAL

Üye: Prof. Dr. A. ÇEVİK TUFAN

Üye: Prof. Dr. FATMA SULTAN KILIÇ

Üye: Yrd. Doç. Dr. DİLEK BURUKOĞLU

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06/10/2011.... tarih ve 889/4126... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. KAZIM ÖZDAMAR  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ ERİŞKİN İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN TGF- $\beta$ 1 İLE UYARILMIŞ KONDROJENİK DEĞİŞİMİ SÜRECİNDE, C-TİPİ NATRIÜRETİK PEPTİD SİNYAL YOLUNUN OLASI ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Araştırmamızın amacı, trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerinin (MKH), transforme edici büyüme faktörü (TGF)- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid (CNP) sinyal yolunun olası rolünün incelenmesidir.

Araştırmamızda MKH'lerin sitoplazmik sekresyon granüllerinde CNP, hücre membranında ise NPR-B'yi ifade ettikleri ve bu ifadelerin, TGF- $\beta$ 1 uyarısı altında arttığı gösterildi. TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) ile uyarılmış kondrojenik değişim sürecinde elde edilen kondrojenik dokularda,  $10^{-8}$ M ve  $10^{-7}$ M CNP'nin Alsiyan mavisi boyanma koyuluğunu konsantrasyona bağımlı olarak arttırdığı,  $10^{-6}$ M CNP konsantrasyonunda ise bu etkinin ortadan kalktığı tespit edildi. TGF- $\beta$ 1'e ilave olarak  $10^{-7}$ M CNP uyarısı altında 20. günde elde edilen kondrojenik dokularda genom düzeyindeki değişiklikler incelendiğinde sadece TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kontrol grubuna kıyasla G protein (guanine nucleotide binding protein) gamma 12, LIM domain kinaz 2, engulfment and cell motility 1, matrilin 3 ve CD24 moleküllerinde mRNA düzeyinde 4 kat veya daha fazla değişim olduğu gösterildi.

Araştırmamızın sonucunda, insan MKH'lerinin TGF- $\beta$ 1 uyarısı altında kondrojenik değişimleri sürecinde, CNP/NPR-B sinyal yolunun uyarıldığı gösterilmiştir. Bu uyarının özellikle erken kondrojenik değişim sürecinde glikozaminoglikan sentezi, geç dönemde ise kondrojenik matürasyon ve hipertrofi üzerine etkileri olduğu düşünülmüştür. Ayrıca bulgularımızda bu etkilerin konsantrasyona bağımlı olduğu ve  $10^{-7}$ M CNP'nin en etkin konsantrasyon olduğu gözlenmiştir. İnsan tüm genom array incelemesi sonuçlarımızın ise bundan

**sonraki projelere ışık tutabilecek özellikte olduğunu ve bu sinyal yolu ile ilişkisi olduğu düşünülen moleküllerin belirlenmesi aşamasına çok önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.**

**Anahtar Kelimeler: CNP, NPR-B, mezenkimal kök hücre, TGF- $\beta$ 1, kondrojeniz.**

## SUMMARY

### TO INVESTIGATE THE ROLE OF C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE SIGNALING DURING TGF- $\beta$ 1 INDUCED CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF TRABECULAR BONE-DERIVED ADULT HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

The aim of this study was to investigate the role of C-type natriuretic peptide (CNP) signaling during transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 induced chondrogenic differentiation of trabecular bone-derived human mesenchymal stem cells (MSCs).

Immunohistochemistry showed that CNP is expressed in MSCs localized in granular formations within the cytoplasm, whereas NPR-B is expressed at the cell membrane. RT-PCR analyses of both CNP and NPR-B during this process revealed an increase in response to TGF- $\beta$ 1. Cultures induced with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) and treated with different concentration of CNP showed that CNP supplementation at  $10^{-8}$ M and  $10^{-7}$ M concentrations increased Alcian blue staining intensity in a concentration dependent manner, whereas at  $10^{-6}$ M concentration this effect was diminished. Whole human genome microarray of chondrogenic tissues at day 20 of incubation obtained under the induction of TGF- $\beta$ 1 supplemented with  $10^{-7}$ M CNP showed that, G protein (guanine nucleotide binding protein) gamma 12, LIM domain kinase 2, engulfment and cell motility 1, matrilin 3, and CD24 molecules showed 4 folds or higher difference at the mRNA level compared to their controls induced only with TGF- $\beta$ 1.

In conclusion, CNP/NPR-B signaling pathway is likely to be stimulated during TGF- $\beta$ 1 induced chondrogenic differentiation of MSCs. It is likely that this induction plays a role in glycosaminoglycan synthesis and chondrogenic

**maturation and hypertrophy. Effects were concentration depended and  $10^{-7}$ M CNP was the most effective concentration. Whole human genom array revealed molecules probably be investigated in the future in terms of their involvement to CNP/NPR-B signaling and their role in chondrogenesis.**

**Key words: CNP, NPR-B, mesenchymal stem cells, TGF- $\beta$ 1, chondrogenesis.**



## İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iv
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLO DİZİNİ.....	xi
ŞEKİL DİZİNİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Kök Hücre Kavramı ve Özellikleri.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Kök Hücre Çeşitleri ve Kaynakları.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.1. Embriyonik kök hücreler.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2. Hematopoetik kök hücreler.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.3. Mezenkimal kök hücreler.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.3.1. Mezenkimal kök hücre kaynakları.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.3.2. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro çoğaltılmaları.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.3.3. Mezenkimal kök hücrelerin immünojenotipik özellikleri.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.3.4. Mezenkimal kök hücrelerin değişim potansiyeli.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3. Kemikleşme (Ossifikasyon).....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.1. İntramembranöz (zarlar arası) kemikleşme.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2. Endokondral kemikleşme.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2.1. Endokondral kemik gelişiminin aşamaları.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2.2. Endokondral kemik gelişimini etkileyen başlıca faktörler.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde Kondrojenik Değişim ve Kondrogeniz Fazlarının Başlıca Belirleyicileri.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5. Kondrogeniz ve Natriüretik Peptid Sinyal Yolları.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5.1. Natriüretik peptid ailesi.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5.2. Natriüretik peptid reseptörleri.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.2.1. Natriüretik peptid reseptör A.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5.2.2. Natriüretik peptid reseptör C (Natriüretik peptid clearance reseptör).....</b>	<b>26</b>
<b>2.5.2.3. Natriüretik peptid reseptör B.....</b>	<b>27</b>
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1. Floresan-immünohistokimyasal yöntem.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2. Flow sitometri.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3. Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin değişim potansiyelinin gösterilmesi.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.3.1. Adipojenik değişim.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.3.2. Osteojenik değişim.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.3.3. Kondrojenik değişim.....</b>	<b>37</b>

3.3. Tek Tabaka Kültürlerde CNP ve NPR-B Varlığının Gösterilmesi.....	38
3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerden Çökelti Kültürlerin Oluşturulması.....	38
3.5. Kondrojenik Değişimin Alsiyan Mavisini Boyaması ile Analizi.....	40
3.6. RNA İzolasyonu ve RT-PCR (Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi.....	41
3.6.1. RNA izolasyonu.....	41
3.6.2. RT-PCR.....	42
3.7. Tüm İnsan Genom Array Analizi.....	44
3.8. İstatistiksel Analizler.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi.....	46
4.2. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünohistokimya ile Karakterizasyonu.....	46
4.3. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometri ile Karakterizasyonu.....	48
4.4. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Değişim Potansiyelinin Analizi.....	49
4.5. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinde CNP ve NPR-B İfadelerinin RT-PCR ile Analizi.....	51
4.6. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinde CNP ve NPR-B İfadelerinin İmmünohistokimyasal Analizi.....	52
4.7. CNP ve NPR-B İfadelerinin Mezenkimal Kök Hücrelerin TGF-β1 ile Uyarılmış Kondrojenik Değişimi Sürecindeki Analizi.....	53
4.8. Mezenkimal Kök Hücrelerin TGF-β1 ile Uyarılmış Kondrojenik Değişimi Sürecinde CNP'nin Konsantrasyona Bağımlı Etkisinin Analizi.....	54
4.9. Tüm İnsan Genom Array Analizi.....	57
4.9.1. Mikrodizin kalite kontrol analizi.....	57
4.9.2. Pozitif ve negatif sınır öğelerine ilişkin araştırmalar.....	57
4.9.3. Mikrodizin gen ifadesi kat değişimi analiz sonuçları.....	60
4.9.4. Kümeleme analizi sonuçları.....	62
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71
EKLER DİZİNİ.....	81
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLO DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin elde edildiği hastaların özellikleri.....	29
<b>Tablo 2.</b> Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan primer ve sekonder antikorlar.....	32
<b>Tablo 3.</b> Gen ifadelerinin analizinde kullanılan RT-PCR primerleri.....	44
<b>Tablo 4.</b> Her bir örnek için 2,4 ve 8 kat değişim gösteren gen sayıları.....	61
<b>Tablo 5.</b> 20. gündeki TGF-grubu ile TC-grubu arasındaki karşılaştırmaya ait 4 kat ve üzeri ifade değişimi gösteren genler.....	61

## ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. In vitro kültürde trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücreler.....	8
Şekil 2. Uzun kemiklerde endokondral kemikleşme.....	17
Şekil 3 Mezenkimal kök hücrelerde invitro kondrogenez.....	19
Şekil 4. Natriüretik peptidler ve amino asit dizilimleri.....	24
Şekil 5. Natriüretik peptid reseptörleri.....	25
Şekil 6. Natriüretik peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri.....	26
Şekil 7. Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi ve çoğaltılması.....	47
Şekil 8. Elde edilen trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücreler ve insan tonsil dokusu için yapılan floresan-immünohistokimyasal analiz.....	48
Şekil 9. İzole edilen hücrelerin flow sitometri analizi sonuçları.....	49
Şekil 10. MKH'lerin değişim potansiyelinin gösterilmesi.....	51
Şekil 11. İnsan trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücrelerinde CNP ve NPR-B ifadelerinin RT-PCR analizi.....	52
Şekil 12. MKH'lerde CNP ve NPR-B'nin immünohistokimyasal analizi.....	53
Şekil 13. RT-PCR sonuçlarına ilişkin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	54
Şekil 14. MKH'lerin TGF-β1 ile uyarılmış kondrojenik değişimleri sürecinde CNP'nin konsantrasyona bağımlı etkisinin analizi.....	56
Şekil 15. Normalizasyon öncesi ışıma değerlerine ait histogram.....	58
Şekil 16. Normalizasyon sonrası ışıma değerlerine ait histogram.....	58
Şekil 17. Normalizasyon öncesi ışıma değerlerine ait kutu grafiği.....	59
Şekil 18. Normalizasyon sonrası ışıma değerlerine ait kutu grafiği.....	59
Şekil 19. Pozitif ve negatif sınır öğelerine ait kutu grafikleri.....	60
Şekil 20. Gen ifade verisine göre mikrodizin örneklerinin kümelenmesini gösteren ağaç.....	63
Şekil 21. Yüksek ışıma veren genlerin kümelenmesini gösteren ağaç.....	64

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µg</b>	:	Mikrogram
<b>µl</b>	:	Mikrolitre
<b>µM</b>	:	Mikromolar
<b>AGM</b>	:	Aort-Gonad-Mezonefroz
<b>ALCAM</b>	:	Aktive Lökosit-Hücre Adezyon Molekülü
<b>ALP</b>	:	Alkalen Fosfataz
<b>AMDM</b>	:	Maroteaux Tipi Akromezomelik Displazi
<b>ANP</b>	:	Atriyal Natriüretik Peptid
<b>AS</b>	:	Adipojenik Uyarıcı
<b>BMP</b>	:	Kemik Morfogenetik Proteini
<b>BNP</b>	:	Beyin (B-tipi) Natriüretik Peptid
<b>cDNA</b>	:	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
<b>cGMP</b>	:	Siklik Guanozin Monofosfat
<b>cm</b>	:	Santimetre
<b>CNP</b>	:	Kardiak (C-tipi) Natriüretik Peptid
<b>CO<sub>2</sub></b>	:	Karbondioksit
<b>COMP</b>	:	Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteini
<b>Col</b>	:	Kollajen
<b>CS</b>	:	Kondrojenik Uyarıcı
<b>DAPI</b>	:	4'-6 Diamidino-2-Fenilindol
<b>DEX</b>	:	Deksametazon
<b>DMEM</b>	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	:	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	:	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>dNTP</b>	:	Deoksiribonükleotid Trifosfat
<b>ECM</b>	:	Ekstraselüler Matriks
<b>EDTA</b>	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>FBS</b>	:	Fetal Sığır Serumumu
<b>FGF</b>	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>FGFR</b>	:	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>FITC</b>	:	Foresan İzotiosiyanat
<b>GAG</b>	:	Glikozaminoglikan
<b>GAPDH</b>	:	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
<b>gr</b>	:	Gram
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:	Hidrojen peroksit
<b>HCl</b>	:	Hidroklorür
<b>HLA</b>	:	İnsan lökosit antijeni
<b>HRP</b>	:	Horseradish Peroksidaz
<b>Ig</b>	:	İmmünoglobulin
<b>Ihh</b>	:	Indian Hedgehog
<b>IHK</b>	:	İmmünohistokimya
<b>ISCT</b>	:	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
<b>ITS</b>	:	İnsülin-Transferin-Selenyum
<b>LPL</b>	:	Lipoprotein Lipaz

<b>M</b>	:	Molar
<b>MAPK</b>	:	Mitojen Aktive Protein Kinaz
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	:	Magnezyum klorür
<b>MKH</b>	:	Mezenkimal Kök Hücre
<b>ml</b>	:	Mililitre
<b>mRNA</b>	:	Haberçi RNA
<b>ng</b>	:	Nanogram
<b>N-CAM</b>	:	N-Hücre Adezyon Molekülü
<b>Nppc</b>	:	Natriüretik Peptid Proteinini Kodlayan Gen
<b>NPR</b>	:	Natriüretik Peptid Reseptör
<b>OC</b>	:	Osteokalsin
<b>OS</b>	:	Osteojenik Uyarıcı
<b>PBS</b>	:	Fosfat Buffer Saline
<b>PTHrP</b>	:	Paratiroid Hormon İlgili Peptid
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik Asit
<b>RT-PCR</b>	:	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>T3</b>	:	Triiyodotironin
<b>TAE Buffer</b>	:	Tris-Asetat-EDTA Tamponu
<b>TGF-β</b>	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü-β
<b>TNF</b>	:	Tümör Nekrozis Faktör
<b>TSC</b>	:	TGF-β Uyarılmış Klon

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aksiyal ve appendiküler iskeletin epifiz büyüme plaklarında boyuna uzamayı sağlayan endokondral kemikleşme gözlenir. Bu olgu sürecinde kondrositler prolifer olurlar, değişime uğrarlar, boyutlarında artış ile karakterize olarak hipertrofiye uğrarlar, matriks sentezi gerçekleştirirler, kalsifiye olurlar ve son aşamada da kalsifiye kıkırdak matriksinin osteoblastlar ile yer değiştirmelerini ve kemikleşmeyi sağlayan apoptotik bir süreç geçirirler (67). Endokondral büyüme endokrin, parakrin ve otokrin etkili birçok faktör tarafından kontrol edilir (17, 84).

Dwarfizm veya cücelik olarak bilinen patolojik durumun temel nedeni endokondral kemik gelişimi sürecinde rol alan bir veya birden fazla faktörün genetik mutasyonlar sonucunda, kemik boyu uzaması mekanizmalarından bir veya birden fazlasını çalışamaz hale getirmesidir. Bu duruma en iyi örnek akondroplazi adı verilen ve fibroblast büyüme faktörü reseptör-3 (FGFR-3) molekülü cDNA dizisinde 1138 numaralı pozisyonda bulunan Guanin'in, Adenin veya Sitozin ile yer değiştirmesi sonucunda FGFR-3 proteini 380 numaralı glisin amino asitinin arginin'e dönüştüğü mutasyondur. Bir diğer önemli cücelik grubu ise akromezomelik displazi ve bir alt grubu olan Maroteaux tipi akromezomelik displazi (AMDM, OMIM 602875)'dir (43).

AMDM, otozomal çekinik geçiş gösteren bir dwarfizm türüdür. Doğum boy ve ağırlıkları normal sınırlarda olan kişiler genellikle doğumu takip eden 1. yıl sonunda yaşitlarına göre kısa kalma eğilimi gösterir. Bu durum 2. yıl sonunda ise tipik radyolojik bulguları ile kesin tanı koyulabilecek hale gelir. Uzun kemiklerde ve vertebralarda şekil bozuklukları, özellikle ekstremite orta ve distal uzun ve tübüler kemiklerinde kısalık ve epifiz büyüme plaklarında normal dışı gelişme ile karakterize bir patolojik durumdur (7, 24, 31, 34). AMDM tanısı konmuş kişilerde bugüne kadar tutulum görülmüş olan tek sistem iskelet sistemidir.

AMDM'ye yol açan patoloji, natriüretik peptid reseptör-B (NPR-B) proteininin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlardır (7). NPR-B ile ilgili bu bilgiler, AMDM'li

hastaların kendilerinden ve sağlıklı aile bireylerinden elde edilen DNA örneklerinin bağlantı analizi ve bu analiz sonrası elde edilen bilgiler doğrultusunda insan 9. kromozomu üzerindeki ilgili lokus bölgesinde (9p13-q12) yer alan aday genlerin sekanslarının taranması sonucunda elde edilmiştir (7, 31, 34).

NPR-B bir transmembran reseptör proteini olup, beyin, adrenal bez, uterus gibi birbirinden farklı pek çok dokuda bulunur (62). Ancak mevcut literatür bilgileri bu proteinin ana görevinin iskelet sistemi gelişimi ile ilgili olduğunu düşündürmektedir (4, 7). AMDM'li hastalarda da iskelet sistemi bulgularına eşlik eden nörolojik defektler ve bozukluklar veya anormal kan basıncı düzeyleri gibi problemlerin görülmemiş olması bu düşüncüyü desteklemektedir. NPR-B'nin iskelet sistemi gelişimi üzerine olan etkileri son birkaç yılda gündeme gelmiş olup, bu reseptörün ligandı olan kardiak natriüretik peptit'i (CNP) veya bu reseptörün ikincil habercilerinden birisi olarak işlev gördüğü düşünülen cGMP bağımlı protein kinaz II (cGKII) sinyal yolunu hedef alan çalışmalar bize bu konuda ışık tutmaktadır.

Trabeküler kemik, uygun mikro çevre koşulları oluştuğunda osteoblast, kondrosit, adiposit veya miyosit gibi çeşitli mezenkimal hücre dizinlerine dönüşebilen heterojen bir öncül hücre popülasyonu içerir. Bu multipotent mezenkimal kök hücrelerin (MKH) in vitro kondrojenik değişimleri, hücre çökelti veya mikro kütle kültürlerinde veya üç boyutlu koruyucu biyomateryaller üzerinde ve genellikle transforme edici büyüme faktörlerinden (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) veya kemik morfojenetik proteinlerinden (BMP) birisinin uyarıcı etkisi altında gerçekleştirilebilir. Klonal fare embriyonik hücre dizini ATDC5'in insülin uyarısı altında kondrojenik değişimi ile gerçekleştirilmiş olan sınırlı sayıdaki araştırma, C tipi natriüretik peptid (CNP) sinyal yolunun TGF- $\beta$ 1 uyarısına cevap olarak aktive olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, yukarıda belirtilen Maroteaux tipi Akromezomelik Displazi olarak bilinen otozomal ressesif geçişli bir osteokondrodisplazi türü, CNP'nin hücre yüzeyindeki reseptörü olarak işlev gören natriüretik peptid reseptör-B'nin (NPR-B) fonksiyon kaybına yol açan mutasyonları sonucu ortaya çıkmaktadır.



Tüm bu bilgiler ışığında NPR-B'nin endokondral büyüme üzerine olan etkilerinin ve hücre dışı sinyallerin, bu büyümenin hangi evresinde ve hangi mekanizmalar ile hücre içine taşınarak ne gibi değişikliklere yol açtığıının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle araştırmamızın amacı, trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerinin TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid sinyal yolunun olası rolünü incelemektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kök Hücre Kavramı ve Özellikleri**

Vücuttaki hücrelerin bölünme ve büyüme kapasiteleri birbirinden çok farklıdır. Bazı hücreler (örneğin sinir hücreleri ve eritrositler) olgun farklanmış durumdadır ve genellikle bölünmezler. Bu tip hücreler postmitotik hücreler olarak adlandırılır. Kök hücreler (örneğin morula veya blastokist hücreleri) ise yaşamları boyunca sürekli bölünür. Tanımlanan bu hücreler dışında kalan bazı hücreler (örneğin karaciğer hücreleri) uzun süre sessiz kalır fakat uygun sinyallerle bölünmek için uyarılabilirler (36).

Kök hücreler embriyonik dönemden, fetal ve doğum sonrası döneme kadar doku ve organların gelişimleri ve yaşamlarının sürdürülmesinde çok önemli rol oynar. Kök hücrelerin genel özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

1. Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptirler. Vücuttaki diğer dokulardan farklı olarak kök hücreler çok sayıda bölünebilir ve çoğalabilirler.
2. Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Kök hücrelerden bölünme sonrası meydana gelen yavru hücreler de ebeveynleri gibi özelleşmemiştir.
3. Kök hücrelerden elde edilen bir yavru hücre, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir. Özelleşmemiş hücrelerin, özelleşmiş hücrelere kaynaklık etmesi olayına farklılaşma denir.
4. Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilmelidirler.

5. Kök hücreler in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmış kuşaklara katkı sağlamalıdır (73).

Ovumun döllenmesini takiben zigot meydana gelir. Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olan bu ilk embriyonel hücreye bu yeteneğinden dolayı totipotent hücre denmektedir. Totipotent hücreler, sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliği gösterir. Erken embriyonik dönemde yarıklanma sürecindeki 4 hücreden 8 hücreye kadarki tüm blastomerler totipotenttir. Bu hücreler, embriyonun erken döneminde elde edilirler, ayrıca tam bir embriyo ve embriyo dışı yapıları oluşturabilme yeteneğindedirler (73).

Bu aşamadan sonra artık blastokist olarak adlandırılan yapı, erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde trofoblast, blastosöl ve embriyoblastlardan oluşmaktadır. Blastokistin içindeki embriyoblastlar, vücudun endoderm, ektoderm ve mezoderm denilen üç embriyonik tabakasından köken alan pek çok farklı hücre çeşidine (yaklaşık 270 çeşit hücre) kaynaklık edebilir. Bu özelliğe sahip kök hücrelere pluripotent hücreler denir. İnsan embriyonik kök hücreleri blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilirler ve pluripotenttirler (73).

Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fötal dönemde), hücreler biraz daha özel görevlere sahip olur ve erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Bu erişkin kök hücreleri, tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Bir basamak daha özelleşmiş olan bu kök hücrelere multipotent hücreler denmektedir (73).

## **2.2. Kök Hücre Çeşitleri ve Kaynakları**

Kök hücreler iki farklı kaynaktan elde edilirler. Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastokistte embriyoblastlardan elde edilen kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler. Embriyonik olmayan kök hücreler, erişkin kök

hücreleri (dokuya özgün kök hücre, postnatal kök hücre), fötüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler, partenot hücreleri (partenogenez), göbek kordonu ve plasenta kök hücreleridir.

### ***2.2.1. Embriyonik kök hücreler***

Embriyonik kök hücreler döllenmeyi takip ederek oluşan blastokistin iç hücre kitlesinden (embriyoblastlardan) elde edilmektedir. Embriyonik kök hücreler, vücudumuzda bulunan tüm hücre tiplerine dönüşebilme karakterinde olan hücrelerdir. Ancak bu hücreleri laboratuvarında özel bir hücre tipine farklılaştırmak kolay değildir. Dahası embriyonik kök hücrelerin transplantasyon sonrası kanser hücrelerine dönüşme riski vardır. Şu an için embriyonik kök hücreler tıbbi tedavi uygulamalarında kullanılmamaktadır. Embriyonik kök hücreler hastalıkları tanımlamada bize yardımcı olurken, bu hücrelerin klinik uygulamaları gelecek için umut vericidir (28).

Embriyonik kök hücreler gelişmekte olan organizmada bulunmazlar. Dolayısı ile fötal hayattan başlayarak, başta kemik iliği olmak üzere vücudumuzun çeşitli organ ve dokularında bulunan kendini çoğaltabilen, farklılaşabilen ve kararlı hale gelebilen kök hücrelere erişkin kök hücreler adı verilir (Tablo 1). Erişkin kök hücreler doku ya da organa özel olan kök hücre tipidir. Erişkin kök hücreleri içerdiği bilinen erişkin organ ve dokulara örnek olarak deri, kas, kemik iliği ve sindirim sistemi verilebilir. Bazı erişkin kök hücreler, kordon kanı ve kemik iliği transplantasyonları gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır (28).

### ***2.2.2. Hematopoetik kök hücreler***

Hematopoez, organizmada embriyonik ve erişkin kan hücresi oluşumunu ifade etmektedir. Oluşan kan hücreleri bu süreçte kendini yenileme ve farklılaşma işlevlerini yerine getirirler. Hematopoez organizmada ilk olarak embriyoda vitellüs kesesinde

başlar ve daha sonra aort-gonad-mezonefroz (AGM) bölgesi, plasenta, fetal karaciğer, timus, dalak ve kemik iliği olmak üzere birçok yerde devam eder (73).

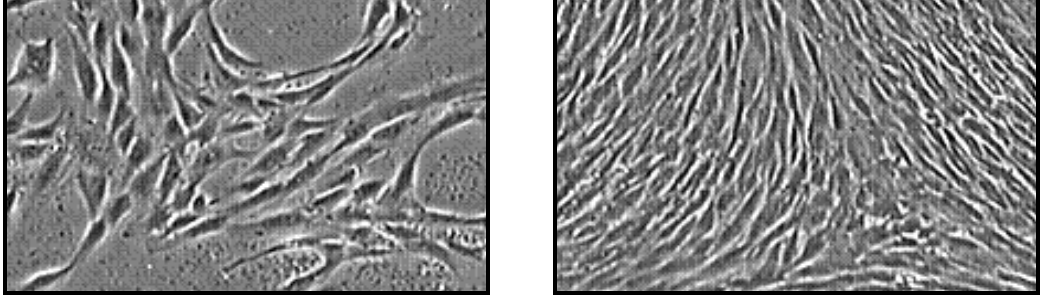
İnsan hematopoetik kök hücreleri blastokist kaynaklıdır (73). Kendilerini yenileyebilir ve bütün matür kan hücrelerine dönüşebilirler. Başlıca yüzey belirteçleri CD34, CD14, CD45 ve CD133 olan hematopoetik kök hücreler, kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve fetal karaciğerden elde edilir (30). Düzenlenmeleri intrinsek ve ekstrinsek sinyaller ile olmaktadır. Wnt, Notch, kemik morfogenetik proteini (BMP), sonic hedgehog ve fibroblast büyüme faktörünün hematopoetik kök hücre farklılaşmasını kontrol ettiği bilinmektedir (40, 59).

Kemik iliği hücreleri kültüre edildikleri zaman, plastik kültür kabına yapışan (adherent) hücrelerin kemik iliği stromal hücreleri olduğu, yapışmayan (non-adherent) hücrelerin ise hematopoetik hücreler olduğu 1966'lı yıllardan beri bilinmektedir. Kemik iliği kökenli stromal hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler, önce hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girerken, daha sonra aralarında kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, yağ doku, böbrek, akciğer ve bağırsakların da olduğu çeşitli hematopoetik olmayan dokuların parankimal hücrelerine farklılaştırılmıştır (73).

### ***2.2.3. Mezenkimal kök hücreler***

Bir erişkin kök hücre tipi olan mezenkimal kök hücreler, Fridenstein tarafından ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin gelişmesi sonucu tanımlanmıştır (19). Bunu takip eden dönemde bu hücrelerin kıkırdak, kemik, yağ, kas, tendon ve kemik iliği stromal hücrelerini destekleyen hematopoetik hücrelere dönüşebilme yetenekleri de ortaya konmuştur (62). Mezenkimal kök hücrelerin her üç germ yaprağından köken alan, kemik iliği stroması içinde yer alan, hücre ve/veya dokuları oluşturan uzantılı fibroblast benzeri multipotent hücreler oldukları kabul edilir (73). Faz kontrast mikroskobu altında, hücre kültürü

ortamında incelendiklerinde, düşük yoğunlukta koloni oluştururken, yüksek yoğunlukta yan yana dizilmiş hücre grupları halinde bulunurlar (Şekil 1).



**Şekil 1.** In vitro kültürde trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücreler  
(Pamukkale Üniversitesi Histoloji Embriyoloji A.D., 2010)

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), pre-klinik çalışmalar için insan mezenkimal kök hücrelerini tanımlamada belli ölçütler getirmiştir. ISCT kriterlerine göre;

- Kök hücre olarak isimlendirilmek yerine “mezenkimal stromal hücre” veya “multipotent mezenkimal stromal hücre / MSC” olarak isimlendirilmeleri önerilmiştir (29).
- Mezenkimal kök hücre tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; plastik yüzeye yapışma, stromal karakterde yüzey antijenlerinin ifadesi ve multipotent farklılaşma potansiyelidir (73).

### 2.2.3.1. Mezenkimal kök hücre kaynakları

Mezenkimal kök hücreler için ana kaynak kemik iliğidir. Kemik iliğinde mezenkimal kök hücreler dışında mezoderm kökenli hematopoetik ve endotel kök hücreleri de bulunur (73). Kemik iliği dışında mezenkimal kök hücre kaynağı olarak; trabeküler kemik, kas, yağ, periosteum, sinoviyal membranlar, eklem kıkırdakları, deri, perisitler, periferik kan, diş ve periodontal ligament kullanılmaktadır (5, 22, 67).

İzole edilen hücreler fibroblastoid morfolojide olup, kültür kaplarına yapışabilen, çok yönlü farklılaşabilen ve spesifik yüzey belirleyicilerini taşıyan hücrelerdir. Köken alınan doku tipine göre, bu hücreler farklılaşma özellikleri ve fonksiyonları bakımından çeşitlilik gösterebilir. Bu yüzden doku onarımlarında o bölgeye spesifik doku kullanımı daha avantajlıdır (73). Mezenkimal kök hücrelerle yapılan çalışmalarda en güncel konulardan biri hücrelerin dokularda yerleşimi ve niş bölgelerinin incelenmesidir. Periferik kanda, osteojenik farklılaşma yeteneği olan hematopoetik olmayan ve mezenkimal kök hücre karakterinde hücreler vardır. Ağır hasar olan durumlarda periferik kandan mezenkimal kök hücre izole edilmektedir. Mezenkimal kök hücreler dokularda perisitler gibi perivasküler bölgede bulunur ve komşu hücrelerin olgunlaşma, farklılaşma ya da sessiz kalma gibi hücre fonksiyonlarını kontrol eder (73).

### 2.2.3.2. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro çoğaltılmaları

Mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulamalarda ve bilimsel araştırmalarda kullanılabilmesi için in vitro çoğaltılmaları gereklidir. Bu hücreler in vitro çoğaltıldıkları zaman kültürde farklılaşma potansiyellerini ve fonksiyonlarını korur (73). In vitro kültür ortamında plastik flask tabanına yapışan mezenkimal kök hücreler, % 10-15 FCS/FBS varlığında fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilirler. Mezenkimal kök hücre izolasyonu için kemik iliğinden dansite gradient yöntemi kullanılırken diğer dokulardan ise enzimatik ayrıştırma yöntemi kullanılır. En sık kullanılan enzimler tip 1 kollajenaz (3 µg/ml) ve dispaz (4 µg/ml) karışımıdır (73).

Süspansiyon haline getirilen hücreler kültür vasatı içinde, kültür kaplarına (T25, T75 'lik flakslar vb.) konularak %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik ve %95 nemli inkübatörde inkübasyona bırakılır. Hücrelerin çoğalma yeteneği, kullanılan FBS'in kalitesi ile doğrudan ilişkilidir. Ekim yapılan heterojen hücre topluluğu arasında az sayıda bulunan mezenkimal kök hücrelerin çoğaltılması için %10'luk FBS içeren bir kültür ortamı hazırlanmalıdır (73). Standart hücre kültürlerinde, kültüre edilen az sayıdaki mezenkimal kök hücre topluluğu, plastik kabın tabanına adezyon molekülleriyle tutunur. 24-48 saat sonra yapışmayan hücreler uzaklaştırılır, plastik kabın tabanına tutunan hücreler %0,2 tripsin-EDTA içeren solüsyonla kaldırılarak pasajlanır. İstenilen pasaj elde edildiğinde hücreler %20 FBS ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren dondurma fiksatifinde önce -80°C'de 24 saat bekletilip daha sonra sıvı nitrojen içerisinde saklanabilir. Buna alternatif olarak kontrollü dondurma cihazları da kullanılabilir (73).

Hücrelerin çoğalma hızı; verici yaşı, hayvan türü, kültür vasatı özellikleri, ekilen hücre yoğunluğu gibi faktörlere bağlı değişim gösterir. Hücreler belli bir pasaja kadar çoğalmalarını devam ettirirken, pasajlar ilerledikçe (örneğin P10 ve üzeri) çoğalma hızlarında azalma görülebilir. Pasaj sayılarının artmasıyla birlikte hücrelerde stres belirtileri ortaya çıkar ve bu durumun hücrelerin özelliklerini olumsuz etkileyebileceği bilinir. Mezenkimal kök hücrelerin ilerleyen pasajlarında, sitogenetik telomer kısalması gibi bozukluklar gelişebilir. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro çoğalma kapasitelerini korumaları, bu hücrelerde telomeraz aktivitesinin yüksek olması ile ilgilidir. Mezenkimal kök hücrelerde istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasını önlemek amacıyla P3-P5 gibi erken pasajların kullanımı önerilmektedir (50).

### *2.2.3.3. Mezenkimal kök hücrelerin immünojenotipik özellikleri*

Mezenkimal kök hücrelerin tanınmasında bazı yüzey belirleyicilerinden faydalanılabilir. Bunlardan bazıları STRO-1, SB-10, SH3, SH4, CD90, CD105, CD44, CD29, CD133, p75LNGFR, ALCAM (aktive lökosit-hücre adezyon molekülü) ve



CD166'dır. Mezenkimal kök hücreler CD34, CD45, CD11b ve CD14 gibi hematopoetik yüzey belirleyicileri için negatiftir. Diğer taraftan, SH3, SH4 ve STRO-1 antikorları hematopoetik kök hücrelerin yüzeylerindeki antijenleri tanıyamazken, yukarıda da belirtildiği gibi mezenkimal kök hücrelerin yüzeyindeki antijenleri tanıyabilirler (5, 22, 30, 67). Mezenkimal kök hücrelerin pozitif seçimlerinde en sık kullanılan belirleyiciler, STRO-1, CD105, CD133 ve p75LNGFR iken, negatif seçimlerinde ise sıklıkla CD34, CD45 ve CD11b ifade etmemeleri kriter olarak alınmaktadır. Bu bilgi, mezenkimal kök hücrelerin ayırt edilmesinde ve tanımlanmasında bu hücrelerin kültür ortamlarına yapışabilme yetilerine ve uygun mikro çevre koşulları oluştuğunda osteoblast, kondrosit, adiposit veya miyosit gibi çeşitli mezenkimal hücre dizinlerine dönüşebilme potansiyellerine ek olarak kullanılmaktadır.

#### *2.2.3.4. Mezenkimal kök hücrelerin değişim potansiyeli*

Mezenkimal kök hücrelerin, uygun mikro çevre koşulları sağlandığında birçok hücre tipine değişme potansiyeli, mezenkimal kök hücreleri rejeneratif tıp uygulamalarında ilgi çekici bir hale getirmiştir. Mezenkimal kök hücreler, in vitro koşullarda kondrojenik, adipojenik, osteojenik ve miyojenik değişim potansiyeline sahiptir (9, 55). Bunlara ilave olarak mezenkimal kök hücreler, endotel hücreleri, pankreas beta hücreleri, epitelyal hücreler, hepatositler ve nörogial hücrelere de farklılaşabilir (73). Bunlar içinde, özellikle nörona farklılaşmanın mümkün olup olmadığı halen araştırmacılar arasında tartışma konusu olsa da, nöronal farklılaşmayı aktive eden uyaranlar ile nöronal antijenleri taşıyan ve nöronal morfolojiye sahip hücreler elde edilmiştir. Fakat fonksiyon olarak nöron özelliği taşıyıp taşımadıkları kesinlik kazanmamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin, in vitro ortamda uygun uyaranlarla kondrojenik, adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri rahatlıkla gösterilmektedir (9, 55). Adipojenik, osteojenik ve kondrojenik değişim özelliklerinin belirtilmesi mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için gereklidir.

Mezenkimal kök hücrelerin değişimi ile ilgili dezavantajlardan bir tanesi, mezenkimal kök hücrelerin kendi kökeninden olmayan adiposit, osteosit, miyosit, hepatosit ve pankreas beta hücresi gibi hücrelere trans-farklılaşmasının in vivo koşullarda sınırlı olmasıdır. Bu durum klinik uygulamalar açısından önem taşımaktadır.

### **2.3. Kemikleşme (Ossifikasyon)**

Vertebralılarda iskelet sistemi mezoderm ve nöral krista hücrelerinden köken alır (3, 49). Primitif kemik yapıların oluşumunda ilk aşama mezenkim hücrelerinin yoğunlaşması ile ortaya çıkan model yapılardır (26, 27, 49). Bu aşamadan itibaren kafatası kemiklerinde olduğu gibi bazı kemikler bu mezenkim doku içerisinde intramembranöz yolla, diğerleri ise ekstremitelerin uzun kemiklerinde olduğu gibi endokondral yolla gelişimlerini tamamlar (33, 49).

#### **2.3.1. İntramembranöz (zarlararası) kemikleşme**

İntramembranöz kemikleşme, mezenkim doku hücrelerinin yoğunlaşarak membranöz bir tabaka oluşturmasıyla başlar. Oluşan membranöz tabakanın damarlanması (vaskülarizasyon) ile birlikte bu tabaka içerisindeki mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşır (49). Bu farklılaşmada, kemik morfogenetik protein (BMP) grubu faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (20). Osteoblastik değişime uğrayan hücreler, osteoid doku veya prekemik adı verilen bir matriks salgılayarak hücreler arası alanı doldurur. İlerleyen dönemde prekemik dokunun kalsifikasyonu ve osteoblastlardan osteositlerin değişimi, gelişen kemik dokusunun organizasyonunu sağlar. Çevredeki mezenkimal dokudaki farklılaşmamış hücreler çoğalarak osteoblastların kaynağı olan osteoprogenitör hücreleri oluşturarak kemik dokunun gelişimine katkıda bulunur. Kalsifiye olmayan çevre mezenkim, periosteum ve endosteuma dönüşür. Bu tip kemikleşmeye en güzel örnek yassı kafatası kemiklerinin gelişimleridir (33, 71).

### ***2.3.2. Endokondral kemikleşme***

Ekstremitelerdeki uzun kemiklerin oluşumu ve oluşumundan sonra bu kemiklerde boyuna uzama endokondral kemikleşme ile gerçekleşir. Endokondral kemikleşmenin oluşacağı bölgede öncelikle bir kıkırdak model oluşması gerekmektedir. Bu nedenle kıkırdak oluşumu (kondrogenез), hem embriyonik dönemde kemik oluşumu hem de daha sonraki dönemlerde uzun kemiklerin boyuna uzamasında önemli bir süreçtir.

Endokondral kemikleşmede öncelikle mezenkim kökenli hücreler kondrositlere dönüşür. Oluşan kondrositler sırasıyla çoğalırlar (proliferasyon), olgunlaşırlar (matürasyon), büyürler (hipertrofi) ve son olarak da ekstrasellüler matrikste kalsiyum birikmesiyle başlayan süreçte yerlerini kemik doku elemanlarına bırakırlar (26, 27, 33, 49). Gerçekleşen bu olaylarda sıkı embriyonik-genetik kontrol söz konusudur. Endokondral kemikleşme sürecinde pek çok kontrol mekanizmasının bulunduğu bilinmektedir (71).

#### ***2.3.2.1. Endokondral kemik gelişiminin aşamaları***

Endokondral kemik gelişimi değerlendirildiğinde aşağıda sıralanan aşamalardan geçmektedir (Şekil 2):

- 1.** Lateral mezodermden köken alan mezenkim hücrelerinin, primitif ekstremitte tomurcuğu bölgelerine göçleri ve mitoz yolu ile proliferasyonları.
- 2.** Prolifere olan mezenkim hücrelerinin ekstremitte tomurcuklarının orta bölgelerinde, hücreler arası teması arttırarak birbirlerine yaklaşmaları ve hücre kümeleri oluşturmak sureti ile yoğunlaşmaları.

Bu aşamada rol oynayan en önemli faktörlerden, hücre bağlantı molekülleri ailesine ait olan N-cadherin ve N-CAM (N-Hücre Adezyon Molekülü)'in, prekondrojenik hücrelerdeki ifadelerinde belirgin artış vardır (51, 64). Bu dönemde ekstrasellüler matriks (ECM), mezenkim hücrelerinin birbirleri ile yakın temaslarına izin veren bir yapıda olup tip I kollajen, hyalüronan, tenascin, fibronectin gibi faktörlerden zengindir (25, 26, 27). Ayrıca, prekondrojenik mezenkimal hücrelerde spesifik olarak ifade edilen ve bir transkripsiyon faktörü olan Scleraxis, kırıkdağa özel genlerin transkripsiyonlarını tetiklemektedir (12). Bu protein, kırık dokusu yerini kemik dokuya bırakıncaya kadar aktif kalır. Yine önemli bir transkripsiyon faktörü olan Sox 9 geninin de spesifik olarak prekondrojenik yoğunlaşma bölgelerinde ifade edildiği ve bir sonraki aşama olan mezenkimal-kondrojenik değişimi tetiklediği bilinmektedir (80). İnsanlarda Sox 9 geninde görülen mutasyonlar "Campomelic Dysplasia" adı verilen ve uzun kemiklerin deformite ve acılanması ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıkmasına yol açmaktadır (15).

**3. Yoğunlaşmış mezenkim hücrelerinin birbirleri ile olan hücreler arası bağlantıları kaybederek kondrositlere değişimleri.**

Bu dönemde kondrositlerdeki N-cadherin ve N-CAM ifadelerinde belirgin bir azalma gözlenir (51, 52, 68). Ayrıca kondrositlerden kırık dokuya özgü bir ekstrasellüler matriks depozisyonu başlar. Bu ekstrasellüler matriksin en önemli bileşenleri olarak tip I kollajen yerini tip II, IX ve XI kollajene bırakırken ilave olarak Gla proteini, kondroitin sülfattan zengin proteoglikanlar, aggrecan proteini ve link (bağlantı) proteini salgılanmaya başlar (25, 26, 27).

**4. Kondrositlerin matürasyonları ve hipertrofiye uğramaları.**

Bu dönemde tipik olarak ekstrasellüler matriksteki tip II, IX ve XI kollajen yoğunluklarını tip X kollajene bırakır ve ekstrasellüler matriks daha fazla fibronectin ve daha az proteaz inhibitörü içerir (25, 26, 27). Kondrosit matürasyonu ve hipertrofisi,

kıkırdak dokuda uygun kalsifikasyon ve ilerleyen dönemde kemik doku ile yer değişim açısından çok önemlidir. Bu mekanizma embriyonik kemik gelişimi sırasında çalıştığı gibi, postnatal dönemde ekstremite kemiklerinde boyuna uzama ve kişinin postürünün gelişimi boyunca ve kırık kemiklerin iyileşmesi sürecinde de büyük önem taşır. Uzun kemiklerde primer ossifikasyon merkezleri diyafiz denilen bölgelerde yer alır (Şekil 2). Bu bölgelerdeki kıkırdak hücreleri hipertrofiye uğrarken, tip X kollajen bakımından zenginleşen ekstrasellüler matriks kalsifiye olmaya başlar. Bunu öncelikli olarak diyafiz bölgesinde 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 başlar. Eş zamanlı olarak hipertrofi gösteren kondrositlerde planlanmış hücre ölümü (apoptoz) gözlenirken, osteoprogenitör hücreler de osteoblastik hücrelere değişim göstermeye başlar. Ortaya çıkan apoptoza ait hücre yapıları kemik matriksinin mineralizasyonunda önemli rol oynar. Bu yolla primer ossifikasyon merkezlerinden başlayan kemikleşme uzun kemiklerin her iki ucunda yer alan epifiz bölgelerine doğru ilerleyerek devam eder.

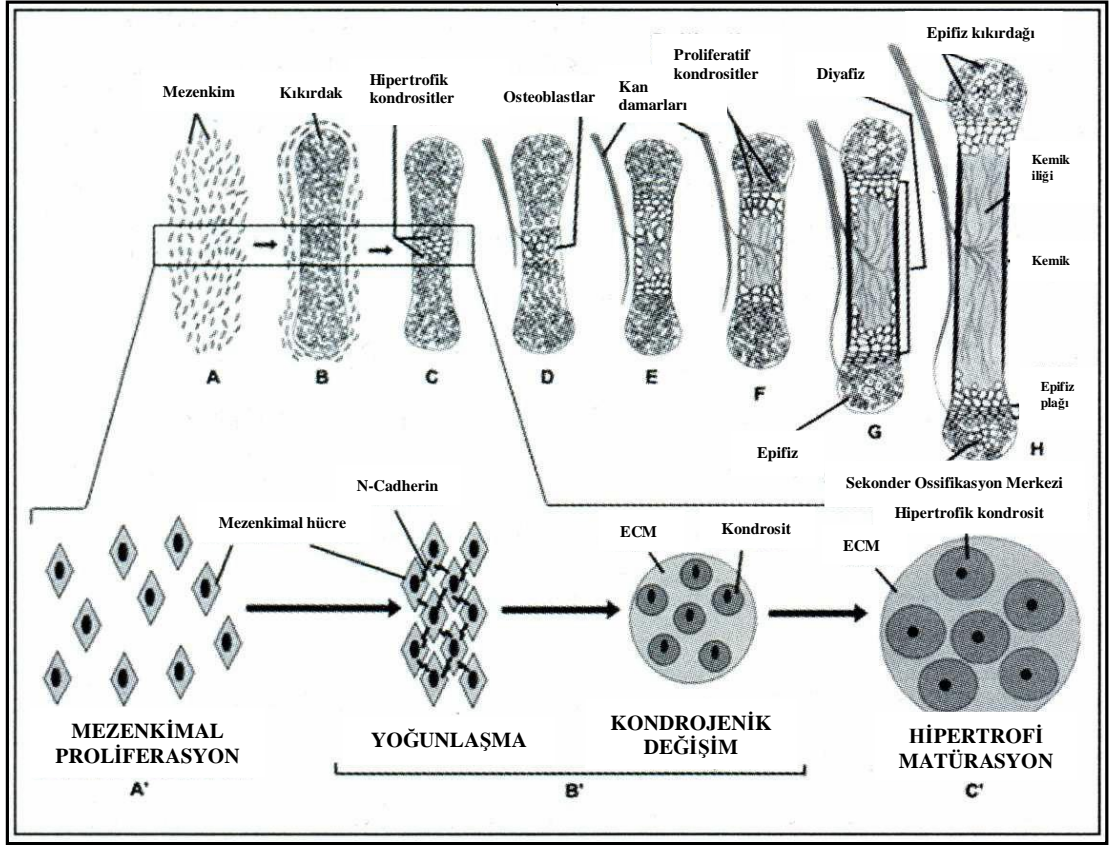
#### *2.3.2.2. Endokondral kemik gelişimini etkileyen başlıca faktörler*

Yukarıda da özetle bahsedildiği gibi, kıkırdak dokuda proliferasyon ve hipertrofi mekanizmaları bir denge içinde çalışmak zorundadır. Bu dengenin sağlanmasında pek çok büyüme faktörü, hormon, sitokin ve hücre sinyal mekanizması rol almaktadır. Bunlar arasında fibroblast büyüme faktör (FGF)'leri (16, 78), östrojen, tiroid hormonu ve triiyodotironin (T3) gibi hormonlar (6, 35), transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ 1 (TGF-  $\beta$ 1) (53, 58), sinyal molekülleri Indian Hedgehog (Ihh) (21) ve paratiroid hormon ilgili peptid (PTHrP) (1, 32), anti-apoptoz faktörlerinden Bcl-2 (38, 74), ayrıca tümör nekrozis faktör (TNF) (76) ve p53-tümör baskılayıcı genler grubundan p63 (81) başlıcalarıdır.

Epifiz plağı bölgesinde (Şekil 2), FGF'lerin etkisi ile kıkırdak hücrelerinin proliferasyonlarında azalmanın yanı sıra matürasyon ve hipertrofi hızlarında artış gözlenir (20). İnsanlarda FGF reseptörlerinde (FGFR) görülen mutasyonların yol açtığı en ciddi klinik tabloyu dwarfizm olguları oluşturur. Örneğin, FGFR-3'ün transmembran bölgesine özel olan ve glisinin arginine dönüşümünü sağlayan, 380 numaralı amino asitte meydana gelen mutasyon akondroplazi olgularının %95'lik bir çoğunluğuna yol açar (16, 20, 78). Diğer taraftan, FGFR-1'de görülen mutasyonların ekstremitelerdeki defektleri ve kranial sütürlerin erken kapanması (Craniosynostosis) ile karakterize Pfeiffer sendromuna yol açtığı gösterilmiştir (20).

Diğer bir önemli faktör östrojen hormonudur. Başta östrojen olmak üzere seks hormonları da proliferasyon hızını artıran ve hipertrofiye olmalarını hızlandırır (35). T3 hormonu da gelişen kemiklerin epifiz plaklarında, hipertrofi gözlenen kondrositlerin organizasyonlarında önemli rol oynar (6). Ayrıca T3 hormon eksikliği görülen hipotiroidizm olgularında, kemiklerin epifiz plağı bölgelerinde mekanik dış etkilere karşı dayanıksızlık gelişir (42). Diğer taraftan TGF-β1 ise kondrosit proliferasyonunu uyarıcıdır (53, 58). Dolayısıyla bu iki faktörün denge içinde çalışan mekanizmalardan biri olduğu olasılığı son dönemde taraftar toplayan bir hipotezdir.

Diğer bir denge mekanizması Ihh ve PTHrP arasındaki negatif geri besleme yolu ile ortaya konmuştur (75). Post-mitotik ve pre-hipertrofik kondrositler özel olarak Ihh salgılayan hücrelerdir. Ihh ise proliferatif bölgeden hipertrofik bölgeye geçiş gösteren kondrosit sayısını kontrol eden PTHrP salgılanmasını uyarır. Mekanizma doyuma ulaştığında PTHrP'nin, Ihh salgılanması üzerindeki inhibe edici negatif geri besleme etkisi, ilave kondrositlerin hipertrofik bölgeye girişlerini ve takip eden apoptozlarını önleyecektir. Diğer sayılan TNF, Bcl-2 ve p63 molekülleri de apoptoz yolağında önemli rol oynamaktadır (74, 81).



**Şekil 2.** Uzun kemiklerde endokondral kemikleşme. (A-H) Uzun kemiklerde endokondral kemikleşme. (A'-C') Endokondral kemikleşme sürecinde önemli yeri olan kondrogenez mekanizmalarının şematik gösterimi (71).

Özetle, yukarıda bahsi geçen mekanizmalar yolu ile ekstremitte kemiklerinin epifiz plağında kondrositlerin proliferasyon, matürasyon ve hipertrofi aşamalarını tamamlamaları sonucunda boyca uzama gerçekleşir. Perikondrium ossifiye olarak yerini periosta bırakır. Kondrositler diyafize doğru hipertrofiye uğrayarak ilerler, matriks kalsifikasyonu ve mineralizasyonu gerçekleşir. Bu hücrelerin yerlerini kemik dokuya bırakmaları ile kemikleşme sonlanır. Epifiz plakları da ossifiye olduklarında kemiklerde boy uzaması durur. Uzun kemiklerin yanı sıra aksiyal ve pelvik kemikler de endokondral kemikleşme yolu ile gelişen iskelet yapılarıdır.

## 2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde Kondrojenik Değişim ve Kondrogeniz Fazlarının Başlıca Belirleyicileri

Genel olarak özetlenen endokondral kemikleşme mekanizması, canlı fare, sıçan ve tavuk embriyo sistemlerinde yapılmış pek çok çalışmanın yanı sıra, son dönemde kondrojenik farklılaşma gösterebilen kök hücreler kullanılarak da analiz edilmektedir.

Kondrogeniz literatüründeki yeni bilgi ve gelişmelerin ve sinyal yolları arası olası çapraz etkileşimlerin özellikle doku mühendisliği ve biyoteknoloji alanlarına taşınması aşamasında kök hücrelerin kullanımı önem kazanmıştır. Kondrojenik değişim yoluna yönlendirilebilecek en önemli kök hücre topluluğu mezenkimal kök hücrelerdir (60).

Multipotent mezenkimal kök hücrelerin in vitro kondrojenik değişimleri, hücre çökelti veya mikro kütle kültürlerinde veya üç boyutlu koruyucu biyomateryaller üzerinde ve genellikle transforme edici büyüme faktörlerinden (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) veya kemik morfogenetik proteinlerinden (BMP'ler) birisinin uyarıcı etkisi altında gerçekleştirilebilir (5, 22, 67).

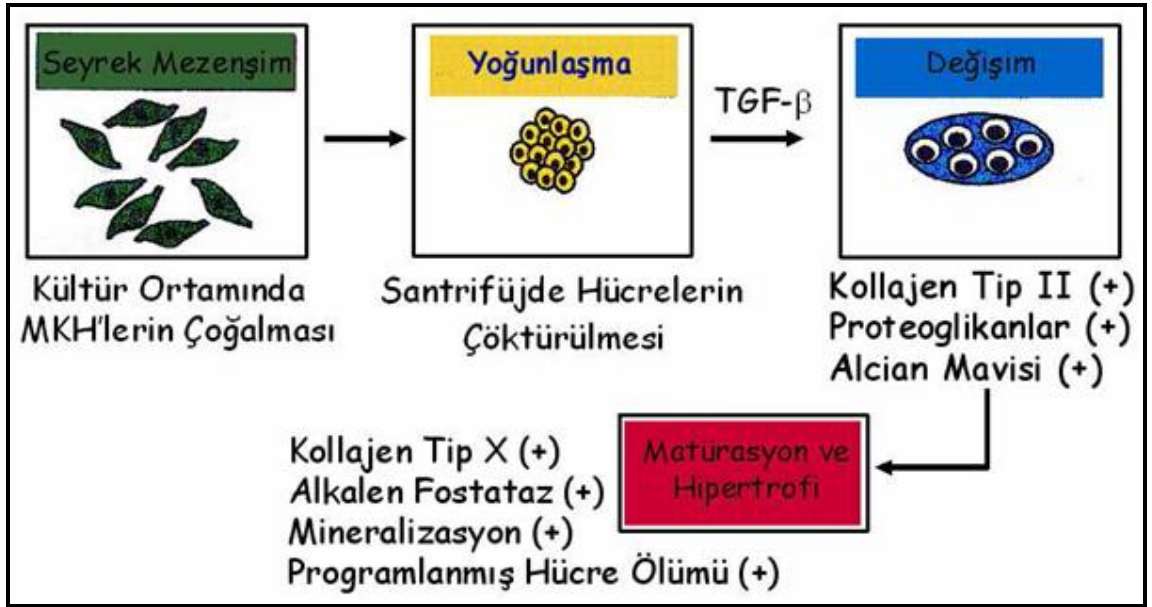
Bu uyarılar altında MKH'lerin kondrojenik değişim geçirdiklerini gösterebilmek için histolojik yapı yanı sıra değişime uğrayan dokunun kıkırdak matriks bileşenlerinden aggrecan, tip II ve tip IX kollajen ve kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP) ifade ettiğinin gösterilmesi önemli kriterlerden başlıcalarıdır. Bir diğeri ise değişime uğrayan dokunun kıkırdak matriksi içinde, zamana bağımlı olarak miktarı artan sülfattan zengin proteoglikanlara bağlanan Alsiyan mavisi boya tutulumundaki paralel artıştır. Bu bilgi birikimi, araştırmamızda uygulanan yöntemlere temel oluşturmuştur. Ayrıca unutulmamalıdır ki, mezenkimal kök hücreler için kaynak hangi doku olursa olsun, bu hücreler kullanılarak gerçekleştirilen in vitro hücre kültürü çalışmaları kondrojenik değişim ve bu değişimde rol oynayan moleküler faktörlerin etkileşimlerinin incelenmesinde oldukça geçerli bir deneysel model oluşturmaktadır (4, 13, 68, 69, 70).



In vitro model sistemlerinin en sık kullanılanlarından birisi de ‘hücre çökelti kültür sistemi’ olarak bilinmekte olup, araştırmamızda da kullanılan in vitro kondrogenez hücre kültür modelidir. In vitro çalışmalarda;

- 1- Kondrojenik değişim,
- 2- Kondrosit matürasyon ve hipertrofisi,
- 3- Programlanmış hücre ölümü (apoptoz) basamaklar zinciri mekanizmalarını çeşitli moleküler belirleyiciler ile birbirlerinden ayırt etmek ve incelemek mümkündür. Moleküler belirleyiciler kısaca şu şekilde özetlenebilir (Şekil 3):

**Tip II Kollajen:** mRNA veya protein düzeyindeki tespiti, prematüre kırık dokusunda kondrojenik değişimin gerçekleşmiş olduğunu gösterir (68). Gerek proliferasyon gerekse yoğunlaşma dönemlerindeki değişim geçirmemiş mezenkim hücreleri ise tip II kollajen negatiftir.



Şekil 3: Mezenkimal kök hücrelerde invitro kondrogenez

**Alsiyan Mavisi Boyaması:** Alsiyan mavisi boyası özel olarak kondrojenik değişime uğramış hücrelerin ekstrasellüler matriks içerisine salgılamakta oldukları

proteoglikanları mavi renge boyar (39). Proliferasyon ve yoğunlaşma fazlarında ise prekondrojenik doku bu boyayı tutmaz.

**Tip X Kollajen:** Sadece hipertrofiye uğramış olan kondrositler tarafından ekstrasellüler matrikse salgılandığı için mRNA veya protein düzeyindeki tespiti matürasyon ve hipertrofi fazına özeldir (15, 27, 44).

Endokondral kemik gelişiminde rol oynayan kontrol mekanizmalarının gerek in vivo gerekse in vitro model sistemler kullanılarak hangi aşamada fonksiyon gösterdiklerinin tespitinde, yukarıda sayılan moleküler belirleyicilerdeki kantitatif değişiklikler temel kriterler olarak alınmaktadır.

## **2.5. Kondrogenез ve Natriüretik Peptid Sinyal Yolları**

Yukarıda detaylı olarak oluşum sırası verilen embriyonik kıkırdak gelişimi ve takip eden endokondral kemikleşme basamaklar zinciri, pek çok genetik ve moleküler faktörün kontrolü altındadır. Bunlar arasında büyüme faktörleri grubundan olan TGF- $\beta$  ve FGF grubu proteinler, bu büyüme faktörlerinin etki mekanizmalarında rol alan katenin, SMAD (small mothers against decapentaplegic) ve MAPK (mitojen aktive protein kinaz) grubu proteinler, Hox, Sox, En (Engrailed) ve Lef-1 gibi transkripsiyon faktörleri ve Wnt grubu sinyal molekülleri başta gelen kontrol mekanizmalarını oluştururlar. Kıkırdak dokunun ileride kemik dokuya yerini bırakacağı uygun form ve yapısını sağlayan, tüm bu moleküllerin bir uyum içerisinde çalışarak yönlendirdikleri özel hücreler arası ilişkiler, hücre-matriks ilişkileri ve özel gen ifadeleridir.

Son dönemde tanımlanmış ve endokondral kemik gelişimi sürecinde etkili olduğu düşünülen önemli bir diğer kontrol mekanizması da C tipi natriüretik peptid (CNP) ve reseptörü natriüretik peptid reseptör-B (NPR-B)'yi kapsamaktadır. Önemli bir cücelik grubu olan Akromezomelik Displazi, NPR-B proteininin fonksiyon kaybına yol açan

mutasyonları sonucu ortaya çıkar. NPR-B ile ilgili bu bilgi oldukça yeni olup (7), bulunuşu Akromezomelik Displazi'nin bir alt grubu olan Akromezomelik Displazi Maroteaux Tip'li (AMDM, OMIM no. 602875) hastaların kendilerinden ve sağlıklı aile bireylerinden elde edilen DNA örneklerinin bağlantı analizi ve bu analiz sonrası elde edilen bilgiler doğrultusunda insan 9. kromozomu üzerindeki ilgili lokus (9p13-q12) bölgesinde yer alan aday genlerin sekanslarının taranması sonucunda elde edilmiştir (7, 31, 34).

AMDM (43), otozomal çekinik geçiş gösteren bir dwarfizm türü olup, genellikle doğum boy ve ağırlıkları normal sınırlarda olan kişilerin doğumu takip eden 1. yıl sonunda yaşıtlarına göre kısa kalma eğilimi gösterdiği ve 2. yıl sonunda ise tipik radyolojik bulguları ile kesin tanı koyulabilecek hale geldiği, uzun kemiklerde ve vertebrada şekil bozuklukları, özellikle ekstremitelerde orta ve distal uzun ve tübüler kemiklerinde kısalık ve epifiz büyüme plaklarında normal dışı gelişme ile karakterize bir patolojik durumdur (7, 24, 31, 34). İlginçtir ki, AMDM tanısı konmuş kişilerde bugüne kadar tutulum görülmüş olan tek sistem iskelet sistemidir.

### ***2.5.1. Natriüretik peptid ailesi***

Natriüretik peptidler birbirleri ile yapısal benzerlik gösteren ancak genetik olarak farklı hormonlardır. Bir kısmı parakrin faktörler olarak da bilinen bu peptidler, kan hacmi, kan basıncı, ventrikül duvar kalınlığı, pulmoner tansiyon, yağ metabolizması ve uzun kemiklerde büyüme üzerine etkilidir (57).

Bilinen 3 klasik tipi vardır (Şekil 4):

- 1- Atriyal natriüretik peptid (ANP),
- 2- B-tipi natriüretik peptid (BNP),
- 3- C-tipi natriüretik peptid (CNP).

Fizyolojik araştırmalar, insanda kalp ve böbrek arasındaki bağlantıyı uzun zaman önce ortaya koymuştur. İlk olarak sıçanlarda atriyalara intravenöz olarak enjekte edilen bir homojenatın böbreklerde sodyum ve su atılımını arttırarak, kan basıncını hızla dşrdği gösterilmiştir (14). Bu gelişme sonrasında atriyumdan, hem natriüretik etkisi hem de düz kas gevşetme aktivitesi olan bir peptid izole edilmiş ve değişik çalışmalarda bu peptid, atriyal natriüretik faktör, kardionatrin, kardiodilatin, atriopeptin ve atriyal natriüretik peptid (ANP) olarak isimlendirilmiştir (14). Bu son tanımlama bugün en sık kullanılandır. İlerleyen yıllarda natriüretik peptid ailesinin diğer yeleri olan beyin natriüretik peptid (BNP; B tipi natriüretik peptid) ve C tipi natriüretik peptid (CNP) de sırası ile domuz ve beyin ekstratlarından ve onların gevşetebildiği düz kaslardan izole edilmiştir (54).

Bütün natriüretik peptidler prehormon olarak sentezlenir (şekil 4). İnsan preproANP'si 151 amino asit uzunluğundadır. Aminoterminal bölümü ayrılması sonucu oluşan 126 amino asitli proANP, atriyumdaki kalp kası hücrelerinin granüllerinde depolanan predominant formdur. ANP primer olarak atriyumdaki hücrelerin granüllerinde depolanır, fakat düşük yoğunlukta ventrikül ve böbrek gibi dokularda da bulunur. ANP salınımı için birincil uyarıcı intravasküler volüm artması sonucu atriyum duvarının gerilmesidir. Salgılanan ANP önce koroner sinüse perfüze olur ve endokrin yolla çeşitli hedef organlara ulaşır. Ayrıca endotelin, angiotensin ve arginin-vazopressin ANP salınımını uyarıcı faktörlerdir. İnsan ANP geni 1. kromozomun 1p36.2 lokusunda bulunur ve u ekson içerir.

B-tipi natriüretik peptid esas olarak domuz beyin ekstratlarından izole edilmiştir. Sonradan insanlarda veya hayvanlarda konjestif kalp yetersizliği veya miyokardiyal enfarktüs gibi kardiyak stres altında iken çok yüksek yoğunlukta kalp ventriküllerinde bulunmuştur. BNP bir kardiyak hormondur ve normal yetişkin kalbinde ventriküllerden salgılanmaktadır (8, 18). BNP, 134 amino asitli preprohormon olarak sentezlenir. Sonra bir parça ayrılır ve 108 amino asitli prohormon haline gelir. Ardından, bilinmeyen bir proteazla kesilmesi sonucu 76 amino asitlik amino-terminal inaktif fragman ve 32 amino asitlik karboksil-terminal, biyolojik aktif peptide ayrılır.

BNP, atriyumdaki hücrelerin granüllerinde ANP ile birlikte depolanır; ama ventriküldeki hücrelerin granüllerinde depolanmaz. BNP yapımı aşırı volüm yüklenmesi sonucu kardiyak duvar gerilmesi ile düzenlenir. Nükleer transkripsiyon faktörü, GATA4 bu olgunun düzenlenmesinde baskın rol oynar. Sağlıklı bireylerde plazma yoğunluğu yaklaşık olarak 3,5 pg/ml veya ANP'nin onda biridir. Buna karşın, konjestif kalp yetersizliği olan hastalarda plazma BNP yoğunluğu 200-300 kat yükselir, böylece BNP plazma yoğunluğu, kardiyak stresin ideal uyarandır. Birçok çalışma BNP seviyesinin yükselmesi ile kötü prognozun ilişkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, gerek ANP gerekse BNP esas olarak natriürezisi ve kan basıncını düzenleyen kardiyak hormonlar olarak ayırt edilmişlerdir. Diğer taraftan bu çalışmanın da önemli bir bölümünü oluşturan CNP pek çok farklı dokuda bulunur. Bunlar arasında başlıcaları kıkırdak, kemik, beyin, endotel, düz kas ve kalp olarak sıralanabilir (57). Hücrelerden salgılanan bu proteinin endotel hücre kültürlerindeki sekresyonu, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 ve stres tarafından uyarılır, insülin tarafından da arttırılır.

İnsan proCNP'si 103 amino asit içerir ve hücre içi endoproteaz furin ile in vitro işleme tabi tutularak olgun 53 amino asitli peptide dönüştüğü gösterilmiştir. Bazı dokularda CNP-53 bugün için bilinmeyen bir enzim tarafından bölünerek aktif peptid olan CNP-22'ye dönüştürülür. CNP-53 beyin, endotel hücresi ve kalpte major form iken, CNP-22 insan plazması ve serebrospinal sıvıda predominanttır.

Fare ve insanda natriüretik peptid genlerinin mutasyonlar ile inaktivasyonu sonucu görülen başlıca fenotipler şunlardır (54):

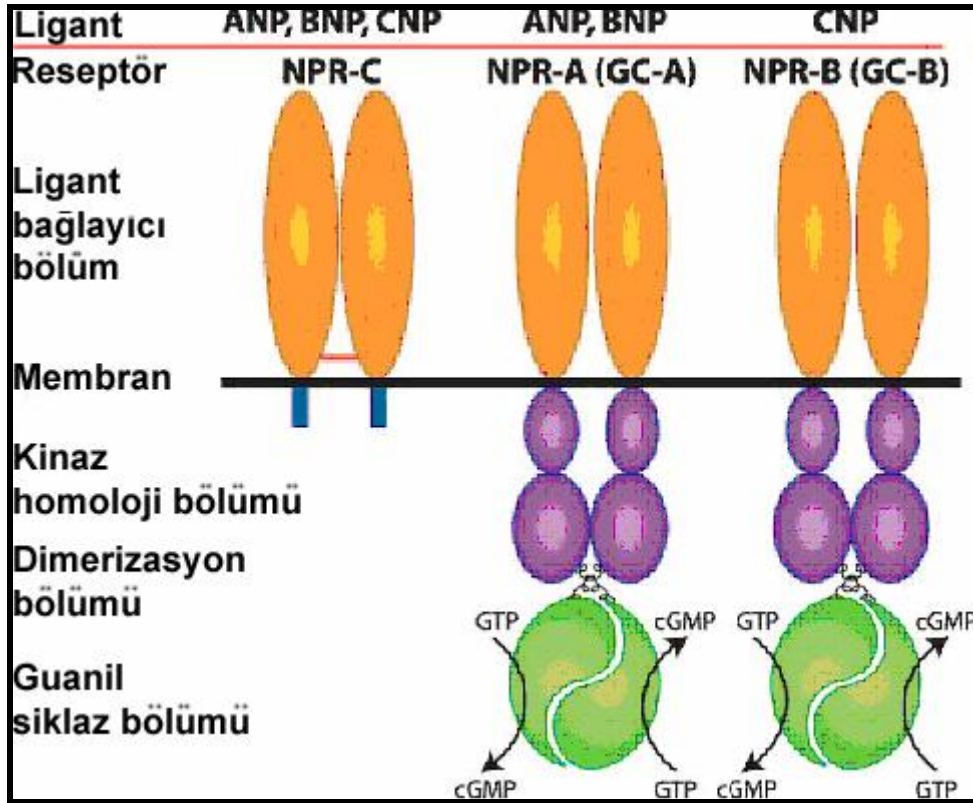
- 1- ANP mutasyonlarında hipertansiyon ve kardiyak hipertrofi,
- 2- BNP mutasyonlarında ventriküler fibrozis,
- 3- CNP mutasyonlarında ise dwarfizm görülmektedir.



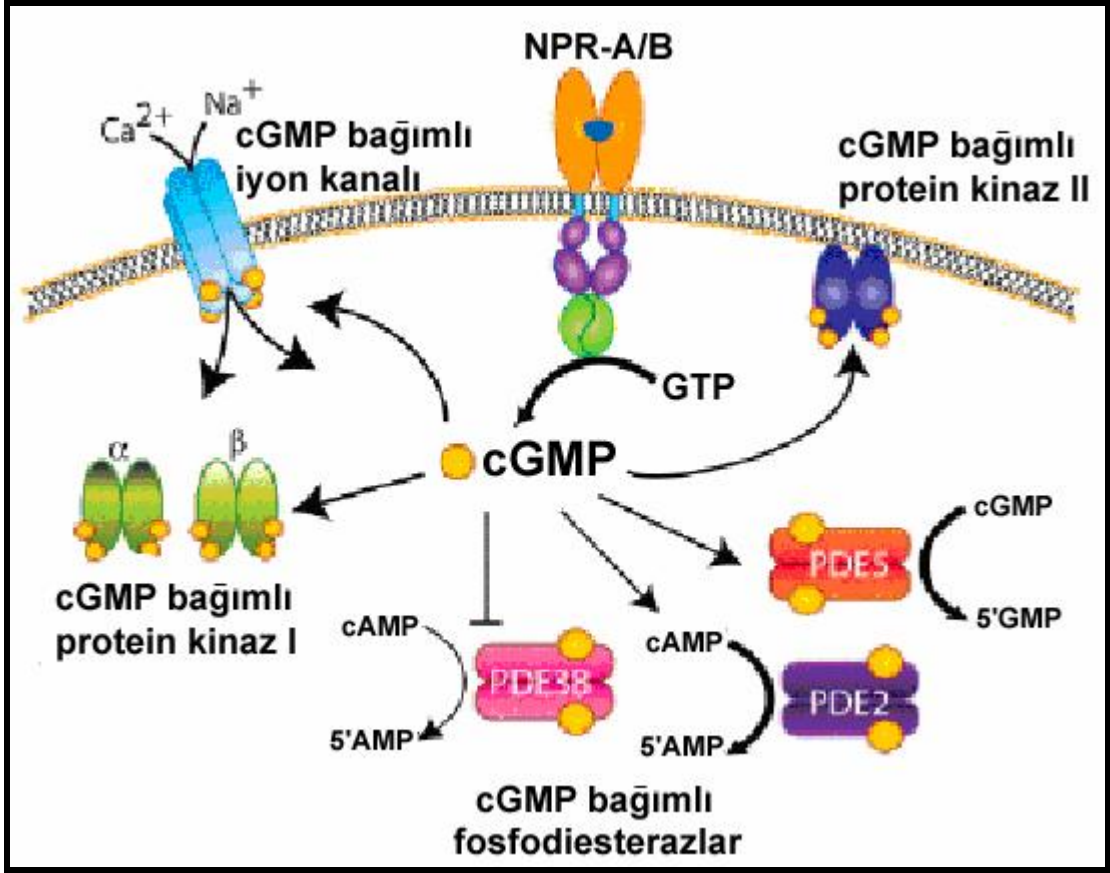
### 2.5.2. Natriüretik peptid reseptörleri

Natriüretik peptidlerin bilinen üç farklı reseptörü vardır (Şekil 5). İlk ikisi [Natriüretik Peptid Reseptör-A (NPR-A, GC-A, NPR1) ve NPR-B (GC-B, NPR2)] transmembran guanil siklazlar olarak işlev görür ve uyarıldıklarında cGMP sentezini katalizler. Üçüncü reseptör (NPR-C, NPR3) ise hücre içi enzimatik aktiviteden yoksun olup, her üç natriüretik peptidin lokal konsantrasyonunu ayarlayan bir rol üstlenir (Şekil 5).

Natriüretik peptidlerin bu reseptörlere bağlanmaları ile hücre içi fizyolojik etkileri üç farklı cGMP bağlayan protein grubu tarafından yönlendirilir. Bunlar: cGMP bağımlı protein kinazlar (10), cGMP ile yönlendirilen fosfodiesterazlar ve cGMP bağımlı iyon kanallarıdır (Şekil 6).



Şekil 5: Natriüretik peptid reseptörleri (57)



Şekil 6: Natriüretik peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri (57)

### 2.5.2.1. Natriüretik peptid reseptör A

İnsan ve sıçanlarda NPR-A mRNA'sı, en fazla böbrek, adrenal bez, terminal ileum, yağ doku, aort ve akciğerde bulunur. NPR-A'nın natriüretik peptidlere afinitesi sırası ile  $ANP \geq BNP > CNP$  şeklindedir (57).

### 2.5.2.2. Natriüretik peptid reseptör C (Natriüretik peptid clearance reseptör)

NPR-C mRNA'sı başlıca atriyum, mezenter, plasenta, akciğer, böbrek, venler, aort düz kası, aortik endotelyal hücreler, kıkırdak ve kemikte bulunur. Hücre içi guanil siklaz enzimatik aktivitesinden yoksun olup, her üç natriüretik peptidin lokal



yoğunluğunu ayarlayan bir rol üstlenir. NPR-C'nin natriüretik peptidlere afinitesi, insan ve sıçanlarda sırası ile  $ANP \geq CNP > BNP$  şeklindedir (57).

### 2.5.2.3. Natriüretik peptid reseptör B

NPR-B'nin beyin, adrenal bez, uterus gibi birbirinden farklı pek çok organda varlığı gösterilmiştir (63). Ancak mevcut literatür bilgileri bu proteinin ana görevinin iskelet sistemi gelişimi ile ilgili olduğunu düşündürmektedir (7). AMDM'li hastalarda da iskelet sistemi bulgularına eşlik eden nörolojik defektler ve bozukluklar veya anormal kan basıncı düzeyleri gibi problemlerin görülmemiş olması bu düşüncüyü desteklemektedir. NPR-B'nin natriüretik peptidlere afinitesi sırası ile  $CNP \gg ANP \geq BNP$  şeklindedir (57).

Daha önce de belirtildiği gibi NPR-B'nin iskelet sistemi gelişimi üzerine olan etkileri ve bu etkilerin mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, bu reseptörün ana ligantı olan C tipi natriüretik peptidi (CNP) veya bu reseptörün ikincil habercilerinden birisi olarak görev gördüğü düşünülen cGMP-bağımlı protein kinaz II (cGKII) sinyal yolunu hedef alan geçmiş çalışmalar bize bu konuda ışık tutmaktadır (57).

Fare modelinde yapılmış çalışmalarda, CNP'den yoksun farelerde dwarfizm (11), genomlarına CNP transferi yapılmış ve bu proteini normalden daha fazla üreten farelerde ise uzun kemiklerde boy uzaması gerçekleşmiştir (11, 82). Fare ve sıçan tibiaları kullanılarak yapılmış organ kültürlerinde ise, CNP kondrosit proliferasyonu ve hipertrofisini arttırmıştır (45, 82). Ayrıca, CNP matriks sentezini arttırarak FGFR-3 mutasyonlu akondroplazik farelerde dwarfizmi engellemiştir (82).

CNP, NPR familyasından NPR-B'nin yanı sıra NPR-A ve/veya NPR-C'ye de bağlanabilmekte ve bu reseptörlerden özellikle NPR-C'de epifiz büyüme plağında ifade

edilmektedir (7). Diğer taraftan NPR-B, CNP ile aktivasyon sonrası cGMP ile etkileşerek cGMP bağımlı protein kinazları aktive etmektedir (41). Bu bağlamda farklı amaçla hazırlanmış bir cGKII (insanlarda *PRKG2* genine karşılık gelmektedir) defektli fare modelinde dwarfizm gözlenmiş olması da anlamlı bir bilgidir (56). cGKII knock-out farelerde epifiz plağı terminal hipertrofi bölgesinde henüz değişimlerini tamamlayamamış kondrositlerin bir yığılım oluşturdukları gösterilmiştir (56). Ancak CNP knock-out farelerde aynı bulgunun bulunmayışı ise, NPR-B'nin endokondral büyümeyi hem cGKII bağımlı hem de cGKII bağımsız sinyal yollarının tümünü kullanarak düzenlediğini düşündürmektedir (47).

Son olarak, NPR-B proteini fonksiyonel haployetersizliği, ki bu durum AMDM gözlenen hastaların taşıyıcı anne ya da babalarında görülmektedir, normale göre dwarfizm düzeyinde olmayan boy kısalığı ile karakterizedir (7).

Tüm bu bilgiler ışığında NPR-B'nin endokondral büyüme üzerine olan etkilerinin ve hücre dışı sinyallerin bu büyümenin hangi evresinde ve hangi mekanizmalar ile hücre içine taşınarak ne gibi değişikliklere yol açtığının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Araştırmamızda elde edilen yeni verilerle, oldukça kompleks bir düzenlenmesi olan endokondral büyüme biyolojisinde yeni yaklaşımların sağlanabileceğini düşünmekteyiz.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi

Trabeküler kemik parçaları, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi ve Pamukkale Üniversitesi Hastaneleri Ortopedi Anabilim Dalları işbirliği ile hastaların onayı dahilinde, toplam 6 hastanın iliak kemik, femur başı ve vertebra kısımlarından elde edildi. Bu 6 hastaya (3 kadın ve 3 erkek; yaş aralığı 25-68; ortalama yaş  $\pm$  SEM = 48.67  $\pm$  7.13) ait bilgiler Tablo 1’de özetlenmektedir. Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi, Tıbbi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Bkz. EK-1).

**Tablo 1.** Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin elde edildiği hastaların özellikleri

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Örnek Alınan Yer	Primer Osteoartroz
1	K	57	İliak Kemik	+
2	K	68	Femur Başı	+
3	E	46	Femur Başı	+
4	E	32	Vertebra Korpusu	+
5	K	25	İliak Kemik	+
6	E	64	İliak Kemik	+

1-1,5 cm<sup>3</sup> hacmindeki trabeküler kemik parçaları steril şartlarda %10 fetal sığır serumu (FBS) ve 50 µg/ml penisilin-streptomisin içeren DMEM (yüksek glukoz, L-glutamin pozitif) içerisine koyularak hızla hücre kültürü laboratuvarına getirildi. Aseptik şartlarda, aynı besi yeri içerisinde cerrahi diseksiyon makası ile olabildiğince küçük parçalara ayrılan bu materyal en az 4-5 kez 50 ml tüp içerisinde, 20 ml temiz besi yeri ile kuvvetli çalkalayarak yıkandı. Bu kemik parçaları, yüzeylerinde bulunan hücresel materyalden arındırılmak için 2 mM L-glutamin, 50 µg/ml askorbik asit, 256 U/ml kollajenaz (Worthington, Lakewood, NJ, A.B.D.) ve 50 µg/ml penisilin-streptomisin içeren DMEM (yüksek glukoz) içerisine aktarılarak, 37°C, %5 CO<sub>2</sub>’li ve

nemli inkübatörde 3-4 saat süre ile bekletildi. Yaklaşık 10-15 dakika aralıklarla tüpler kuvvetlice çalkalanarak reaksiyonun etkinliğini arttırmak hedeflendi. Bunu takiben kemik parçaları steril, %0,9'luk sodyum klorür ile 4-5 kez yukarıda tarif edildiği gibi yıkandı.

%10'luk FBS (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA, A.B.D.) ile enzimatik yıkım durduruldu. İçerisinde 2 mM L-glutamin, 2 mM esansiyel amino asit, 50 µg/ml penisilin streptomisin ve DMEM bulunan tam besi yeri 100 mm'lik kültür plaklarına (petrilere) aktarıldıktan sonra kemik parçaları bu kültür plaklarına ekildi. Tam besi yeri ve kemik parçalarını içeren kültür plakları, 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ve nemli inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin trabeküler kemik parçalarından göçleri ve ardından çoğalmaları takip edildi (Şekil 7).

Bu andan itibaren kemik parçalarından mezenkimal kök hücrelerin radial tarzda uzandığı ve kültür plakları içerisinde uygun yoğunluğa (%60-80) eriştiği görülene kadar 3 günde bir besi yeri tazesini ile değiştirildi.

Kültür plaklarında hücreler %80'lik bir yoğunluğa eriştiğinde (yaklaşık olarak 3-4 hafta), hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere, 1. pasaj aşamasında %10'luk DMSO içeren idame besi yeri içerisinde ve -80°C'de saklandı. Bir kısmı ise devam eden deney aşamalarını gerçekleştirmek üzere tripsinizasyon (hücreleri kültür plaklarının tabanından ayırma) işlemine tabi tutuldu. Bunun için kültür plaklarına, içerisindeki besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra, 2'şer ml, %0,25'lik tripsin (Type II-S, Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) içeren EDTA solüsyonu konularak 4-7 dk inkübatörde bekletildi. Hücrelerin tabandan ayrıldığı inverted mikroskop altında gözlemlendi. Tripsinin aktivitesini durdurmak amacıyla kültür plaklarına serum içeren tam besi yeri ilave edildi. Pipetle kültür plaklarının tabanları yıkanmak suretiyle, hücreleri içeren besi yeri çekilerek 15'lik Falcon tüplere aktarıldı. 5 dk 1000 rpm devirde santrifüjü takiben tüplerdeki süpernatant, hücre çökeltisine değmeden atıldı. Elde edilen hücreler 1/3 oranında hızlı bir şekilde pasajlandı.

### **3.2. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu**

Karakterizasyon yapmak amacıyla çoğaltılmaya ve pasajlanmaya devam edilen hücreler, tripsinizasyon işlemini takiben 1/3 oranında yeni kültür plaklarına ekildi ve yine 3 günde bir besi yerleri değiştirilerek uygun yoğunluğa ulaşmaları beklendi. Uygun yoğunluğa ulaşan 3. pasaj hücreler tripsinize edildikten sonra, bir tüpte 480 µl tam besi yeri, 10 µl hücre süspansiyonu ve 10 µl tripan mavisi karıştırıldı, bu karışımdan 10 µl alınarak Thoma lamına yüklendi ve mikroskop altında sayım yapıldı.

Elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kültür plaklarının tabanına yapışma özelliklerine ek olarak, literatürde bilinen mezenkimal kök hücre spesifik hücre yüzey antijenlerini ifade edip etmedikleri floresan-immünohistokimyasal (IHK) yöntem ve Flow Sitometri ile test edildi.

#### **3.2.1. Floresan-immünohistokimyasal yöntem**

CD34 (TUK3), CD45 (35-Z6), CD73 (IE9), CD105 (Endoglin; P3D1), CD144 (VECadherin; F8), STRO-1 fare monoklonal antikorları ile primer antikorun yapısına göre belirlenmiş subgrup spesifik FITC konjuge sekonder antikorlar (goat-anti-mouse-IgG<sub>1</sub>, goat-anti-mouse-IgG<sub>3</sub> ve goat-anti-mouse-IgM) Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) firmasından temin edildi.

Bu amaçla seçilen hücre yüzey antijenleri, literatürde insan trabeküler kemik kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin bu antijenler için bilinen ifade profilleri ve bunlarla uyumlu sekonder antikorlar Tablo 2'de gösterilmektedir (50, 72).

**Tablo 2.** Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan primer ve sekonder antikorlar

<b>Primer Antikor</b>	<b>Ne İfade Ettiği</b>	<b>Sekonder Antikor</b>
STRO-1	Hematopoetik olmayan, kemik iliği progenitör hücre belirleyicisi	IgM
ENDOGLİN		IgG <sub>1</sub>
CD73		IgG <sub>3</sub>
CD45	Hematopoetik ve/veya endoteliyal hücre belirleyicisi	IgG <sub>1</sub>
CD34		IgG <sub>1</sub>
CD144		IgG <sub>1</sub>

Mezenkimal kök hücreleri immünohistokimyasal olarak karakterize etmek için önce tek tabaka kültürler %10 soğuk metanol ile 1 gece fikse edildi. Metanolün uzaklaştırılmasının ardından açık havada kurutuldu. PBS ile yıkama ve 2 saat oda sıcaklığında serum ile bloklamayı takiben (Zymed, San Francisco, CA, A.B.D.) kültürler, 1/50 oranında PBS ile dilüe edilmiş uygun primer antikorlar ile +4°C’de 1 gece muamele edildi.

Kültürler, primer antikorlardan arındırılmak amacıyla 4-5 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra, primer antikorlara spesifik, 1/100 oranında PBS ile dilüe edilmiş, FITC ile işaretli sekonder antikorlar ile 3-5 saat muamele edildi.

Sekonder antikorları uzaklaştırmak amacıyla 4-5 kez PBS ile yıkama yapıldı. Hücrelerin nükleuslarına DAPI ile zıt boyama uygulandı. Hücreler floresan mikroskop altında görüntülendi ve fotoğraflandı (Şekil 8A-F).

İnsan tonsil dokusu ve içerdiği vasküler yapılar, CD34, CD45 ve CD144 ifadesi açısından pozitif kontrol materyali olarak kullanıldı (Şekil 8G-İ).

### 3.2.2. Flow sitometri

Bu analiz, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Özetle, 3. pasaj (P3) aşamasındaki hücreler besi yeri içerisinde  $1 \times 10^6$  hücre/ml yoğunlukta süspansiyon haline getirildi. Flow sitometri analizi, FACS Calibur (BD Biosciences, San Diego, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçların analizi, Cell Quest (BD Biosciences) yazılım programı ile ölü hücreler dışlanarak gerçekleştirildi.

Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin immün fenotiplendirilmesi şu antikorlar kullanılarak gerçekleştirildi:

- CD5 (T-hücre belirteci; FITC)
- CD7 (Timosit ve matür T hücrelerinde bulunur; FITC)
- CD10 (N-Cadherin/genel lökosit lenfatik lösemi antijeni-CALLA; PE)
- CD11b (Mac-1  $\alpha$ ; integrin  $\alpha_M$  zinciri; PE)
- CD13 (Aminopeptidaz N/V cadherin; PE)
- CD14 (Monosit farklılaşma antijeni/LPS reseptörü; PE)
- CD15 (3-fukosil-N asetil-laktozamin; FITC)
- CD19 (Foliküler dendritik hücreler ve B hücreleri tarafından ifade edilir; PerCP-Cy5.5)
- CD29 (İntegrin- $\beta 1$  zinciri; PE)
- CD33 (Sialik asit-bağlayıcı immünoglobulin-Lektin 3 gibi; SIGLEC 3; çok erken kemik iliği kökenli hematopoetik kök hücreler için yüzey belirteci; PE)
- CD34 (Hematopoetik progenitör hücre antijeni; PE)
- CD44 (Hyalüronat/lenfosit göçü ile ilgili hücre adezyon molekülü-HCAM; PE )
- CD45 (Protein tirozin fosforaz, reseptör tipi, C/PTPRC/lökosit genel antijeni/hematopoetik köken için hücre belirteci; FITC)
- CD73 (5'-nükleotidaz, ekto; NT5E/integrin- $\beta 5$ ; PE)
- CD90 (Thy-1/Thy-1.1; FITC)
- CD117 (KIT veya C-kit reseptörü/ hematopoetik hücreler; PE)

CD146 (Melanom hücre adezyon molekülü; MCAM; PE)

CD166 (Aktive lökosit hücre adezyon molekülü; ALCAM/integrin  $\alpha 3$ ; mezenkimal kök hücre belirteci; PE)

HLA-ABC (Temel doku uygunluğu kompleksi, MHC sınıf I, HLA-A, B, C; PE)

HLA-DR (Temel doku uygunluğu kompleksi, MHC sınıf II, hücre yüzey reseptörü; FITC)

Tüm bu antikorlar ve bunların uygun izotip kontrolleri Becton Dickinson firması tarafından temin edildi. Sonuçlar Şekil 9'da gösterilmiştir.

### ***3.2.3. Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin değişim potansiyelinin gösterilmesi***

Mezenkimal kök hücreler tek tabaka kültür ortamlarında çoğaltılarak 5. pasaj (P5) hücreler elde edildi. Elde edilen P5 hücrelerin karakterizasyonları aşamasında, immünohistokimyasal yüzey belirleyicileri ile gerçekleştirilen (+)/(-) seçime ilave olarak, olası değişim potansiyelleri analiz edildi. Bilindiği gibi mezenkimal kök hücrelerin temel özelliklerinden birisi de adipojenik, osteojenik ve kondrojenik yönde değişim gösterebilme yetenekleridir (50, 72).

#### ***3.2.3.1. Adipojenik değişim***

Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik yönde değişiminin uyarılmasında, ticari olarak elde edilen STEMPRO Adipojenik Değişim Kiti (Gibco), üretici firmanın verdiği protokole uyularak kullanıldı.

5. pasaj mezenkimal kök hücreler,  $1,5 \times 10^6$  hücre/ml yoğunlukta, her bir kuyucuk için  $5 \times 10^3$  hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde bazal besi yeri ve penisilin streptomisin içeren besi



yeri içerisinde 6 ve 12 kuyucuktan oluşan plaklara ekildi. Yoğun tek tabaka kültürlerin adipojenik yönde değişimi, adipojenik uyarıcı ile gerçekleştirildi. Kontrol grubu, adipojenik uyarının ilave edilmemesi ile oluşturuldu. Adipojenik uyarı 2 hafta uygulandı. Kültürler 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub>’li ve nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Her 3 günde bir besi yeri tazesini ile değiştirildi.

14 günün sonunda deney ve kontrol gruplarına ait kültürlerin bir kısmı, adipojenik yönde değişimi göstermeye yönelik Oil Red O ile boyandı (Şekil 10A). Bir kısmı ise, RNA izolasyonunu takiben konvansiyonel RT-PCR’a tabi tutuldu. (Şekil 10B).

#### **Oil Red O Boyama Solüsyonunun Hazırlanması:**

100 ml izopropanol içine 0,5 gr Oil Red O boyası (Zymed) eklendi. 4 saat cam şişede karıştırıldı. Kurutma kağıdı kullanılarak boyanın filtre edilmesi sağlandı. Hazırlanan Oil Red O çalışma solüsyonundan 6 ml alınarak, içerisine 4 ml distile su eklendi.

#### **Fiksatif Solüsyonunun Hazırlanması:**

11 ml %37’lik formaldehit ve 29 ml PBS ile yaklaşık %10’luk fiksatif solüsyonu hazırlandı.

#### **Boyama Protokolü:**

- Besi yerini tamamen uzaklaştırdıktan sonra kültürler PBS ile yıkandı.
- Kültür yüzeyinin kurduğundan emin olunduktan sonra %10’luk formaldehit kullanılarak hücreler 30 dk fikse edildi.

- Fikse edilen kültürler 1-2 kez PBS ile yıkandı. Böylece hücre yüzeyindeki partiküller uzaklaştırıldı.
- Hazırlanan Oil Red O boyama solüsyonu ile kültürler 1 saat inkübe edildi.
- Boyama solüsyonu uzaklaştırılarak PBS ile 1-2 kez yıkama yapıldı.
- Adipojenik hücreler mikroskop altında görüntülendi ve fotoğraflandı (Şekil 10A).

### 3.2.3.2. Osteojenik değişim

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik yönde değişiminin uyarılmasında, ticari olarak elde edilen STEMPRO Osteojenik Değişim Kiti (Gibco), üretici firmanın verdiği protokole uyularak kullanıldı.

5. pasaj mezenkimal kök hücreler,  $1,5 \times 10^6$  hücre/ml yoğunlukta, her bir kuyucuk için  $5 \times 10^3$  hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde bazal besi yeri ve penisilin streptomisin içeren besi yeri içerisinde 6 ve 12 kuyucuktan oluşan plaklara ekildi. Yoğun tek tabaka kültürlerin osteojenik yönde değişimi, osteojenik uyarıcı ile gerçekleştirildi. Kontrol grubu, osteojenik uyarının ilave edilmemesi ile oluşturuldu. Osteojenik uyarı 3 hafta uygulandı. Kültürler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ve nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Her 3 günde bir besi yeri tazesi ile değiştirildi.

21 günün sonunda deney ve kontrol gruplarına ait kültürlerin bir kısmı, osteojenik yönde değişimi göstermeye yönelik alizarin red ile boyandı (Şekil 10C). Bir kısmı ise, RNA izolasyonunu takiben konvansiyonel RT-PCR'a tabi tutuldu (Şekil 10D).

### **Boyama Protokolü:**

- Besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra kültürler PBS ile 1 kez yıkandı.
- Kültürler 10% 'luk formaldehit solüsyonu ile 30 dakika fikse edildi.
- Fiksasyondan sonra 2 kez distile su ile yıkama yapılmasının ardından kültürler, 2% 'lik Alizarin Red S (Zymed) boyasına (pH 4,2) 2-3 dakika maruz bırakıldı.
- Alizarin Red S boyası 3 kez distile su ile yıkandı.
- Hematoksilen eozin ile zıt boyama yapıldı ve distile su ile boyanın fazlası uzaklaştırıldı.
- Osteojenik hücreler ışık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğraflandı (Şekil 10C).

### **3.2.3.3 Kondrojenik Değişim**

Kondrojenik yönde değişim araştırmamızın ana konusu olduğundan, ticari olarak kullanıma hazır halde elde edilen kondrojenik değişim kiti yerine, deneylerde rutin olarak uygulanan, 3 hafta boyunca TGF- $\beta$ 1 uyarısı altında gerçekleştirilen kondrojenik yönde değişim tercih edildi.

21 günün sonunda deney ve kontrol gruplarına ait kültürlerin bir kısmı, kondrojenik yönde değişimi göstermeye yönelik Alsiyan mavisi ile boyandı (Şekil 10E). Bir kısmı ise, RNA izolasyonunu takiben konvansiyonel RT-PCR'a tabi tutuldu (Şekil 10F).

Tüm değişimler için yapılan RT-PCR'larda kullanılan gen spesifik primer çiftlerine ait bilgiler Tablo 3'te verilmiştir.

### **3.3. Tek Tabaka Kùltùrlerde CNP ve NPR-B Varlığının Gösterilmesi**

Herhangi bir değişime uğramamış konumdaki mezenkimal kùk hùcrelerde, CNP ve NPR-B varlığını göstermek için RT-PCR analizi gerçekleştirildi (şekil 11). Kullanılan gen spesifik primer çiftlerine ait bilgiler Tablo 3'te verilmiştir.

İzole edilen mezenkimal kùk hùcrelerde CNP ve NPR-B'nin protein düzeyinde de varlıklarının gösterilmesi düşünùldü ve immünohistokimyasal analiz gerçekleştirildi. Bunun için, kùltürler önce %10 soğuk metanol ile 1 gece fikse edildi. Metanolün uzaklaştırılmasının ardından açık havada kurutuldu. PBS ile yıkama sonrası hùcrelerde endojen peroksidaz aktivitesi, %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metil alkol (1/9) solüsyonu ile 10 dakika doyuruldu. Yıkama ve serum ile bloklamayı takiben, kùltürler uygun primer antikorlar (CNP ve NPR-B) ile muamele edildi. Hùcreler tarafından tutulan bu primer antikorların immünohistokimyasal analizi, biotin ile konjuge geniş spektrumlu sekonder antikor ve streptavidin konjuge HRP (horseradish peroxidase) iđer Zymed Histostain-Plus kit ve DAB kromojen substrat karışımı ile gerçekleştirildi. Hùcre nükleusları hematoksilin ile zıt boyandı. Hùcreler ışık mikroskobu altında görüntülendi (şekil 12A,B).

CNP (H-115) ve NPR-B (H-80) tavşan poliklonal antikorları Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) firmasından temin edildi. Her iki protein için de pozitif kontrol, primer antikor basamağı atlanarak gerçekleştirildi (şekil 12C,D).

### **3.4. Mezenkimal Kùk Hùcrelerden Çùkelti Kùltürlerin Oluşturulması**

Kontrol grubu çùkelti kùltürler, P3 mezenkimal kùk hùcreler kullanılarak ve kimyasal olarak tanımlanmış serumsuz DMEM (1% ITS-plus, 40 µg/ml L-Proline, 100 µg/ml sodyum piruvat, 50 µg/ml askorbat, 0,1 µM deksametazon, 50 U/ml penisilin, ve 50 µg/ml streptomisin iđer DMEM) kullanılarak, daha önce tarif edildiği şekilde (72)

oluşturuldu. Hücre sayısı çökelti başına  $3 \times 10^5$  (1 ml DMEM içerisinde) olacak şekilde ayarlandı ve hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.

Deney grubu çökelti kültürlerde kondrojenik farklılaşmanın uyarılması için yukarıda tarif edilen besi yerine, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 ilave edildi. C-Tipi Natriüretik Peptid (CNP),  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M ve  $10^{-8}$ M konsantrasyonlarda hazırlanarak, TGF- $\beta$ 1'e ilave olarak gruplara eklendi.

#### **Çalışma grupları:**

- a) Kontrol grubu (sadece serumsuz DMEM ile beslendi)
- b) TGF- $\beta$ 1 grubu (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 ilave edilmiş serumsuz DMEM ile beslendi)
- c) CNP  $10^{-6}$ M grubu (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 ve  $10^{-6}$ M CNP ilave edilmiş serumsuz DMEM ile beslendi)
- d) CNP  $10^{-7}$ M grubu (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 ve  $10^{-7}$ M CNP ilave edilmiş serumsuz DMEM ile beslendi)
- e) CNP  $10^{-8}$ M grubu (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 ve  $10^{-8}$ M CNP ilave edilmiş serumsuz DMEM ile beslendi)

Çökelti kültürler, çalışma guruplarına göre yukarıda tarif edildiği şekilde 3 hafta beslendi. Kültürler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ve nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 3 günde bir besi yeri tazesi ile değiştirildi.

Kontrol ve deney gruplarına ait çökelti kültürlerin bir kısmı, 4, 10 ve 20. günlerde RNA'ların izole edilmesinin ardından CNP ve NPR-B için gen spesifik primer çiftleri kullanılarak konvensiyonel RT-PCR'a tabi tutuldu (Şekil 13). NPR-B için kullanılan primer çiftleri hem NPR-B mRNA'sını hem de NPR-B prekürsör RNA'sını uzatmak için tasarlandı. Kalan kültürler ise 10. ve 20. günlerde CNP'nin konsantrasyona bağımlı etkisini göstermeye yönelik, fiksasyon, doku takibi, parafine gömme ve kesit alma işlemlerini takiben Alsiyan mavisi ile boyandı (Şekil 14A-J). Ayrıca 20. güne ait çökelti kültürler için yapılan RT-PCR (Şekil 14L) sonrası elde edilen gen spesifik bantlar

GelQuant Ver.2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) bilgisayar programı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edildi (Şekil 14M-O).

### 3.5. Kondrojenik Değişimin Alsiyan Mavisi Boyaması ile Analizi

Kültürde 10 veya 20 gün idame edilen çökelti için Alsiyan mavisi boyama protokolü şu şekildedir:

- Kültürler, besi yerinin uzaklaştırılmasının ardından PBS ile yıkandı.
- 1 saat oda sıcaklığında %4'lük paraformaldehit ile fikse edildi.
- Kültürler PBS ile yıkama sonrası rutin histolojik takibe alındı.
- Artan etil alkol serilerinden (sırasıyla, %70, %80, %90, %100) geçirildi.
- Ksilen ile muamele edildi.
- Parafin içerisine gömüldü.
- Parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alındı.
- Histolojik takip sonrası deparafinizasyon işlemine geçildi.
- Kesitler bir gece etüvde bekletildikten sonra yarım saat ksilene maruz bırakıldı.
- Azalan etil alkol serilerinden geçirildi (sırasıyla, %100, %90, %80, %70).
- 5 dakika distile su ile yıkandı.
- Kültürler bir gece boyunca oda sıcaklığında, pH'ı 1,0 olan (39) Alsiyan mavisi (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) boyası ile boyandı.
- Boyanın fazlası yıkama ile giderildi.
- Lam üzerindeki kesitler kurumaya bırakıldı, daha sonra entellan ile kapatma işlemi uygulandı.
- Kesitler ışık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğraflandı (Şekil 14A-J).

Kültür ortamında gerçekleşen kondrogenezin sayısal ve istatistiksel olarak karşılaştırılabilmesi için, bir gece boyunca oda sıcaklığında 6 M guanidine-HCl (1 ml içerisinde, grup başına 5 kültür ve her kültürden birbirini takip etmeyen 3'er kesit olmak

üzere n=15 kesit olacak şekilde) ile kültürlerin tuttuğu boya ekstrakte edildi ve yoğunluğu A<sub>650</sub> dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (60, 70). Deneyler 3 kez tekrarlandı. Sunulan veriler bu 3 deneyin ortalaması ± standart hata şeklindedir (Şekil 14K).

### **3.6. RNA İzolasyonu ve RT-PCR (Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi**

#### **3.6.1. RNA izolasyonu**

Deneylerde kullanılan total RNA, tek tabaka mezenkimal kök hücre kültürlerinden veya mezenkimal kök hücreler ile oluşturulan ve yukarıda anlatıldığı şekilde kondrojenik değişime uğratılan çökelti kültürlerinden, Tri-Reagent (Sigma) kullanılarak izole edildi. Tüm deneyler 3 kez tekrarlanmış olup sunulan veriler bu 3 deneyin ortalaması ± standart hata şeklindedir.

RNA izolasyonu için ilk olarak kültürlerin üzerine 1 ml TRI-Reagent konup 5 dk hücre zarlarının parçalanması beklendi. Daha sonra tüpe 200 µl kloroform eklenip 15 sn vortekste çevirildi. 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda tüpte RNA'yı içeren kısım pipet yardımıyla çekilerek ayrı bir tüpe aktarıldı. Üzerine 500 µl izopropanol (2-bütanol) eklendi. Presipitasyon olarak da adlandırılan bu işlemdeki amaç, total RNA'yı çöktürmek ve kloroformdan arındırmaktır. İçerisinde total RNA'yı bulunduran tüp bir gece -20°C'de bekletildi. Soğutmalı santrifüjde (+4°C'de) 15000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelti üzerindeki süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine 200µl soğuk %70 etil alkol konarak yine soğutmalı santrifüjde 15000 rpm devirde 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak yerine 100 µl distile su kondu. Distile su ile homojenize edilen RNA 10'ar µl olacak şekilde 10 ayrı tüpe paylaştırıldı.

İzolasyonu takiben elde edilen total RNA konsantrasyonu,  $A_{260}$  dalga boyunda, örnek başına 1,5  $\mu$ l RNA yüklenerek spektrofotometrik olarak hesaplandı. Diğer taraftan elde edilen RNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyaması ile test edildi (Şekil 11A).

### **3.6.2. RT-PCR**

Her bir reverse transkripsiyon reaksiyonu için 1  $\mu$ g RNA örneği kullanıldı ve Qiagen OneStep RT-PCR ile Q-solution kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Kullanılan gen spesifik primer çiftlerinin dizileri ve bunlar hakkındaki bilgi Tablo 3'te verilmiştir. Bu reaksiyonlarda kontrol geni olarak GAPDH kullanılmış olup, reaksiyonlar multipleks olarak dizayn edildi.

Bu kit ile kullanılan protokol şu şekildedir:

a) Sırası ile,

- 10  $\mu$ l 5x Qiagen OneStep RT-PCR tampon çözeltisi (12,5 mM  $MgCl_2$  içerir),
- Her dNTP'den 10 mM içeren 2  $\mu$ l dNTP karışımı,
- 10  $\mu$ l 5x Q-solüsyonu,
- Her bir analiz edilen gen için spesifik olarak dizayn edilmiş ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerin her birisinden 10  $\mu$ M konsantrasyonda içeren primer karışımından toplam 3  $\mu$ l (Primerlerin sentezi İontek, İstanbul, Türkiye'de gerçekleştirildi),
- 2  $\mu$ l Qiagen OneStep RT-PCR enzim karışımı,
- 22  $\mu$ l RNase-free distile su,  
olmak üzere toplam 50  $\mu$ l volüm, buz üzerinde örnek RNA ile karıştırıldı.



**b)** Elde edilen karışım ile aşağıda basamakları sıralanan RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

**1-** 50°C, 30 dakika, 1 döngü (reverse transkripsiyon)

**2-** 95°C, 15 dakika, 1 döngü (PCR aktivasyon basamağı)

**3-** 94°C, 1 dakika (denatürasyon)

**4-** 51-57°C (Col II; Col IX, Col X, aggregan için 57°C, diğer bütün genler için 51°C kullanıldı), 1 dakika (primerlerin örnek cDNA'ya yapışması)

**5-** 72°C, 1 dakika (sentez ve uzama); 3, 4 ve 5. basamaklar sırası ile 25-32 döngü tekrarlandı.

**6-** 72°C, 10 dakika, 1 döngü (son sentez ve uzama)

**7-** Reaksiyonlar 4°C'de sonlandırıldı ve -20°C'de saklandı.

**c)** PCR ürünleri, etidyum bromür boyamasının ardından agaroz jel elektroforezi ile gözlemlendi.

**d)** Elde edilen gen spesifik bantlar GelQuant Ver.2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, İsrail) bilgisayar programı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edildi.

**Tablo 3.** Gen ifadelerinin analizinde kullanılan RT-PCR primerleri

Gen (İnsan)	Primer dizisi Sense(F)/Antisense(R)	Ürün (bp)	Referans
CNP	F:GTCAGAAGAAGGGCGACAAG R:TGTTGGCTCCTTTGTATTTGC	162	(GenBank: NM: 024409)
NPR-B	F:AGCGCTGAAGATCCATGTCT R:GGAGTCCAGGAGGTCCTTTC	155	(GenBank: NM: 003995)
<b><u>Yağ dokuya özgü gen</u></b>			
LPL	F:GAGATTTCTCTGTATGGCACC R:CTGCAAATGAGACACTTTCTC	276	50, 72
<b><u>Kemik dokuya özgü genler</u></b>			
Col I $\alpha$ 2	F:GGACACAATGGATTGCAAGG R:TAACCACTGCTCCACTCTGG	461	50, 72
OC	F:ATGAGAGCCCTCACACTCCTC R:GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	294	50, 72
BSP	F:AATGAAAACGAAGAAAGCGAAG R:ATCATAGCCATCGTAGCCTTGT	450	72
ALP	F:TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA R:ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC	454	50, 72
<b><u>Kıkırdak dokuya özgü genler</u></b>			
Col II	F:TTTCCCAGGTCAAGATGGTC R:CTTCAGCACCTGTCTCACCA	377	50
Col X	F:GCCCCAAGAGGTGCCCTGGAATAC R:CCTGAGAAAGAGGAGTGGACATAC	703	50
Aggrecan	F:TGAAGGAGGGCTGGAACAAGTACC R:GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA	350	50, 72
Sox 9	F:ATCTGAAGAAGGAGAGCGAG R:TCAGAAAGTCTCCAGAGCTTG	264	72
<b><u>Ev sahibi gen</u></b>			
GAPDH	F:GGGCTGCTTTTAACTCTGGT R:GCAGGTTTTTCTAGACGG	702	50, 72

F : İleri primer; R : Geri primer.

### 3.7. Tüm İnsan Genom Array Analizi

Bu aşamada 4 çalışma grubu oluşturuldu: Kontrol grubu (K-grubu), TGF- $\beta$ 1 grubu (TGF-grubu), TGF- $\beta$ 1 ve CNP grubu (TC-grubu), CNP grubu.

Her bir grup 10. ve 20. günler olmak üzere iki ayrı zaman noktasında ayrı ayrı analiz edildi ve grupların birbirleri ile olan karşılaştırması gerçekleştirildi.

Tüm gruplardan, daha önce bahsedilen şekilde total RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve RNA izolasyonu öncesi kültürler tripsin/kollajenaz enzim yıkımından geçirildi.

Bu aşamada tüm insan genom array analizi, (HGU133\_Plus2 cRNA sentezinden mikrodizin dahil tarama) Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen ham verilerin biyoinformatik yönünden; mikrodizin kalite kontrol analizi (Şekil 15, 16, 17, 18), mikrodizin verisi ön işleme (Şekil 19), mikrodizin gen ifadesi kat değişimi analizi ve hiyerarşik topaklanma (clustering, sample based) analizleri (Şekil 20, 21) ise HGM Bilişim, Yazılım ve Biyoinformatik şirketinden yine hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen mikrodizin verisi üzerinde her bir deney birimi için, her bir gen ifadesinin kaç kat arttığı araştırılarak, bunlardan 2, 4 ve 8 kattan fazla artış gösterenler belirlendi (Tablo 4).

Yapılan karşılaştırmalar:

- Uygulanan her kimyasal (TGF, CNP veya kombinasyonları) için 10. ve 20. gün,
- Uygulanan her kimyasal için gruplar arası olacak şekilde gerçekleştirildi.

### **3.8. İstatistiksel Analizler**

Kondrojenin ölçülmesi ve RT-PCR sonuçlarının dansitometrik analizlerinin karşılaştırılması için non-parametrik Mann Whitney's U-testi kullanılmış olup, tüm bu istatistiksel karşılaştırmalarda  $P < 0,05$  düzeyi anlamlı olarak kabul edildi.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi**

Altı hastadan elde edilen trabeküler kemik parçalarından başarı ile mezenkimal morfoloji gösteren ve kültür plaklarına yapışma karakterinde olan hücreler elde edildi.

Elde edilen sonuçlar hastaya, yaşa, cinsiyete, kemik materyalinin alındığı donör bölgeye ve benzeri pek çok faktöre bağımlı olabilecek farklılıklar göstermiştir (Şekil 7).

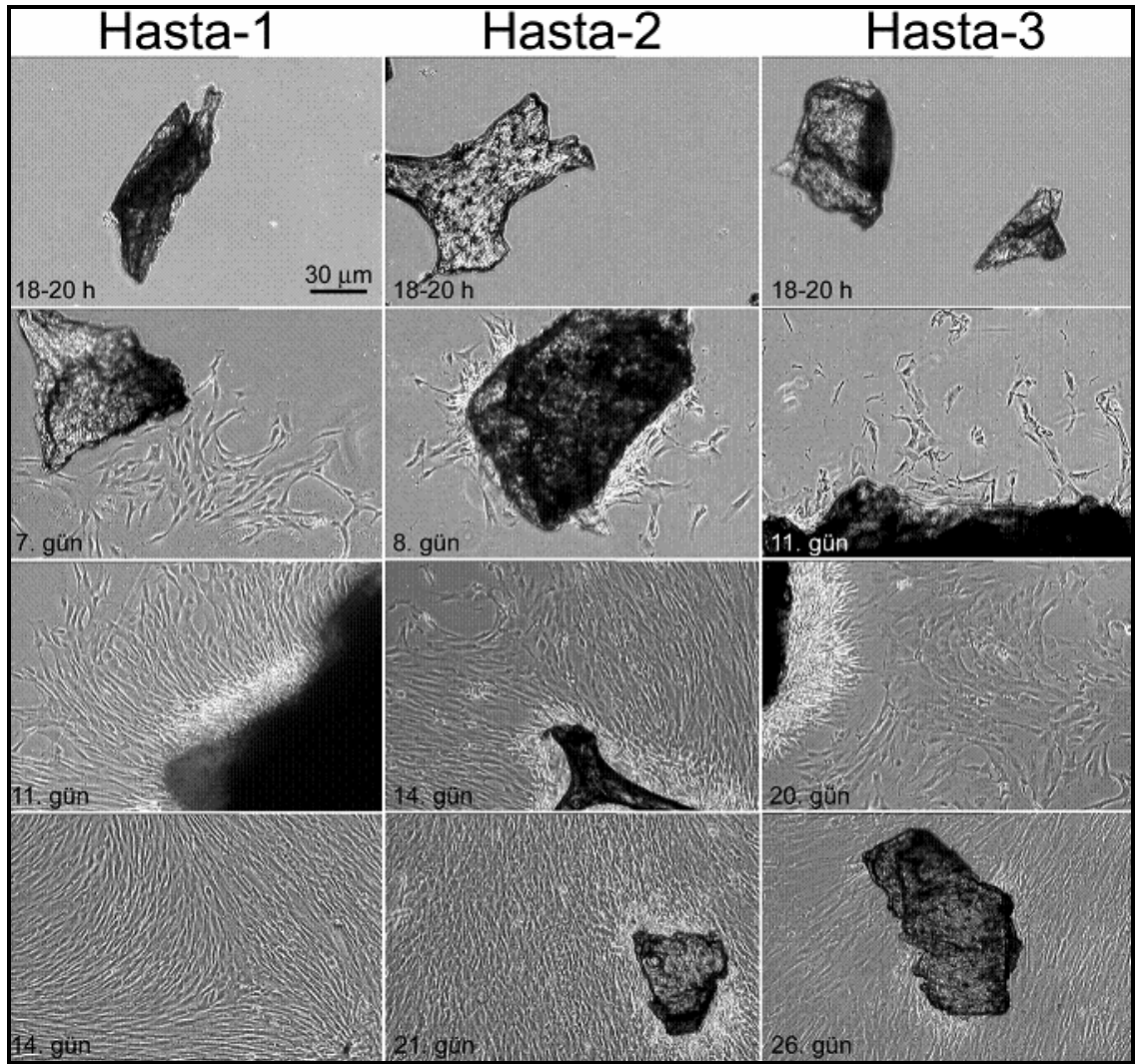
Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin, kemik parçalarından ilk göçlerinin ancak 7-11 günlük inkübasyonu takiben gerçekleştiği, 11-20 günlük bir inkübasyon sürecinde hücrelerin kemik parçaları çevresinde doymuş bir düzeye ulaştıkları ve 14-26 günlük bir inkübasyon sürecinde ise hücrelerin tüm kültür ortamında, odaklar arası bölgelerde de doymuş seviyeye ulaştığı tespit edildi (Şekil 7).

### **4.2. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünohistokimya ile Karakterizasyonu**

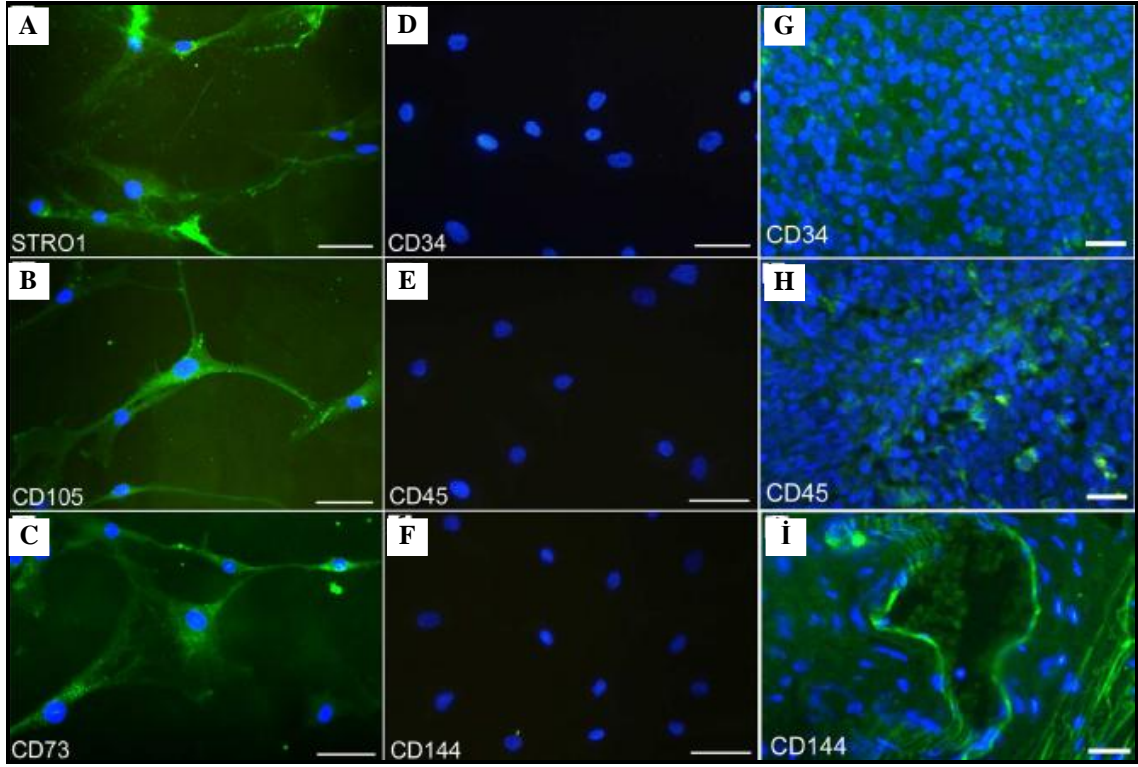
Trabeküler kemik kökenli erişkin insan tek tabaka mezenkimal kök hücreler, temel immünohistokimya ve flow sitometri ile hücre yüzey antijenleri için analiz edildi. İmmünoflorasan boyama için daha önceden mezenkimal kök hücreler ile ilişkili olduğu bilinen hücre yüzey belirteçleri kullanıldı (STRO-1, CD73, CD105, CD34, CD45, CD144). Hücre nükleusları DAPI ile zıt boyandı. Floresan-immünohistokimyasal yöntem sonrası görüntüler, tek tabaka kültürlerdeki tüm hücrelerin hematopoetik olmayan kemik iliği progenitör hücre antijenlerine spesifik olan STRO-1 (Şekil 8A), CD105 (Şekil 8B) ve CD73 (Şekil 8C)'ü ifade ettiğini, hematopoetik ve endotel

hücrelerinin genel belirteci olan CD34 (Şekil 8D), CD45 (Şekil 8E) ve CD144 (Şekil 8F)'ü ifade etmediklerini gösterdi.

İnsan tonsil dokusu ve vasküler yapıları CD34 (Şekil 8G), CD45 (Şekil 8H), ve CD144 (Şekil 8İ) ifadesi için pozitif kontrol amaçlı kullanıldı.



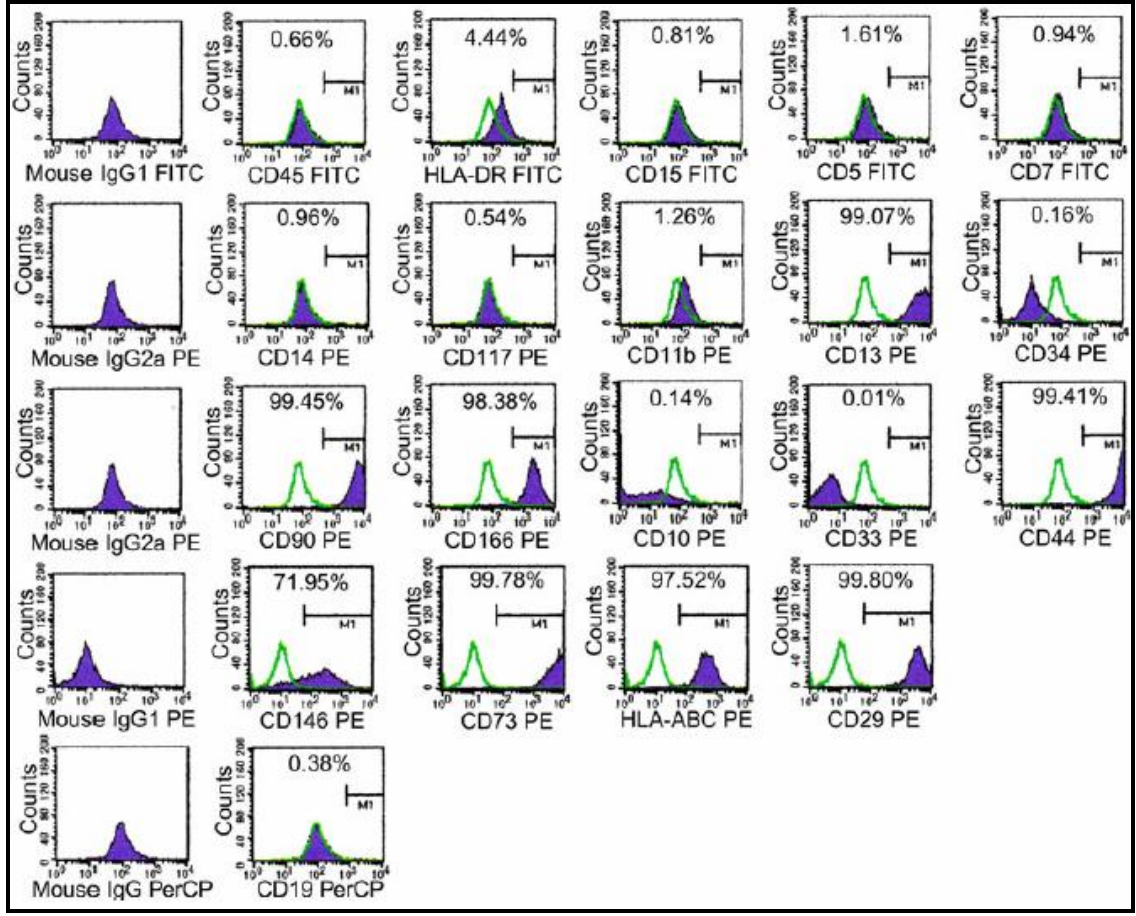
**Şekil 7.** Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi ve çoğaltılması. Şekilde, inkübasyon süreci en kısa olan (Hasta-1), en uzun olan (Hasta-3) ve iki uç arasında yer alan örneklerden bir tanesi (Hasta-2) gösterilmektedir.



**Şekil 8.** Elde edilen trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücreler ve insan tonsil dokusu için yapılan floresan-immünohistokimyasal analiz. Analiz edilen hücreler STRO-1, CD73 ve CD105 için (+) (yeşil renkli boyanma); CD34, CD45 ve CD144 için (-) reaksiyon verdi. Tüm gruplar hücre nükleuslarının görselleştirilebilmesi amacıyla, bir nükleik asit boyası olan DAPI ile zıt boyamaya tabi tutuldu. A-F bar: 30 µm, G-İ bar: 25 µm.

#### 4.3. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometri ile Karakterizasyonu

Flow sitometri genellikle mezenkimal kök hücre ve hematopoetik hücre belirteçleri için kullanılır. Flow sitometri analizi, elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterini detaylı olarak ortaya koymuştur (Şekil 9). İzole edilen mezenkimal kök hücreler CD5, CD7, CD10, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR'ye kuvvetli negatif; CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD146, CD166 ve HLA-ABC'ye ise kuvvetli pozitif cevap verdi.



Şekil 9. İzole edilen hücrelerin flow sitometri analizi sonuçları

#### 4.4. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Değişim Potansiyelinin Analizi

İzole edilen mezenkimal kök hücrelerin in vitro adipojenik, osteojenik ve kondrojenik değişim potansiyelleri incelendi (Şekil 10).

Adipogenez, kültürlerin 14. gününde histolojik olarak Oil Red O boyaması (Şekil 10A) ve kültüre edilen hücrelerde mRNA düzeyinde lipoprotein lipaz (LPL) ifadesinin varlığı (Şekil 10B) ile gösterildi.

Mono tabaka kültürlerde 5. pasaj hücreler 14 gün boyunca adipogenezi uyaran (AS) besi yeri ile beslendiğinde, hücrelerdeki lipid damlalarının Oil Red O ile pozitif boyandığı (Şekil 10A) ve bazal besi yeri ile beslenen hücrelerle karşılaştırıldığında bu hücrelerde lipoprotein lipaz (LPL) mRNA seviyesinin artmış olduğu görüldü (Şekil 10B).

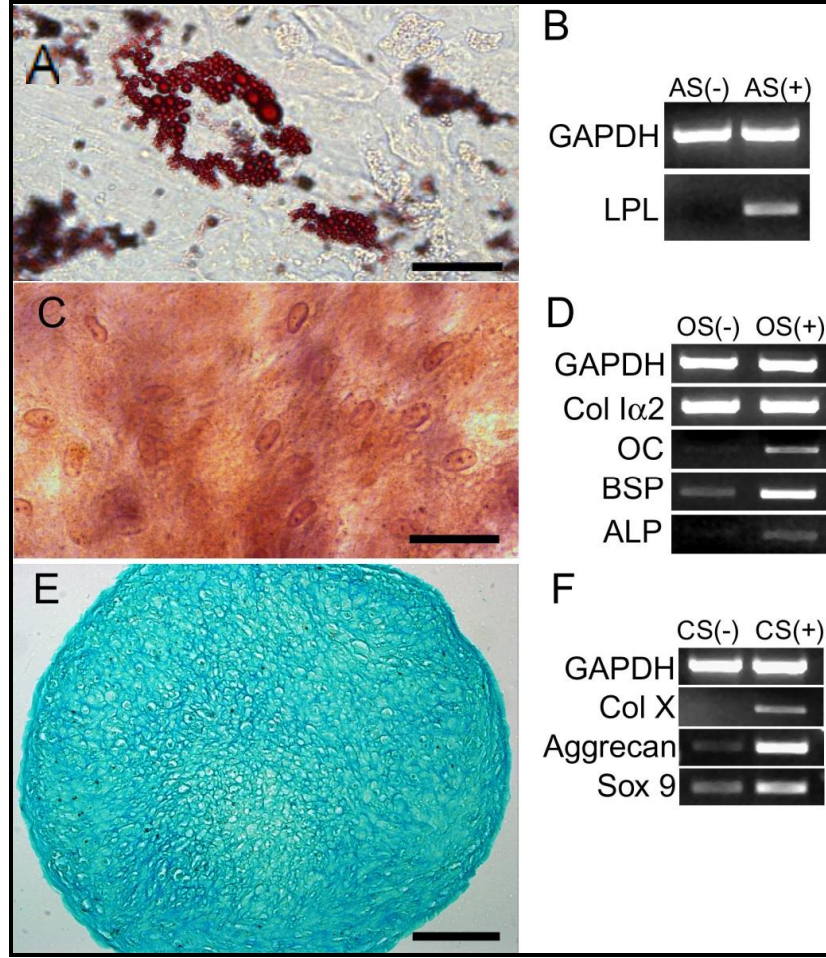
Osteogenez, kültürlerin 21. gününde histolojik olarak Alizarin Red boyaması (Şekil 10C) ve kültüre edilen hücrelerde mRNA düzeyinde osteokalsin (OC), kemik sialoprotein (BSP), alkalen fosfataz (ALP) ifadelerindeki artış ve tip I kollajen (Col I $\alpha$ 2) ifadesinin varlığı (Şekil 10D) ile gösterildi.

Monotabaka kültürlerde 5. pasaj hücreler 21 gün boyunca osteogenezi uyaran (OS) besi yeri ile beslendiğinde, hücrelerin Alizarin Red S ile pozitif boyandığı (Şekil 10C) ve bazal besi yeri ile beslenen hücrelerle karşılaştırıldığında bu hücrelerde osteokalsin (OC), kemik sialoprotein (BSP) ve alkalen fosfataz (ALP) mRNA seviyelerinin artmış olduğu görüldü. Tip I kollajen (Col I $\alpha$ 2) mRNA seviyesi bu iki grupta birbirine yakındır (Şekil 10D).

Kondrogenez, histolojik olarak kondrositlerden sentezlenen ekstraselüler matrisin glikoprotein içeriğinin Alsiyan mavisi ile boyanması (Şekil 10E) ve elde edilen kondrojenik kültürlerde mRNA düzeyinde tip X kollajen (Col X), aggrecan ve Sox 9 ifadelerindeki artış (Şekil 10F) ile gösterildi.

21 gün boyunca TGF- $\beta$ 1 uyarısı altında gerçekleştirilen kondrojenik değişim sonrasında 3. pasaj hücrelerin, Alsiyan mavisi ile pozitif boyandığı (Şekil 10E) ve bu hücrelerde tip II kollajen (Col II), tip X kollajen (Col X), aggrecan ve Sox 9 mRNA seviyelerinin arttığı görüldü (Şekil 10F).



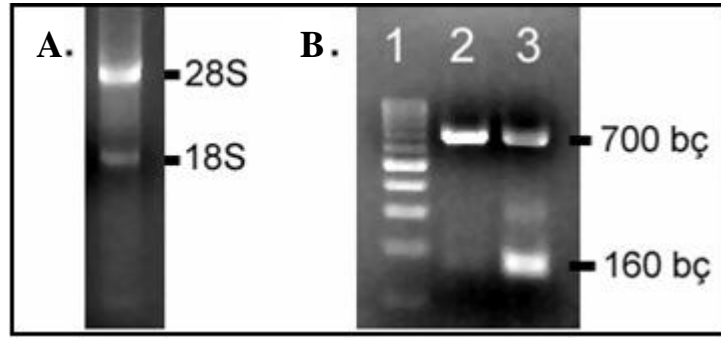


**Şekil 10.** MKH'lerin değişim potansiyelinin gösterilmesi. (A-B) Adipojenik değişimin gösterilmesi. Oil Red O boyası (A), ve LPL mRNA artışının (B) gösterilmesi, A paneli için bar = 30  $\mu$ m; AS(-), adipojenik uyarıcı yok; AS(+), adipojenik uyarıcı var. (C-D) Osteojenik değişimin gösterilmesi. Alizarin Red boyası (C), ve Col I $\alpha$ 2 ifadesi ile OC, BSP ve ALP mRNA artışının (D) gösterilmesi, C paneli için bar = 50  $\mu$ m; OS(-), osteojenik uyarıcı yok; OS(+), osteojenik uyarıcı var. (E-F) Kondrojenik değişimin gösterilmesi. Alsiyan mavisi boyası (E) ve Col X, Aggrecan ve Sox 9 mRNA artışının (F) gösterilmesi, E paneli için bar = 250  $\mu$ m; CS(-), kondrojenik uyarıcı yok; CS(+), kondrojenik uyarıcı var.

#### 4.5. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinde CNP ve NPR-B İfadelerinin RT-PCR ile Analizi

CNP ve NPR-B mRNA'larının trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerinde ifade profili RT-PCR ile incelendi.

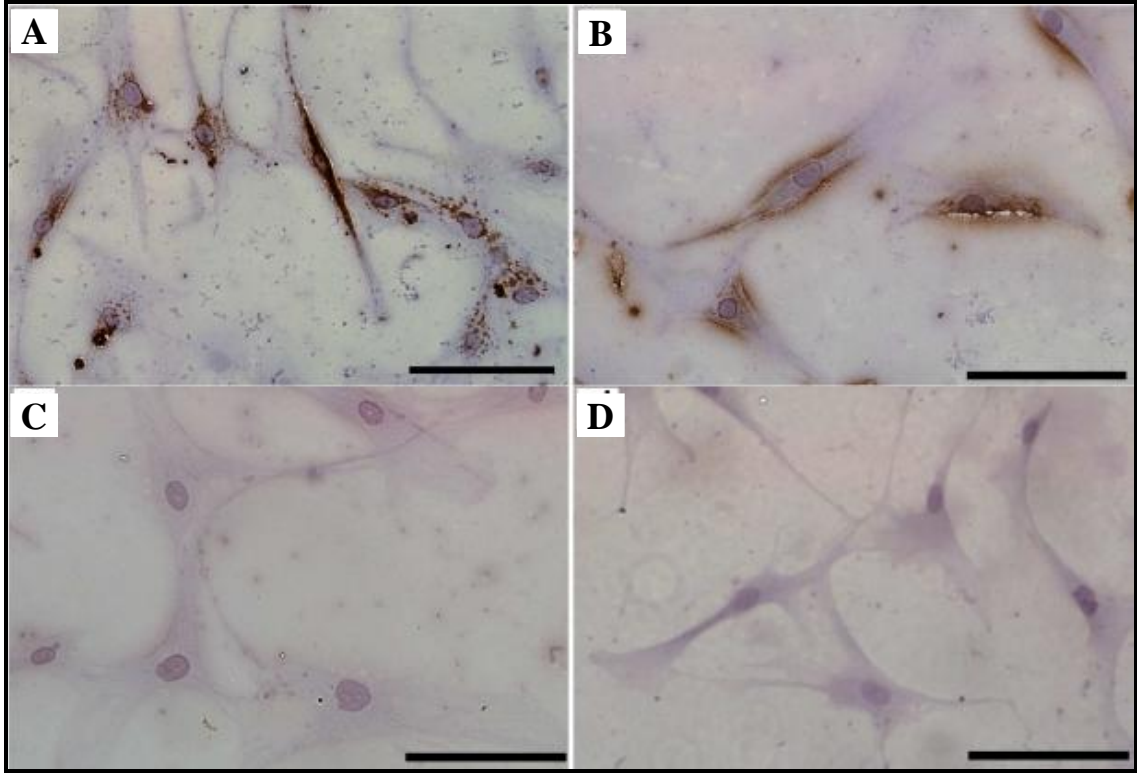
RT-PCR analizi sonuçları, mezenkimal kök hücrelerin herhangi bir değişime uğramamış konumda iken, CNP'nin, hücre yüzey reseptörü olarak görev yapan NPR-B'yi mRNA düzeyinde kuvvetle ifade ettiğini, bu ifade kadar güçlü olmamakla beraber, hücreden sekrete edilerek atılan bir protein olduğu bilinen CNP'nin de yine aynı hücrelerde mRNA düzeyinde ifadesinin tespit edilebilir olduğunu göstermektedir (Şekil 11B).



**Şekil 11.** İnsan trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücrelerinde CNP ve NPR-B ifadelerinin RT-PCR analizi (A) TRI-Reagent kullanılarak elde edilen total RNA'nın 28S ve 18S bantlarının %2'lik agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyaması sonrası görüntüleri. (B) Reaksiyon başına 1 µg total RNA kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR sonuçları. 1. Sütun: belirteç; 2. Sütun: 702 bç'lik ürün GAPDH, 162 bç'lik ürün CNP; 3. Sütun: 702 bç'lik ürün GAPDH, 155 bç'lik ürün NPR-B. Bu reaksiyonlarda kontrol geni olarak GAPDH kullanılmış olup, reaksiyonlar multipleks olarak dizayn edildi.

#### 4.6. Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinde CNP ve NPR-B İfadelerinin İmmünohistokimyasal Analizi

İzole edilen mezenkimal kök hücrelerde CNP ve NPR-B'nin protein düzeyinde varlıklarının gösterilmesine yönelik gerçekleştirilen immünohistokimyasal analiz ile elde edilen sonuçlar, CNP'nin sekresyona uğrayan bir protein ile uyumlu olarak daha çok sitoplazma ve çekirdek çevresinde yoğunlaşan granüler tarz bir pozitiflik gösterdiğini (Şekil 12A), diğer taraftan NPR-B'nin ise bu ligantın reseptörü olarak hücre zarında lokalize olduğunu (Şekil 12B) göstermektedir.

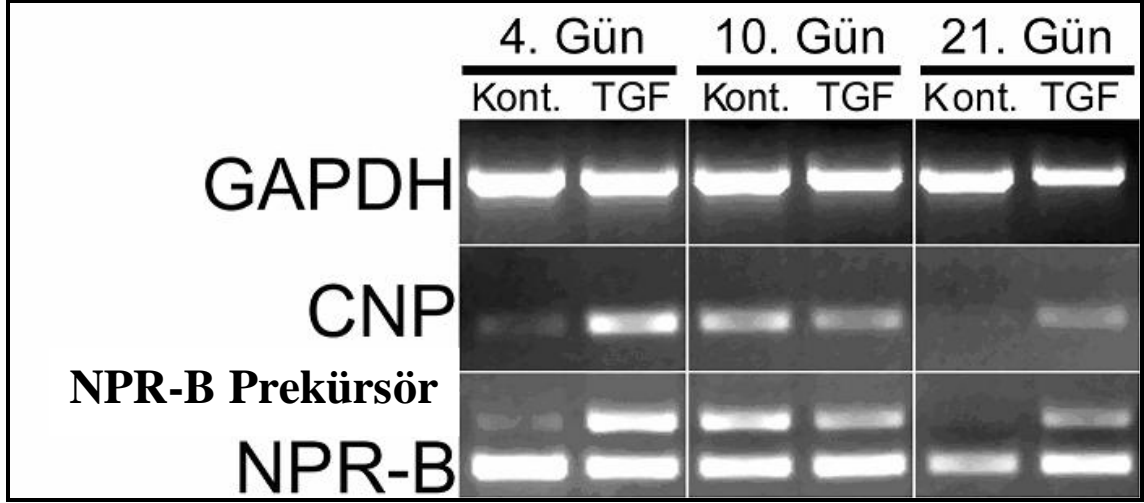


**Şekil 12.** MKH'lerde CNP ve NPR-B'nin immünohistokimyasal analizi. A) CNP, B) NPR-B için (+) boyanmaları göstermektedir. C-D) Her iki protein için de primer antikor basamağı atlanarak gerçekleştirilen (-) kontrol boyamalarını göstermektedir. Siyah bar = 100  $\mu$ m.

#### **4.7. CNP ve NPR-B İfadelerinin Mezenkimal Kök Hücrelerin TGF- $\beta$ 1 ile Uyarılmış Kondrojenik Değişimi Sürecindeki Analizi**

RT-PCR analizi sonuçlarına göre, 4. günde, TGF- $\beta$ 1 uyarısı altındaki kondrojenik kültürlerde gerek CNP mRNA ifadesinde, gerekse NPR-B prekürsör RNA ifadesinde kontrol grubu kültürlerine göre belirgin bir artış görüldü. 10. günde, her iki grup arasında bahsi geçen RNA'lar yönünden belirgin bir farklılık görülmedi. 21. günde, yine TGF- $\beta$ 1 uyarısı altındaki kondrojenik kültürlerde gerek CNP mRNA ifadesinde, gerekse NPR-B prekürsör RNA ifadesinde kontrol grubu kültürlerine göre belirgin bir artış görüldü (Şekil 13).

Elde edilen sonuçlar, CNP/NPR-B sinyal yolunun mezenkimal kök hücrelerin TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimleri sürecinde, erken ve geç olmak üzere iki ayrı dönemde kontrol grubuna oranla daha etkin olduğunu düşündürmektedir.



**Şekil 13.** RT-PCR sonuçlarına ilişkin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Bu deneylerde GAPDH kontrol referans geni olarak kullanıldı.

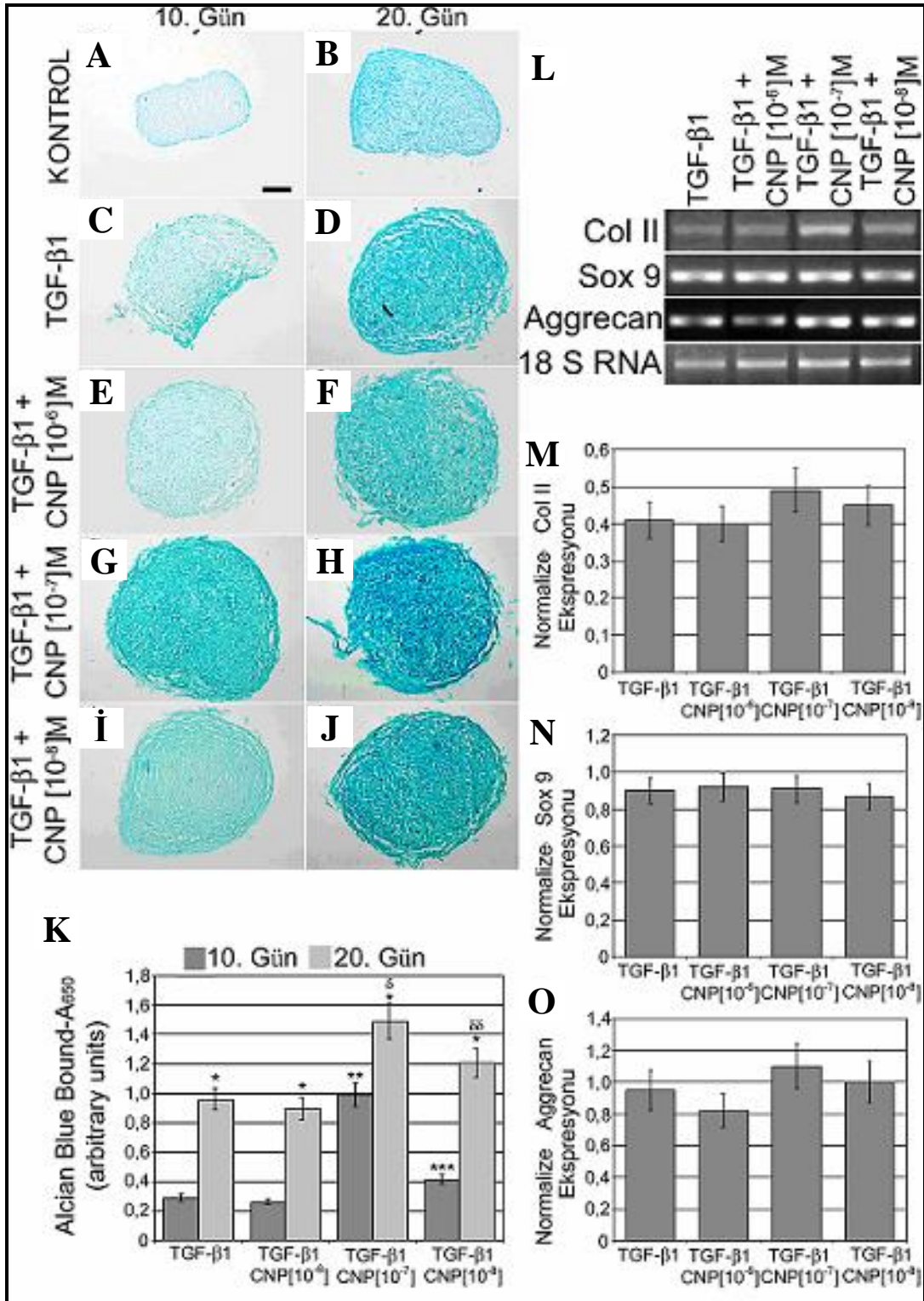
#### **4.8. Mezenkimal Kök Hücrelerin TGF- $\beta$ 1 ile Uyarılmış Kondrojenik Değişimi Sürecinde CNP'nin Konsantrasyona Bağımlı Etkisinin Analizi**

Mezenkimal kök hücrelerin TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimleri sürecinde, CNP'nin glikozaminoglikan sentezi üzerine olan konsantrasyona bağımlı etkisinin, Alsiyan mavisi boyamasına dayalı analizinin yanı sıra bu verilerin istatistiksel analizi gerçekleştirildi. Ayrıca, CNP'nin kondrojenik belirteçler olarak kabul edilen tip II kollajen, Sox 9 ve aggrecan mRNA ifadeleri üzerine etkisi incelendi.

Tüm gruplar 10. ve 20. günlerde Alsiyan mavisi boyaması yapılarak kıyaslandığında, 20. günlerde Alsiyan mavisi boya tutma kapasitesinin daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 14A-J).

İnsan mezenkimal kök hücrelerinin TGF- $\beta$ 1'e ek olarak  $10^{-7}$ M CNP ile uyarılmasında, inkübasyonun 10. günündeki sadece TGF- $\beta$ 1 verilen gruba göre Alsiyan mavisi boyanmasının daha fazla olduğu görüldü (Şekil 14G). İnkübasyonun 20. günündeki sonuçların da benzer olması bu bulguyu kuvvetlendirdi (Şekil 14H). Alsiyan mavisi boyanmasındaki bu pozitif etki, sadece TGF- $\beta$ 1 bulunan grupla karşılaştırıldığında, TGF- $\beta$ 1'e  $10^{-8}$ M CNP eklendiğinde de görüldü (Şekil 14I, J). İlginç olarak, CNP'nin Alsiyan mavisi boyanmasındaki bu uyarıcı etkisi, TGF- $\beta$ 1'e  $10^{-6}$ M CNP eklendiğinde azaldı. TGF- $\beta$ 1 ilavesi ile uyarılan gruplardan  $10^{-6}$ M CNP proteini ilavesi ile elde edilen deney grubunda, diğer gruplar ile kıyaslandığında diskoid yapı daha fazla gözlemlenirken, Alsiyan mavisi tutma kapasitesinin daha az olduğu saptandı. Bu kültürdeki sonuçlar TGF- $\beta$ 1'in tek başına uygulandığı kültürlerle karşılaştırıldığında hemen hemen aynıdır (Şekil 14E, F).

Boyalı kültürlerin 6 M guanidin-HCl ile muamelesi sonrası söktürülen boyanın spektrofotometrik analizi, elde edilen verilerin istatistiksel olarak yorumlanmasını ve desteklenmesini sağladı (Şekil 14K). CNP'nin, kondrojenik belirteçler olarak kabul edilen tip II kollagen, Sox 9 ve aggrecan mRNA ifadeleri üzerine etkisinin RT-PCR ile analizi, bu ifadelerin CNP uyarısından etkilenmediğini gösterdi (Şekil 14L-O).



**Şekil 14.** MKH'lerin TGF-β1 ile uyarılmış kondrojenik değişimleri sürecinde CNP'nin konsantrasyona bağlı etkisinin analizi. (A-J) Kondrojenik kürelerin rutin histolojik takip ve kesit alma (5 µm) işlemlerini takiben Alsiyan mavisi ile boyanmış örnek görüntüleri. Bütün paneller için bar = 250 µm. (K-O) Karşılaştırmalı ifade seviyeleri grafikleri (\*: P<0.001, \*\*: P<0.001, \*\*\*: P<0.05, <sup>δ</sup>: P<0.001, <sup>δδ</sup>: P<0.01)

## **4.9. Tüm İnsan Genom Array Analizi**

### **4.9.1. Mikrodizin kalite kontrol analizi**

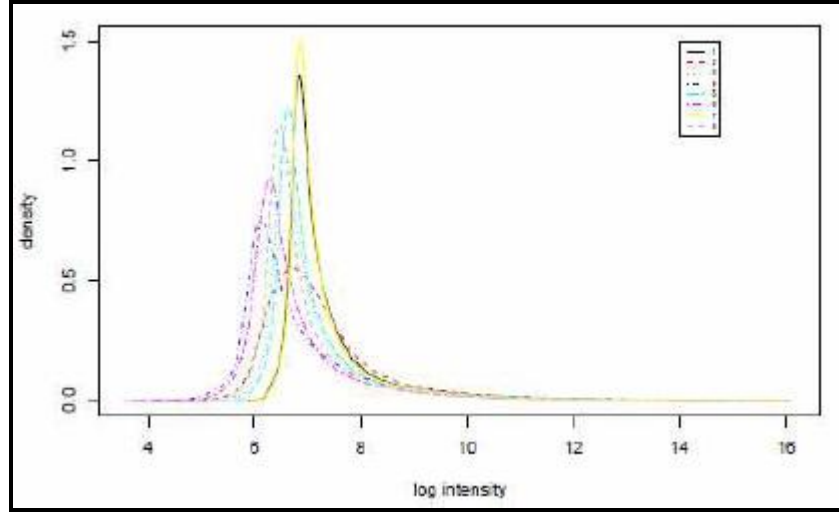
Mikrodizin analizi, kullanılan çiplerin kalite kontrolü ile başlar. Kalite kontrol analizi; deneyde kullanılan çiplerin üzerinde fiziksel bir hasar, kullanılan malzemelerde kullanım tarihi, saklama koşulları gibi olumsuzluklardan kaynaklanabilecek ve deney sonuçlarının yanlış yorumlanmasına neden olabilecek etkilerin bulunup bulunmadığını anlamaya yönelik bir analiz olarak tanımlanabilir.

Kalite kontrol analizinden geçen veri, sinyal gürültüsü ve deneysel koşulların yarattığı farklılıkların, örneklerin karşılaştırılmasında gerçek kanıtların önüne geçmemesini sağlamak amacıyla çeşitli istatistiksel ön işleme aşamalarından geçirilmektedir.

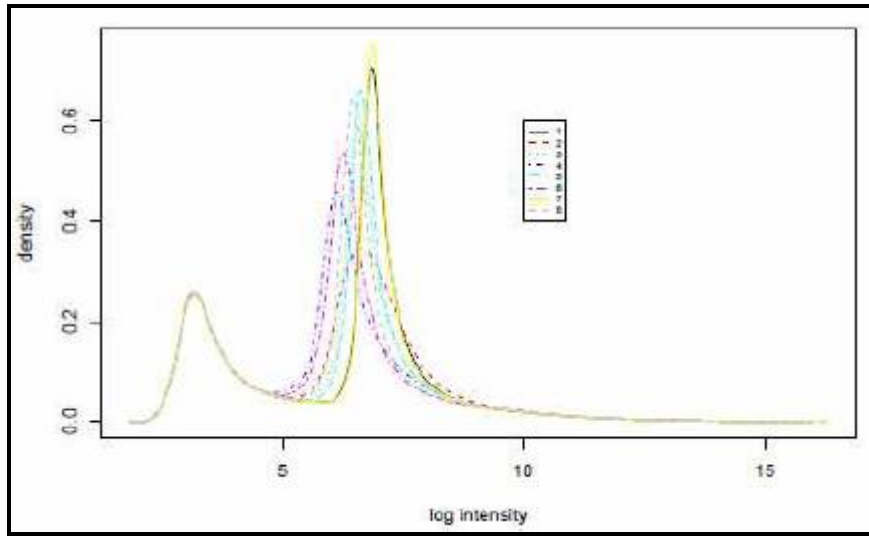
Aşağıda sonuçları verilen analizler, bu ön işleme aşamasının sağlıklı yürütülüp yürütülmediğini gözlemek amacıyla gerçekleştirildi. Bu sonuçlara göre, çiplerde analizlerin devamını etkileyecek olağandışı bir duruma rastlanmadı (Şekil 15-18).

### **4.9.2. Pozitif ve negatif sınır öğelerine ilişkin araştırmalar**

Afimetriks mikrodizinleri üzerinde, çipin doğru çalışıp çalışmadığını kontrol amaçlı pozitif ve negatif sınıf öğeleri bulunmaktadır. Bunlardan pozitif olanların ışıma vermesi, negatif olanların ise vermemesi beklenmektedir. Şekil 19'da her bir çip için bu öğelere ait ışıma verisinin kutu grafiği görülmektedir. Bu grafiklerden, sınır öğelerinin beklentiler doğrultusunda ışıma gösterdiği anlaşıldı.

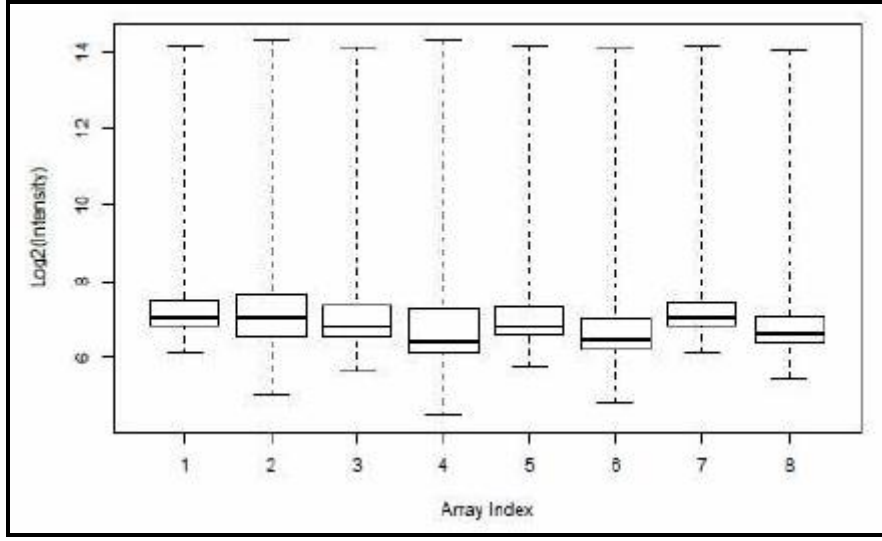


**Şekil 15.** Normalizasyon öncesi ışıma değerlerine ait histogram

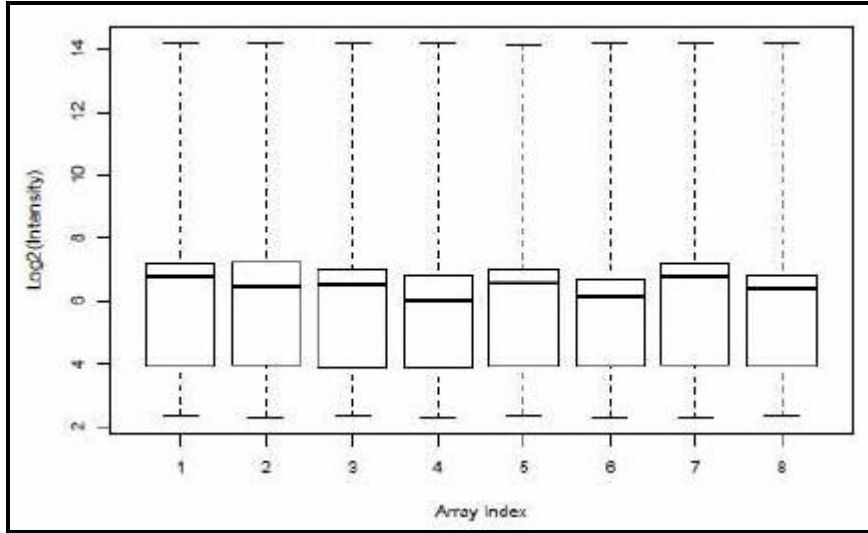


**Şekil 16.** Normalizasyon sonrası ışıma değerlerine ait histogram

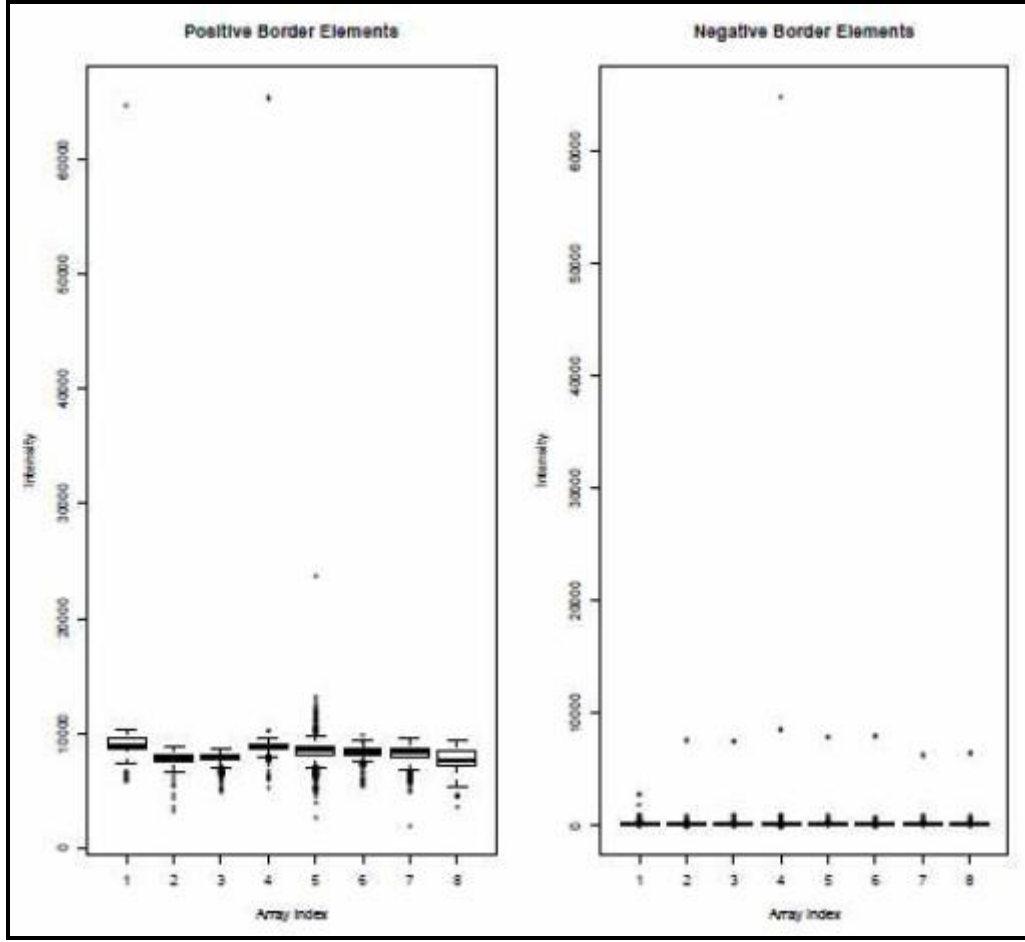




Şekil 17. Normalizasyon öncesi ışma değerlerine ait kutu grafiği



Şekil 18. Normalizasyon sonrası ışma değerlerine ait kutu grafiği



Şekil 19. Pozitif ve negatif sınır öğelerine ait kutu grafikleri

#### 4.9.3. Mikrodizin gen ifadesi kat değişimi analizi sonuçları

Tablo 4'te 9 farklı karşılaştırma grubu için, kat değişimine (fold change; fc) göre filtreleme sonucunda elde edilen gen sayıları sunulmuştur. Burada özellikle 20. gündeki TGF grubu ile TC grubu arasındaki karşılaştırma (**tgf20tc20**) dikkat çekici olup, TGF- $\beta$ 1 ve CNP muamelesi sonucunda, sadece TGF- $\beta$ 1 ile beslenen gruba oranla 8 adet gende 4 kat ve üzeri ifade değişimi olduğu saptandı. Bu genlerin listesi ve artış-azalış durumları Tablo 5'te sunulmuştur.

**Tablo 4.** Her bir örnek için 2,4 ve 8 kat değişim gösteren gen sayıları

Karşılaştırılan			
Gruplar	fc=2	fc=4	fc=8
cnp10cnp20	665	62	11
cnp10k10	4006	927	314
cnp20k20	4110	873	270
tc10tc20	1032	154	36
tc10k10	3991	1184	474
tc20k20	4945	1385	530
tgf10tgf20	1018	156	35
tgf10k10	3802	1187	473
tgf20k20	4294	1239	469
tc10cnp10	3432	868	304
tc10tgf10	76	2	-
tc20cnp20	4382	1186	454
tgf10cnp10	3191	843	308
tgf20cnp20	3543	1017	406
tgf20tc20	335	8	-

**Tablo 5.** 20. gündeki TGF-grubu ile TC-grubu arasındaki karşılaştırmaya ait 4 kat ve üzeri ifade değişimi gösteren genler

GEN ADI	GENBANK ACC. NO.	DEĞİŞİM DURUMU
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12	AF493879	-
LIM domain kinase 2	NM_005569	-
engulfment and cell motility 1	NM_014800	+
matrilin 3	NM_002381	+
CD24 molecule	M58664	+
DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (S. cerevisiae)	AW468880	+
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12	N32508	-
Ewing sarcoma breakpoint region 1	AW089574	-

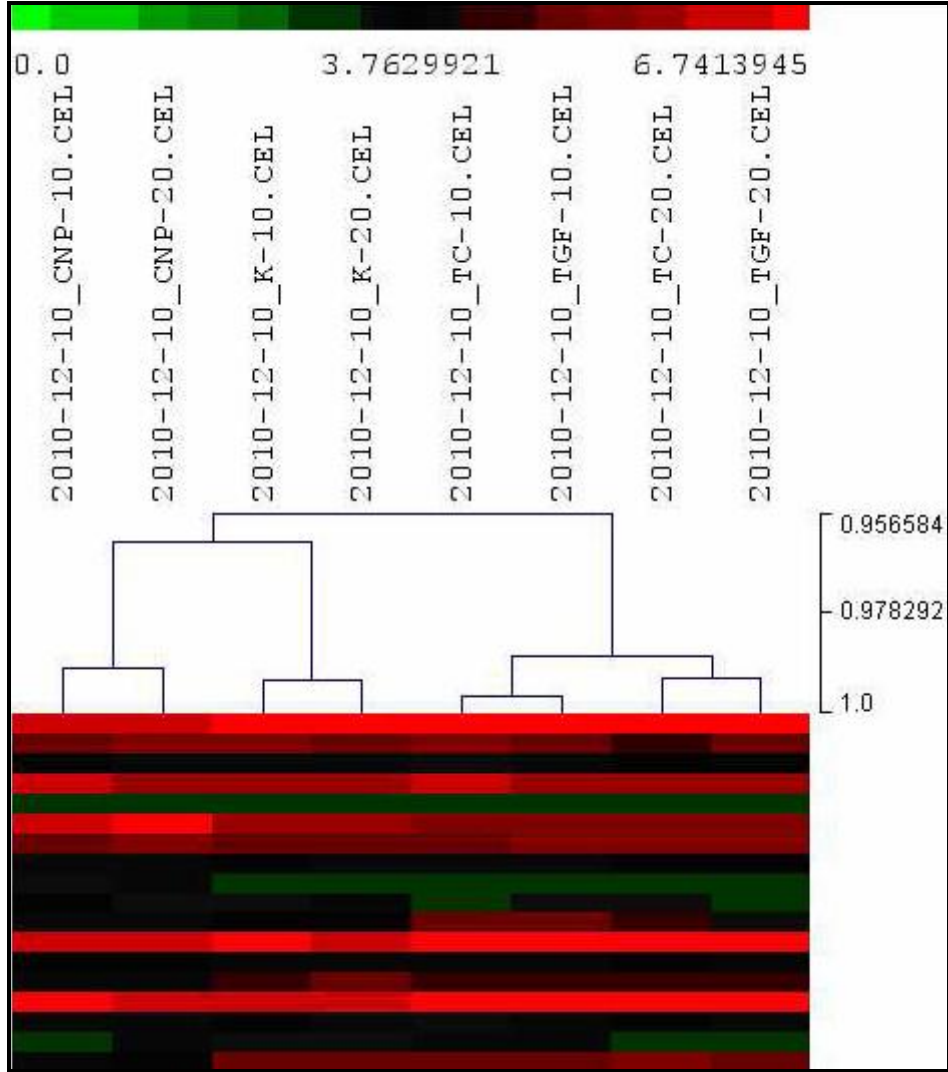
#### 4.9.4. Kümeleme analizi sonuçları

Mikrodizin örnekleri, ifade verisine göre hiyerarşik kümeleme yöntemiyle kümelendi. Çalışma grupları bazında bir kümeleme analizi gerçekleştirildi (Şekil 20). Işıma verisi elde edilmiş tüm genler üzerinden yapılan örnek kümeleme analizi sonucunda;

a) Kontrollerin (K-10 ve K-20), CNP-10 ve CNP-20 adlı örnekler ile

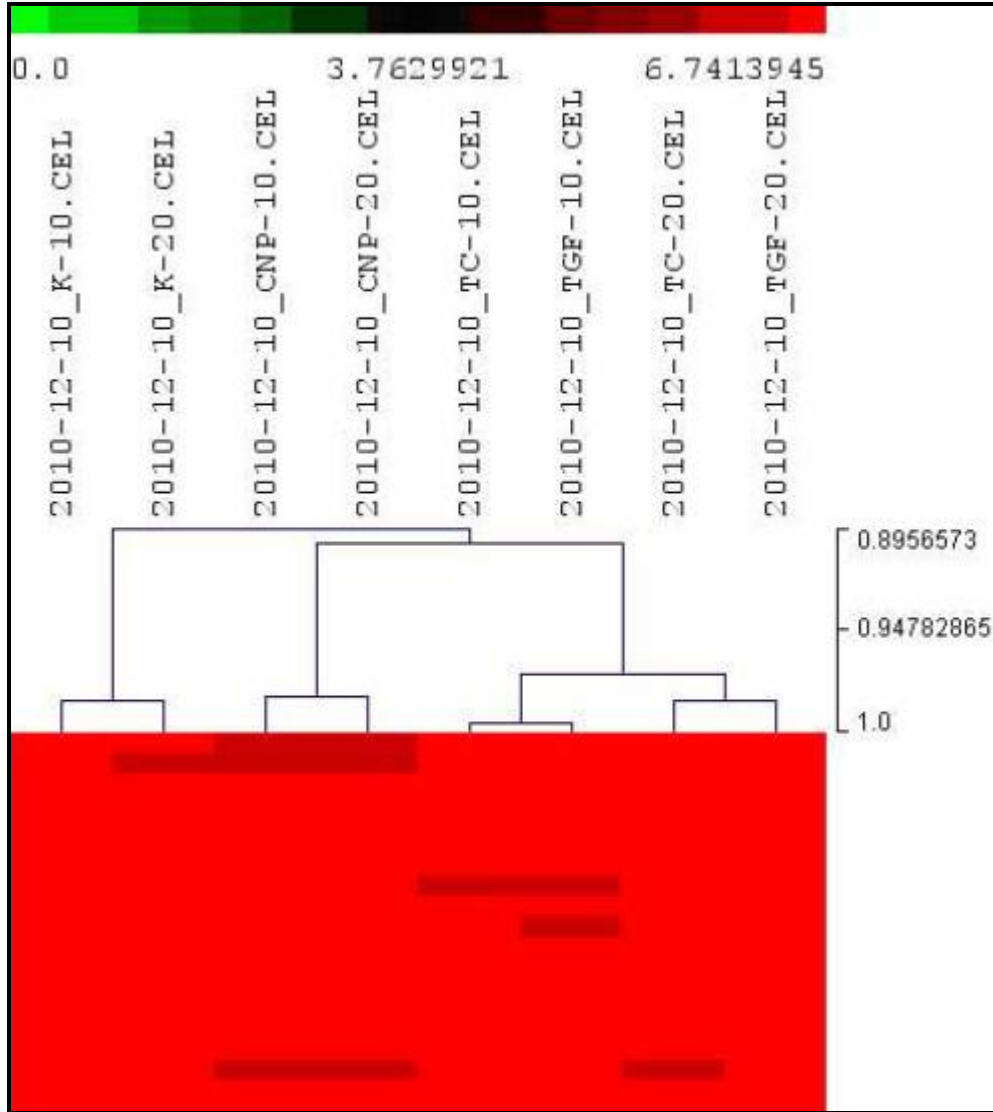
b) TC-10 ve TGF-10 adlı örneklerin bir arada, TC-20 ve TGF-20 adlı örneklerin diğer bir arada ancak dördünün yukarıda bahsi geçen K-10, K-20, CNP-10 ve CNP-20 grubundan farklı olarak bir araya kümelendiği olması dikkat çekicidir.

Şekil 18’de gösterilen normalizasyon sonrası ışıma değerlerine ait kutu grafiğinden yola çıkarak, yüksek ışıma gösteren genlerin sayısının az olduğu bilgisini kullanmak istediğimizde (sadece az sayıda olan ve deneyin özünü sunduğunu düşündüğümüz genleri kullandığımızda), kümeleme analizi ışıma değeri 6,0’ın üzerinde olan genleri içeren örnekler üzerinden tekrar gerçekleştirildi. Buradaki kümelene tüm genler üzerinden yapılan analizi desteklerken, yine örnekler kümesinin (TC-10, TGF-10, TC-20 ve TGF-20 grupları), kontrolleri içeren örneklerden (K-10, CNP-10, K-20 ve CNP-20 gruplarından) ayrı oluşu dikkat çekicidir (Şekil 21).



Şekil 20. (Filtresiz) Gen ifade verisine göre mikrodizin örneklerinin kümelmesini gösteren ağaç

- CNP-10 : CNP  $10^{-7}$  M grubu, 10. gün  
 CNP-20 : CNP  $10^{-7}$  M grubu, 20. gün  
 K-10 : Kontrol grubu, 10. gün  
 K-20 : Kontrol grubu, 20. gün  
 TC-10 : TGF- $\beta$ 1+CNP $10^{-7}$  M grubu, 10. gün  
 TGF-10 : TGF- $\beta$ 1 grubu, 10. gün  
 TC-20 : TGF- $\beta$ 1+CNP $10^{-7}$  M grubu, 20. gün  
 TGF-20 : TGF- $\beta$ 1 grubu, 20. gün



Şekil 21. Yüksek ifade veren genlerin kümelendiğini gösteren ağaç

- K-10 : Kontrol grubu, 10. gün  
K-20 : Kontrol grubu, 20. gün  
CNP-10 : CNP  $10^{-7}$  M grubu, 10. gün  
CNP-20 : CNP  $10^{-7}$  M grubu, 20. gün  
TC-10 : TGF- $\beta$ 1+CNP $10^{-7}$  M grubu, 10. gün  
TGF-10 : TGF- $\beta$ 1 grubu, 10. gün  
TC-20 : TGF- $\beta$ 1+CNP $10^{-7}$  M grubu, 20. gün  
TGF-20 : TGF- $\beta$ 1 grubu, 20. gün

## 5. TARTIŞMA

CNP/NPR-B sinyal yolu ve iskelet sistemi gelişimi üzerine etkileri, son on yılda giderek artan sayıda çalışmaya konu olmuştur (2, 4, 7, 11, 23, 36, 45, 46, 48, 54, 57, 61, 66, 77, 79, 82, 83). Literatürde konu ile ilgili in vitro çalışmaların büyük çoğunluğunda, primer kondrositler veya kondrojenik hücre dizinleri kullanılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen en önemli sonuçlardan birisi, kondrogenez sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolunun prekondrojenik mezenkimal yoğunlaşma ve glikozaminoglikan sentezi üzerine pozitif etki gösterdiği bilgisidir (4, 79). Bu gelişmelere paralel olarak kök hücre biyolojisi, son dönemde özellikle kas iskelet doku mühendisliği ve ortopedik cerrahi gibi alanlarda büyük önem kazanmıştır. Canlıdaki kemik iliği, trabeküler kemik veya kordon kanı gibi birçok doku, osteoblast, kondrosit, adiposit veya miyosit gibi birçok mezenkimal diziye farklılaşabilen, dar bir mikroçevreye ihtiyaç duyan hematopoetik olmayan öncül hücrelerden oluşan heterojen bir popülasyon içerir (72). Ancak, bu mezenkimal öncül hücrelerin (kök hücrelerin) kondrojenik değişimleri sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolunun olası rolü hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır. Dolayısı ile araştırmamızın hedefleri: öncelikle trabeküler kemikten mezenkimal kök hücrelerin eldesinin gerçekleştirilebileceği kolay bir primer kültür sistemi oluşturulması, bunu takiben bu hücrelerin planlanan çalışma için uygun mezenkimal kök hücre karakteri taşıdıklarının gösterilmesi, son aşamada ise CNP/NPR-B sinyal yolu komponentlerinin bu hücrelerdeki ifadelerinin ve mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik değişimleri sürecindeki olası rollerinin araştırılması olarak özetlenebilir.

Araştırmamızda kullandığımız Nöth et al. (2002) tarafından tarif edilmiş olan primer kültür sistemi (50), trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücreleri, ilk kültürlerin oluşturulmasından 2-4 hafta sonra kolay ve etkili bir şekilde elde etmemizi sağlamıştır. Bu eldenin sürecini etkileyen faktörlerin başında trabeküler kemik parçalarının alındığı donörlerin yaşı gelmektedir. Donör yaşı gençleştikçe süreç kısalmıştır.

Elde ettiğimiz hücreler, fibroblast benzeri görünümüleri ve plastik kültür kaplarına yapışma yeteneklerinin yanı sıra immünohistokimya ve flow sitometri ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, bu hücrelerin CD5, CD7, CD10, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117, CD144 ve HLA-DR yüzey belirleyicileri yönünden negatif, diğer taraftan STRO-1, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 ve HLA-ABC yüzey belirleyicileri yönünden ise yüksek derecede pozitif olduklarını göstermiştir. Bu sonuçlar elde edilen hücrelerin, immünofenotipik olarak mezenkimal kök hücre karakteri taşıdıklarını doğrulamaktadır. Bunun yanı sıra, elde edilen hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik değişim potansiyelleri de gösterilerek MKH'lerin tüm karakteristik özelliklerini taşıdıkları bir kez daha doğrulanmıştır (65).

Elde edilen insan MKH'lerin karakterizasyonu çalışmaları tamamlandıktan sonra in vitro kondrogeniz, bu hücrelerin TGF- $\beta$ 1 varlığında 3 boyutlu kültür sistemlerinden biri olan çökelti kültürde, kültüre edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çökelti kültür sistemlerinde kondrojenik değişimin takibi, tip II kollajen, tip X kollajen, Sox 9 ve aggrecan mRNA ifadelerinin yanı sıra kültürde salgılanan ekstrasellüler matriksin Alsiyan mavisi ile boyanmasının analizi ile gerçekleştirilmiştir.

CNP, kromozomal lokasyonu 2q24-qter olan Nppc adlı tek bir genin ürünüdür. Nppc promotor bölgesinin dizin analizi ve haritalanması, TGF- $\beta$ 'nın efektörü olarak bilinen bir transkripsiyon faktörü olan TSC22'nin bağlandığı bir bölgenin gösterilmesi ile sonuçlanmıştır (54). In vivo ve in vitro yapılan araştırmalarda, iskelet sistemi gelişimi ve bu süreçteki kondrogenizde TGF- $\beta$  ailesi üyelerinin anahtar sinyaller ve morforegülatör fonksiyonlar içerdiğini göstermiştir (23, 53, 58, 65). Tüm bu bilgiler ışığında CNP/NPR-B sinyal yolunun kondrogeniz sürecinde TGF- $\beta$  sinyal yolu tarafından düzenleniyor olabileceği düşünülmüştür. Kültüre edilen primer kondrositlerde TGF- $\beta$ 1 uyarısı altında CNP sekresyonu ve CNP mRNA düzeyinin belirgin artış göstermesi bu düşüncüyü desteklemiştir (23). Bu bilgi birikimine dayanarak araştırmamızda, CNP/NPR-B sinyal yolu komponentlerinin insan trabeküler



kemik kökenli mezenkimal kök hücrelerde endojen olarak ifade edilebileceği ve TGF- $\beta$ 1'in hedef efektörlerinden biri olabileceği düşünülmüştür.

Bulgularımıza göre mezenkimal kök hücrelerde CNP ifadesinin immünohistokimyasal analiz sonuçları, CNP'nin bu hücrelerden salgılanan bir protein olduğunu, diğer taraftan MKH'lerdeki NPR-B ekspresyonuna yönelik yapılan immünohistokimyasal analiz sonuçları ise, NPR-B'nin bu hücrelerde plazma membranında lokalize olduğunu ve CNP'nin reseptörü olduğunu göstermiştir. Bu ligand ve reseptörün mRNA düzeyinde ifadeleri ise RT-PCR ile gösterilmiştir.

Araştırmamızda insan trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücreler, çökelti kültürlerde TGF- $\beta$ 1 ile kondrojenik değişim yönünde uyarıldıklarında, gerek CNP mRNA'sının gerekse NPR-B prekürsör RNA'sının ifadelerinde belirgin bir artış meydana geldiği RT-PCR analizi ile gösterilmiştir. Bu artış, kondrojenik farklılaşmanın erken evresi olan inkübasyonun 4. gününde ve geç evresi olan inkübasyonun 21. gününde gözlenmiştir. İnkübasyonun 10. günündeki bu moleküllerin ifade düzeyleri, kontrol ve TGF- $\beta$ 1 içeren deney gruplarında benzer bulunmuştur. Sonuçlarımız, insan MKH'lerin TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolunun erken dönemde GAG sentezi, geç dönemde ise hipertrofi ve matürasyon üzerinde etkili olduğunu düşündürmüştür.

İnsan mezenkimal kök hücrelerinde CNP/NPR-B sinyalinin öne sürülen fonksiyonu, daha önce de mikro kütle kültür ortamlarında primer tavuk ekstremite tomurcuklarının kondrojenik farklılaşması sırasında gösterilmiştir (4). Yapılan bu araştırma, insan CNP molekülünün tavuk homoloğu olan CNP-3 ve reseptörü NPR-B'nin tavuk ekstremite tomurcuklarındaki mRNA ifadelerinin gelişim evrelerine özgü pik seviyeleri yaptığını göstermiştir. Bu dönemler, prekondrojenik mezenkimal yoğunlaşmaya karşılık gelen Hamburger-Hamilton evre 23-24 ile kondrojenik hipertrofi ve matürasyonun başladığı 30-31. evrelere denk gelmektedir. Ayrıca, kültürlerle yapılan CNP muamelesi, N-cadherin ve tip X kollajen ifadelerinin yanı sıra glikozaminoglikan sentezi ve kondrogenezi de anlamlı derecede arttırmıştır (4).

Bu bilgiler ışığında araştırmamız, insan mezenkimal kök hücrelerin TGF- $\beta$ 1 uyarısı altında kondrojenik değişimleri sürecinde CNP ile muamele edilmeleri sonucu ortaya çıkan değişiklikleri incelemek üzere planlanmıştır. Sonuçlarımız, bu süreçte CNP'nin değişime uğrayan kültürlerdeki Alsiyan mavisi tutulumunu konsantrasyona bağımlı olarak etkilediğini göstermiştir. TGF- $\beta$ 1 ile uyarılan kültür ortamlarına  $10^{-8}$ M ve  $10^{-7}$ M CNP ilavesi, konsantrasyona bağımlı ve konsantrasyonla doğru orantılı olarak Alsiyan mavisi tutulumunu arttırmıştır. Ancak CNP'nin benzer kültür ortamlarına  $10^{-6}$ M konsantrasyonda ilavesi ile bu etkinin ortadan kalktığı görülmüştür. Bu sonuçlar, CNP/NPR-B sinyal yolunun MKH'lerin TGF- $\beta$ 1 bağımlı kondrojenik değişimleri sürecinde glikozaminoglikan sentezi ile yakından ilişkili olduğu hipotezi ile uyumlu bulunmuştur. Bu noktadan hareket ile bir sonraki aşamada, CNP ilavesi ile kırkırdak glikozaminoglikan içeriğinin ana bileşeni olan aggrecan'ın ve kondrojenik belirteçlerden tip II kollajen ve Sox 9'un mRNA ifadesindeki olası değişiklikler RT-PCR ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, test edilen parametrelerde kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık ortaya koyamamıştır. Dolayısı ile CNP/NPR-B sinyal yolunun, kondrogeniz sürecinde glikozaminoglikan sentezi üzerine görülen ve Alsiyan mavisi tutulumu ile gösterilen etkisi, büyük olasılıkla aggrecan'ın transkripsiyonu aşamasında olmadığını düşündürmüştür.

Araştırmamız bulgularını destekleyen bir diğer araştırma Woods et al. (2007) tarafından gerçekleştirilmiştir (79). Bu araştırmada, fare embriyonik ekstremite tomurcuğu kökenli mezenkimal hücrelerin kondrojenik mikro kütle kültürlerinde CNP uygulamasının, kondrojenik yoğunlaşmayı ve N-cadherin ifadesini arttırdığı, glikozaminoglikan sentezini uyardığı, ancak kondrojenik transkripsiyon faktörlerinden Sox 9, 5 ve 6'nın ve ekstraselüler matris bileşenlerinden tip II kollajen ve aggrecan'ın ifadelerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada kondrojenik kültürlerde CNP uyarısı altında gerçekleşen Alsiyan mavisi tutulum artışının, büyük olasılıkla glikozaminoglikanların sentezi ve yan zincirlerinin sülfatlanması aşamalarında rol oynayan ksiloziltransferaz-I ve sülfotransferaz enzimlerinin aktivitelerinde ortaya çıkan artıştan kaynaklandığı gösterilmiştir (79).

Alan ve Tufan (2008) tarafından yayınlanmış bir diğerk çalışmada ise tavuk embriyosu ekstremite tomurcuğu kökenli mezenkimal hücrelerin kondrojenik mikro kütle kültürlerinde CNP uyarısının prekondrojenik yoğunlaşmayı ve glikozaminoglikan sentezini arttırdığı gösterilmiştir (4). Komatsu (2002) tarafından gerçekleştirilen ve CNP knockout farelerde yapılan bir araştırmada, kondrositlerin geç dönem hipertrofi ve matürasyon hızlarında yavaşlama görüldüğü bildirilmiştir. Bu araştırma yukarıda bahsi geçen in vitro çalışmaları destekler nitelikte bir in vivo çalışmadır (37).

Araştırmamızın son aşamasında gerçekleştirilen tüm insan genom array analizi sonuçları, CNP/NPR-B sinyal yolunun glikozaminoglikan sentezi üzerine olan pozitif etkileri ile ilgili sonuçlarımızı destekler nitelikte olup, özellikle ileriki çalışmalarda bu sinyal yolu ile olan etkileşimlerin incelenmesi yönünden ‘‘matrilin-3’’ molekülünü ne çıkarmaktadır. Yine array sonuçları, CNP/NPR-B sinyal yolunun tek başına mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik değişimlerini sağlamaya yeterli olmadığını düşündürmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamız, öncelikle kırık doku mühendisliği yaklaşımlarında trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücrelerin eldesinde referans olarak kullanılacak pratik bir primer hücre kültür yöntemini tanımlamıştır. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik değişimleri sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolunun rolü analiz edilmiştir. Sonuçlar, mezenkimal kök hücrelerin TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolunun glikozaminoglikan sentezi ile ilişkili olabileceğini ve bu etkinin konsantrasyona bağımlı olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, CNP/NPR-B sinyal yolu ile ilgili primer kondrositlerde elde edilmiş önceki literatür bulguları ile mezenkimal kök hücrelerden elde edilen bulguların fonksiyonel açıdan da uyum gösterdiğini ortaya koymuştur.

Doku mühendisliği ve kök hücre biyolojisi alanında bu sinyal yolunun daha iyi anlaşılabilmesi için bu tip çalışmaların sayısının artmasına ihtiyaç vardır. Her şeye rağmen, elde edilen sonuçlar mezenkimal kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilecek doku mühendisliği çalışmalarına katkı sağlayacak ve mezenkimal kök hücrelerin doku iskeleleri ile ilişkilerini geliştirecek düzeydedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abou-Samra A.B., Juppner H., Force T., Freeman M.W., Kong X.F., 1992, Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 2732-2736 p.
2. Agoston H., Khan S., James C. G., Gillespie J. R., Sera R., Stanton L., Beier F., 2007, C-type natriuretic peptide regulates endochondral bone growth through p38 MAP kinase-dependent and independent pathways, *BioMed Central Developmental Biology*, 7, 1-23 p.
3. Ahrens P.B., Solursh M., Reiter R.S., 1977, Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture, *Dev Biol*, 60, 69-82 p.
4. Alan T. and Tufan A. Ç., 2008, C-type natriuretic peptide regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin and collagen type X-related functions, *Journal of Cellular Biochemistry*, 105, 227-235 p.
5. Baksh D., Song L., Tuan R. S., 2004, Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy, *Stem Cell Review Series*, 8, 301-316 p.
6. Ballock R. T. and Reddi A. H., 1994, Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium, *J Cell Biol*, 126, 1311-1318 p.
7. Bartels C. F., Bükülmez H., Padayatti P., Rhee D. K., Ravenswaaij-Arts C., Pauli R. M., Mundlos S., Chitayat D., Shih L., Al-Gazali L. I., Kant S., Cole T., Morton J., Cormier-Daire V., Faivre L., Lees M., Kirk J., Mortier G. R., Leroy J., Zabel B., Kim C. A., Crow Y., Braverman N. E., Akker F., Warman M. L., 2004, Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux, *The American Society of Human Genetics*, 75, 27-34 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

8. Cameron S.J., Gren G.B., White C.N., Laterza O.F., Clarke W., Kim H., Sokoll L.J., 2006, Assessment of BNP and NT-proBNP in emergency department patients presenting with suspected acute coronary syndromes, *Clin Biochem*, 39, 11-18 p.
9. Chen ZX, Chang M, Peng YL, Zhao L, Zhan YR, Wang LJ, Wang R., 2007, Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes: *Regul Pept.*, 142(1-2), 16-23 p.
10. Chikuda H., Kugimiya F., Hoshi K., et al., 2004, Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes, *Genes & Development*, 18, 2418-2429 p.
11. Chusho H., Tamura N., Ogawa Y., Yasoda A., Suda M., Miyazawa T., Nakamura K., Nakao K., Kurihara T., Komatsu Y., Itoh H., Tanaka K., Saito Y., Katsuki M., Nakao K., 2001, Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 4016-4021 p.
12. Cserjesi P., 1995, A basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis, *Development*, 121, 1099-1110 p.
13. Daumer K.M., Tufan A.C., Tuan R.S., 2004, Long-term in vitro analysis of limb cartilage development: Involvement of Wnt signaling, *J Cell Biochem*, 93, 526-541 p.
14. De Bold A.J. and De Bold M.L., 2005, Determinants of natriuretic peptide production by the heart: basic and clinical implications, *J Investig Med*, 53, 371-377 p.
15. Delise A.M., Fischer L., Tuan R.S., 2000, Cellular interactions and signaling in cartilage development, *J Osteoarthritis Cartilage*, 8, 309-334 p.
16. Deng C., Wynshaw-Boris A., Zhou F., Kuo A., Leder P., 1996, Fibroblast growth factor receptor-3 is a negative regulator of bone growth, *Cell*, 84, 911-921 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

17. Eerden B. C. J., Karperien M., Wit J. M., 2003, Systemic and local regulation of the growth plate, The Endocrine Society, U.S.A., 24(6), 782-801 p.
18. Ellmers L.J., Scott N.J., Piihola J., Maeda N., Simithies O., Frampton C.M., Richards A.M., Cameron V.A., 2007, Npr1-regulated gene pathways contributing to cardiac hypertrophy and fibrosis, J Mol Endocrinol, 38, 245-257 p.
19. Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro II., Petrakova K.V., 1966, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, J Embryol Exp Morphol, 16, 381-390 p.
20. Gilbert S. F., Developmental Biology, 2001, Sunderland, MA, Sinauer, 6th ed.
21. Goodrich L.V., Johnson R.L., Milenkovic L., McMahon J.A., Scott M.P., 1996, Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog, Genes Dev, 10, 301-312 p.
22. Gregory C.A., Prockop D.J., Spees J.L., 2005, Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation, Exp Cell Res, 306, 330-335 p.
23. Hagiwara H., Sakaguchi H., Itakura M., Yoshimoto T., Furuya M., Tanaka S., Hirose S., 1994, Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor-B, J Biol Chem, 269, 10729-10733 p.
24. Haliloğlu M., Özen H., Koçak N., Ünsal M., 1999, Acromesomelic dysplasia associated with mild lumbar spine stenosis, European Radiology, 9, 103-104 p.
25. Hall B. K. and Miyake T., 1995, Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited, Int J Dev Biol, 39, 881-893 p.
26. Hall B. K. and Miyake T., 2000, All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development, Bioessays, 22, 138-147 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

27. Hickok N. J., Haas A. R., Tuan R. S., 1998, Regulation of chondrocyte differentiation and maturation, *Microsc Res Tech* 43,174-190 p.
28. [http:// www.closerlookatstemcells.org](http://www.closerlookatstemcells.org), (2011-28-01)
29. [http:// www.celltherapysociety.org](http://www.celltherapysociety.org), (2010-6-12)
30. [http:// www.sciencegateway.org](http://www.sciencegateway.org), (2010-19-10)
31. Ianakiev P., Kilpatrick M. W., Daly M. J., Zolindaki A., Bagley D., Beighton G., Beighton P., Tsipouras P., 2000, Localization of an acromesomelic dysplasia on chromosome 9 by homozygosity mapping, *Clinical Genetics*, Munksgaard, 57, 278-283 p.
32. Iida-Klein A., Varlotta V., Hahn T.J., 1989, Protein kinase C activity in UMR-106-01 cells: effects of parathyroid hormone and insulin, *J Bone Miner Res*, 4, 767-774 p.
33. Junqueira L. C. and Carneiro J., *Temel histoloji*, 2006, (Çev: Aytekin Y. ve Solakoğlu S.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
34. Kant S. G., Polinkovsky A., Mundlos S., Zabel B., Thomeer R. T. W. M., Zonderland H. M., Shih L., Haeringen A., Warman M. L., 1998, Acromesomelic dysplasia maroteaux type maps to human chromosome 9, *The American Society of Human Genetics*, 63, 155-162 p.
35. Kaplan S. L. and Grunbach M. M., 1990, Pathophysiology and treatment of sexual precocity, *J Clin Endocrinol Metab*, 71, 785-789 p.



## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

36. Kierszenbaum A. L., Histoloji ve Hücre Biyolojisi, 2006 (Çev.: Demir R.), Palme Yayıncılık, Ankara
37. Komatsu Y., Chusko H., Tamura N., Yasoda A., Miyazawa T., Suda M., Miura M., Ogawa Y., Nakao K., 2002, Significance of C-type natriuratic peptide (CNP) in endochondral ossification: analysis of CNP knockout mice, J Bone Miner Metab, 20, 331-336 p.
38. Lee K., Deeds J.D., Segre G.V., 1995, Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats, Endocrinology, 136, 453-463 p.
39. Lev R. and Spicer S., 1964, Specific staining of sulfated groups with Alcian blue at low pH, J Histochem Cytochem, 12, 309 p.
40. Li Z. and Li L., 2006, Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments, Trends Biochem Sci., 31(10), 589-595 p.
41. Lincoln T. M. and Cornwell T. L., 1993, Intracellular cyclic GMP receptor proteins, The FASEB Journal, 7, 328-338 p.
42. Loder R.T., Wittenberg B., Silva G., 1995, Slipped capital femoral epiphysis associated with endocrine disorders, J Pediatr Orthop, 15, 349-356 p.
43. Maroteaux P., Martinelli B., Campailla E., 1971, Acromesomelic dwarfism, Presse Med, 79, 1839-1842 p.
44. Mello M. A. and Tuan R. S., 1999, High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: An in vitro model of endochondral skeletal development, In Vitro Cell Dev Biol Anim, 35, 262-269 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

45. Mericq V., Uyeda J. A., Barnes K. M., De Luca F., Baron J., 2000, Regulation of fetal rat bone growth by C-type natriuretic peptide and cGMP, *Pediatr Res*, 47, 189-193 p.
46. Mete G., 2009, Sıçanlarda kronik travmatik diz osteoartriti modelinde mezenkimal kök hücre tedavisi (deneysel çalışma), Uzmanlık Tezi, İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, 51 s.
47. Miyazawa T., Ogawa Y., Chusho H., Yasoda A., Tamura N., Komatsu Y., Pfeifer A., Hofmann F., Nakao K., 2002, Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification, *Endocrinology*, 143, 3604-3610 p.
48. Moffatt P., Thomas G., Sellin K., Bessette M., Lafrenie`re F., Akhouayri O., St-Arnaud R. Lancto C., 2007, Osteocrin is a specific ligand of the natriuretic peptide clearance receptor that modulates bone growth, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 282, 36454-36462 p.
49. Moore K. L., Persaud T. V. N., İnsan Embriyolojisi, 2002, (Çev.: Yıldırım M., Okar İ., Dalçık H.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
50. Nöth U., Osyczka A. M., Tuli R., Hickok N.J., Danielson K.G., Tuan R.S., 2002, Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells, *J Orthop Res*, 20, 1060-1069 p.
51. Oberlender S. A. and Tuan R. S., 1994, Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis, *Development*, 120, 177-187 p.
52. Oberlender S. A. and Tuan R. S., 1994, Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme, *Cell Adhes Commun*, 2, 521-537 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

53. O'keefe R. J., Crabb I. D., Puzas J. E., Rosier R. N., 1994, Effects of transforming growth factor beta 1 and fibroblast growth factor on DNA synthesis in growth plate chondrocytes are enhanced by insulinlike growth factor-I, *J Orthop Res*, 12, 299-310 p.
54. Olney R. C., 2006, C-type natriuretic peptide in growth: a new paradigm, *Growth Horm IGF Res*, 16, 6-14 p.
55. Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E., 2007, Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells, *Clin Lab.*, 53(1-2), 81-84 p.
56. Pfeifer A., Aszodi A., Seidler U., Ruth P., Hofmann F., Fassler R., 1996, Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II, *Science*, 274, 2082-2086 p.
57. Potter L. R., Abbey-Hosch S., Dickey D. M., 2006, Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions, *Endocrine Reviews*, 27, 47-72 p.
58. Rosier R. N., O'keefe R. J., Crabb I. D., Puzas J. E., 1989, Transforming growth factor beta: an autocrine regulator of chondrocytes, *Connect Tissue Res*, 20, 295-301 p.
59. Ross J. and Li L., 2006, Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate, *Curr Opin Hematol*, 13(4), 237-242 p.
60. San Antonio J. D. and Tuan R. S., 1986, Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations, *Dev Biol*, 115, 313-324 p.
61. Shaikh N., Russo L., Papaleo E., Giannoni P., Gioia L., Nicotra F., Quarto R., Cipolla L., 2010, C-type natriuretic peptide: structural studies, fragment synthesis, and preliminary biological evaluation in human osteosarcoma cell lines, *Peptide Science*, 94, 213-219 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

62. Song L. and Tuan R. S., 2004, Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, *FASEB J*, 18, 980-982 p.
63. Tamura N. and Garbers D. L., 2003, Regulation of the guanylyl cyclase-B receptor by alternative splicing, *J Biol Chem*, U.S.A., 278, 48880-48889 p.
64. Tavella S., Raffo P., Tacchetti C., Cancedda R., Castagnola P., 1994, N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis, *Exp Cell Res*, 215, 354-362 p.
65. Tezval M., Tezval H., Dresing K., Stuermer E. K., Blaschke M., Stuermer K. M., Siggelkow H., 2009, Differentiation dependent expression of urocortin's mRNA and peptide in human osteoprogenitor cells: influence of BMP-2, TGF-beta-1 and dexamethasone, *J Mol Histol*, 40, 331-341 p.
66. Tsuji T. and Kunieda T., 2005, A loss of function mutation in natriuretic peptide receptor 2 (Npr2) gene is responsible for disproportionate dwarfism in *cn/cn* mouse, *J Biol Chem*, USA, 280, 14288-14292 p.
67. Tuan R. S., Boland G., Tuli R., 2003, Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, *Arthritis Research and Therapy*, 5, 32-45 p.
68. Tufan A. Ç. and Tuan R. S., 2001, Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions, *The FASEB J*, 15, 1436-1438 p.
69. Tufan A. Ç., Daumer K. M., Tuan R. S., 2002, Frizzled-7 and limb mesenchymal chondrogenesis: effect of misexpression and involvement of N-cadherin, *Dev Dyn*, 223, 241-253 p.
70. Tufan A. Ç., Daumer K. M., Delise A. M., Tuan R. S., 2002, AP-1 transcription factor complex is a target of signals from both WNT-7a and N- Cadherin-dependent cell-cell adhesion complex during the regulation of limb mesenchymal chondrogenesis, *Exp Cell Res*, 273, 197-203 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

71. Tufan A. Ç., 2001, Endokondral kemikleşme ve Wnt sinyal yolları, PAÜ T.F. Dergisi, 7, 95-102 s.
72. Tuli R., Tuli S., Nandi S., Wang M. L., Alexander P. G., Haleem-Smith H., Hozack W. J., Manner P. A., Danielson K. G., Tuan R. S., 2003, Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone, *Stem Cells*, 21, 681-693 p.
73. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları, 2009, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 20, 90 s.
74. Vaux D. L., Cory S., Adams J. M., 1988, Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature*, 335, 440-442 p.
75. Vortkamp A., Lee K., Lanske K., Segre G., Kronenberg H. M., 1996, Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTS-related protein, *Science*, 273, 613-622 p.
76. Wallen-Ohman M., Lonnbro P., Schon A., Borrebaeck C. A., 1993, Antibody-induced apoptosis in a human leukemia cell line is energy dependent: thermochemical analysis of cellular metabolism, *Cancer Lett*, 75, 103-109 p.
77. Walther T. and Stepan H., 2004, C-type natriuretic peptide in reproduction, pregnancy and fetal development, Review, *Journal of Endocrinology*, 180, 17-22 p.
78. Webster M. K. and Donoghue D. J., 1996, Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia, *EMBO J*, 15, 520-527 p.
79. Woods A., Khan S., Beier F., 2007, C-type natriuretic peptide regulates cellular condensation and glycosaminoglycan synthesis during chondrogenesis, *Endocrinology*, 148, 30-41 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

80. Wright E., Hargrave M. R., Christiansen J., Cooper L., Kun J., 1995, The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos, *Nat Genet*, 9, 15-20 p.
81. Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., 1999, p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development, *Nature*, 398, 714-718 p.
82. Yasoda A., Komatsu Y., Chusho H., Miyazawa T., Ozasa A., Miura M., Kurihara T., Rogi T., Tanaka S., Suda M., Tamura N., Ogawa Y. Nakao K., 2004, Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway, *Nature Medicine*, 10, 80-86 p.
83. Yasoda A., Ogawa Y., Suda M., Tamura N., Mori K., Sakuma Y., Chusho H., Shiota K., Tanaka K., Nakao K., 1998, Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification, evidence for possible roles of the c-type natriuretic peptide/guanlyl cyclase-b pathway, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 273, 11695-11700 p.
84. Zelzer E. and Olsen B. R., 2003, The genetic basis for skeletal diseases, *Nature* 423, 343-348 p.

## EKLER DİZİNİ

### EK-1: Etik Kurul Onay Belgesi

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ ETİK KURUL BAŞKANLIĞI  
TOPLANTI TUTANAĞI

Toplantı Tarihi	28.04.2008	Karar	16
Toplantı Sayısı	2008/05	Toplantı Saati	12:30
Toplantı Günü	Pazartesi	Toplantı Yeri	Dekanlık

**Karar 16-** Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Ahmet Çevik TUFAN'ın yürütücüsü olduğu "Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenşimal kök hücrelerinin TGF-β1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C tipi natriüretik peptid sinyal yolunun olası rolünün incelenmesi." konulu çalışması görüşülmüş olup,

Çalışmanın yapılmasında **TIBBİ ETİK AÇISINDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurula bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Raportör  
Yrd.Doç.Dr.Mustafa KARATEPE

Prof. Dr. Sımay SERİN  
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. S.Simin ROTA (Başkan)	<b>İZİNLİ</b>	Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU	
Prof. Dr. İlknur KALELİ		Doç. Dr. Hasan HERKEN	<b>MAZERETLİ</b>
Prof. Dr. Kemalettin ACAR		Doç. Dr. Nagihan YALÇIN	
Doç. Dr. Serap SEMİZ		Doç. Dr. Selim KORTUNAY	
Yrd. Doç. Dr. Mustafa KARATEPE		Ecz. Müjgan DEVRİK	<b>İZİNLİ</b>
Yrd. Doç. Dr. C.Nur SEMERCİ			

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : BERNA TEZCAN  
Doğum tarihi ve yeri : 29.07.1984 / BURSA  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Bekar  
İletişim adresi : Karaman mh. 2. Dilek sk. Doğuşkent sit. E Blok  
Kat: 3 Daire: 9 Nilüfer/BURSA

### Eğitim Durumu

İlköğretim (1990-1999) : Bursa Özel Namık Sözeri Okulları  
Lise (1999-2002) : Bursa Şükrü Şankaya Anadolu Lisesi (Fen-Matematik Bölümü)  
Üniversite (2002-2006) : Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü  
Yabancı dil : İngilizce

**Mesleki Deneyim** : Ferti-Jin Kadın Sağlığı ve Yardımcı Üreme Teknikleri  
Merkezi Etiler/İSTANBUL Ağustos-Eylül 2005 (Staj)

### Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Histoloji Embriyoloji Derneği (THED)

### Yayımlar:

Tezcan B., Serter S., Kiter E., Tufan A. Ç., 2010, Dose dependent effect of C-type natriuretic peptide signaling in glycosaminoglycan synthesis during TGF-β1 induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, J Mol Hist, 41(4-5), 247-258 p. PubMed PMID: 20721606.



Tezcan B., Serter S., Kiter E., Tufan A. Ç., 2010, Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde C-tipi natriüretik peptid (CNP) sinyal yolunun rolü, X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslar arası Katılımlı), Celal Bayar Üniversitesi, Çeşme-İZMİR (sözlü bildiri)

Tezcan B., Serter S., Kiter E., Tufan A. Ç., 2010, Regulation of C type natriuretic peptide signaling during TGF- $\beta$ 1 induced chondrogenic differentiation of human trabecular bone-derived mesenchymal stem cells, ISSCR 8th Annual Meeting, San Francisco, CA USA (poster bildiri)

Aral E., Tezcan B., Karaaslan F. J., 2008, Sağım hayvanlarında kullanılacak meme dezenfektanlarının deneysel olarak sıçanlara uygulanışı, IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Çukurova Üniversitesi, ADANA (poster bildiri)

### **Bilimsel Etkinlikler:**

X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 17-20 Mayıs 2010, Celal Bayar Üniversitesi, Çeşme-İZMİR.

Tıp Eğitiminde Akreditasyon ve Program Değerlendirme Sempozyumu, 4-5 Haziran 2009, Tıp Eğitimi Geliştirme Derneği, Pamukkale Üniversitesi, DENİZLİ.

IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü ve TMMOB Kimya Mühendisleri Odası, İZMİR.

IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 20-23 Mayıs 2008, Çukurova Üniversitesi, ADANA.

3. Kök Hücre Biyolojisinde Güncel Kavramlar ve Klinik Uygulamalar Sempozyumu, 5 Ekim 2007, TÜBA, ANKARA.

18. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 26-29 Ağustos 2007, Anadolu Üniversitesi, ESKİŞEHİR.

### **Burslar:**

TÜBİTAK-SBAG-108S189 Nolu ‘‘Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenşimal kök hücrelerinin TGF-Beta1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-Tipi natriüretik peptid sinyal yolunun olası rolünün incelenmesi’’ başlıklı bilimsel araştırma projesinde bursiyer doktora öğrencisi

### **Ödüller:**

Tezcan B., Serter S., Gök D., Çetinkaya A., Kiter E., Tufan A. Ç., Dose dependent effect of C-type natriuretic peptide signaling in glycosaminoglycan synthesis during TGF- $\beta$ 1 induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, 2010, Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği (THED), X. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Bilimsel Araştırma İkincilik Ödülü, Celal Bayar Üniversitesi, Çeşme-İZMİR

### **Projeler:**

Trabeküler kemik kökenli erişkin insan mezenkimal kök hücrelerinin TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid sinyal yolunun olası rolünün incelenmesi (TÜBİTAK Proje no: 108S189).

### **Sözlü konferans veya seminerler:**

İnsan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kondrogenezinde ERK 1/2 MAP Kinaz ve SOX 9 yolları boyunca Gas7'nin rolü, 2010, Pamukkale Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, DENİZLİ (seminer).

Meme bezi, 2007, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, ESKİŞEHİR (seminer).

### **Katılan kurslar ve eğitim programları:**

I. Kök Hücre Kursu ve V. Kök Hücre Sempozyumu, 25-26 Haziran 2010, TÜBA, ANKARA

Confocal Seminar, 27 Haziran 2008, LEICA Microsystems Gantenbein, Stem Cell and Gene Therapies Research Applied Center, University of Kocaeli, KOCAELİ

Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, 24 Haziran 2008, Kocaeli Üniversitesi Sürekli Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi, KOCAELİ

VI. Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri, 3-4 Mayıs 2006, Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, ESKİŞEHİR