

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**IGF-1'İN (Insülin-Like Growth Factor-1) JAPON
BILDIRCINI (Coturnix coturnix japonica)
EMBRİYOLARINDA KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

**Buket AYDEMİR
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

YÜKSEKLİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ**

2004-KARS

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**IGF-1'İN (Insülin-Like Growth Factor-1) JAPON BILDIRCINI
(Coturnix coturnix japonica) EMBRİYOLARINDA KEMİK GELİŞİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Buket AYDEMİR
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

YÜKSEKLİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ**

2004-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Buket AYDEMİR tarafından hazırlanmış olan 'IGF-1'İN (İnsülin-Like Growth Factor-1) JAPON BILDIRCINI (Coturnix coturnix japonica) EMBRİYOLARINDA KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12.07.2006

Adı-Soyadı

Başkan:Prof.Dr.NurhayatGÜLMEZ

.....

Üye:DoçDr.HakanKOCAMIŞ

.....

Üye: Doç Dr. Sami ÖZCAN

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.07.2006 gün ve 15/78 .sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç Dr.Ayla ÖZCAN
Enstitü Müdürü

1.GİRİŞ:

KEMİK DOKUSU

Destek dokular arasında gerçek anlamda destekleme görevi yapan kemik dokusu; hücreler (osteoprogenitör hücreler, osteoblast, osteosit, osteoklast), aramadde (matriks) ve hidroksiapatit denen inorganik maddelerden oluşur (1). Olgunlaşmış kemik dokusunun iki farklı tipi vardır. Vücudun %85'ini kompakt (kortikal) kemik ve geri kalan kısmını trabeküler (cancellous) kemik oluşturur (14).

Uzun kemiklerin şişkince olan uç kısımlarına epifiz (epiphyses) denir. Epifizler ince bir kompakt kemik tabakasıyla kaplanmış süngerimsi kemikten oluşmuştur. Diyafiz (diaphysis) adı verilen silindirik kısmın, hemen hemen tümü kompakt kemikten oluşmuş olup, kemik iliği boşluğuna bakan yüzeylerinde çok az süngerimsi kemik vardır. Süngerimsi kemikle uzun kemiklerin diyafiz kısımları iki tür kemik iliği ile doludur (32,73). 1) Kırmızı kemik iliği (medulla ossium rubra): Fötüste bütün kemikleri, postnatal dönemde genç kemiklerin içi kırmızı kemik iliği ile doludur. Yaş ilerledikçe kırmızı kemik iliğinin büyük bir kısmı sarı iliğe dönüşür. Erginde kırmızı ilik, omurlarda (vertebrae), göğüs (sternum), kaburga (costa), kafa kemiklerinde (ossa cranii) ve yassı kemiklerde (ossa plana); uzun kemiklerin (ossa plana) ise uç kısımlarında (epiphysea) bulunur. 2) Sarı kemik iliği (medulla ossium flava): Kırmızı kemik iliği yaş ilerledikçe yavaş yavaş yağlandığından rengi sararır. Bu nedenle büyük ölçüde yağ dokusundan oluşmuştur. Sarı kemik iliği, erginde uzun kemiklerin orta kısmında (diaphysis) bulunur (14).

Trabeküler kemik; süngerimsi yapı gösteren, kemik trabeküllerinden oluşur. Esas olarak kemiğin metabolik fonksiyonundan sorumludur. Kompakt kemik, mekanik ve koruma görevlerinin yanı sıra metabolik fonksiyonundan da sorumludur (38). Mikroskobik olarak, primer (birincil, olgunlaşmamış) kemik ile sekonder (ikincil, yetişkin veya lamelli kemik) kemik olmak üzere iki tür kemik doku vardır (11).

Primer kemik dokusu; Genellikle bu kemik dokusu geçicidir. Bu doku, embriyo gelişimi, kırık iyileşmesi ve diğer onarım aşamalarında beliren ilk kemik dokusudur. Vücutta birkaç yer, örneğin kafatası, diş alveolleri ve bazı tendonların kemiğe tutunduğu yerler dışında, sekonder kemik dokusu ile yer değiştirir (11).

Sekonder kemik dokusu; Bu kemik dokusu, genellikle yetişkinlerde bulunur. Tipik olarak, olgunlaşmış kemik dokusu, kanalcıklar içindeki kollagen liflerin birbirine paralel olarak veya bir damar kanalı etrafında dairesel olarak düzenlenmesiyle kendini gösterir (11).

Enine kesilmiş kemik kesitleri incelendiğinde, yoğun sahaların kompakt kemiği oluşturduğu gözlenir (32). Kesitte yer yer yuvarlak boşluklar görülür. Bunlar kan damarlarının ve sinirlerin geçmesine yarayan ve kemik boyunca birbirine paralel uzanan kanallar ile bunları birbirleriyle birleştiren mikroskobik kanalların enine kesitlerinden ibarettir. Kemiğin uzunluğuna paralel seyreden kanallara, Havers Kanalları denir. Havers kanallarını birbirine bağlayan enine kanallara da Volkman Kanalları denir. Periosteumdan gelen sinirler, kan damarları, arter ve ven kılcalları Volkman kanalları içinde uzanarak havers kanalları ve kemik iliğine kadar gelirler. Böylece periosteumdaki kan damarları sayesinde, kanaliküllere ulaşan sıvıyla kemik hücrelerinin metabolizması dengede tutulur (7,26). Havers kanalları etrafında, çapları gittikçe büyüyen iç içe geçmiş ve birbiri üzerine sıralanmış silindir şeklinde lameller bulunur. Bu lamellere spesiyal lameller (Havers lamelleri, osteon silindirleri) denir. Bu lameller, inorganik tuzlarla sertleşmiş olan organik maddelerden yapılmıştır. Osteositler, bu sert lamellerin arasında lakün denen mikroskobik boşluklarda bulunur (14,73).

1.a. KEMİK HÜCRELERİ

1.a.1. Osteoprogenitör hücreler: Kemik hücresi olma yönünde koşullanmış mezenşim hücreleridir. Mitozla bölünüp çoğalan bu hücrelerden bir bölümü osteoblastlara dönüşür. Bu hücreler kemik yapımı sırasında bol ve aktiftirler. Sekonder kemiklerde yaşlanıp yıkılan kemik dokusunun yeniden şekillenmesi sırasında bu hücreler aktifleşip bölünerek osteoblastları meydana getirirler (61).

Osteoprogenitör hücreler açık renkli, oval veya uzunca çekirdekli, hafif asidofilik hücrelerdir. Sekonder kemiklerin zarlarında (endosteum ve periosteum), bu kemiklerin içerdikleri Havers ve Volkman kanallarının örtüsünde ve büyüyen kemiklerin metafizindeki kıkırdak matriksinin trabeküllerinde bulunur (1, 6).

1.a.2. Osteoblastlar: Osteoblastlar, kemik matriksinin organik kısımlarının (Tip1 kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler) üretilmesinden sorumlu kemik hücreleridir (14,1). Mezenşim orijinli olan bu hücreler; kondroblastlar, adipositler, miyoblastlar ve fibroblastlarla aynı embriyonik kökenden gelmişlerdir (25). Kemik matriksi sentezinde görev almasının yanı sıra prostaglandin, sitokinler ve büyüme faktörlerinin de üretilmesinden sorumludur. Ayrıca bu hücreler yüksek seviyede alkalik fosfataz aktivitesi gösterirler. Bu durum kemik matriksinde kalsiyum depolanmasını osteoblastların düzenlediğinin bir göstergesidir (70,1). Kemikleşme bölgelerinde, gelişmekte olan kemiklerin periosteumunun kemiğe temas eden derin bölgelerinde diziler halinde bulunurlar. Bölünme yeteneğini kaybetmişlerdir (1, 6).

1.a.3. Osteositler: Osteositler, kireçleşmiş kemik matriksi içinde kalan ve metabolik aktivitelerini azaltmış osteoblastlardır (61). Osteositler, osteoblastlardan daha küçüktürler ve stoplazmik organellerinin çoğunu kaybetmişlerdir. Osteositler, diğer kemik hücreleri gibi kanaliküli boyunca uzanan stoplazmik uzantılara sahiptirler. Komşu osteositler stoplazmik uzantılarının birbirleri arasında yaptıkları hücre bağlantıları ile iletişim kurup besin maddelerinin hücreden hücreye geçişini sağlarlar (25).

1.a.4. Osteoklastlar: Kemik sürekli olarak yıkılan ve vücudun kalsiyum gereksinimi gibi etkenlerle yeniden yapılan dinamik bir dokudur (1). Kemiğin yeniden biçimlenme süresince çözünüp çevre dokularca ortadan kaldırılmasından sorumlu çok çekirdekli hücreler olan osteoklastlar, ilk defa 1873'te Köllikel tarafından bulunmuştur. Bu hücreler kemik köken hücrelerinin farklılaşmasıyla oluşur (25, 1). Osteoklastlar, kemik matriksini eriten, asit kollegenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgılayan, iri, ileri derecede dallanmış ve hareketli hücrelerdir. Bu hücreler kemik rezorbsiyonunun başladığı bölgelerde, enzimatik olarak açılmış Howship lakunası adı verilen çukurlarda bulunurlar. Böylece kalsifiye olmuş temel maddeyi serbest hale getirip kemik rezorbsiyonu sırasında meydana gelen artıklarında ortadan kaldırılmasında aktif rol alırlar (32,73).

1.b.KEMİK MATRİKSİ

Kemiğin ara maddesi iki esas öğeden oluşur. Bunlardan biri organik matriks, diğeri ise inorganik tuzlardır (1). Organik maddeler kemik ağırlığının ortalama üçte birine, inorganik maddeler (kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum, karbonat ve fosfat) ise üçte ikisine eşittir. Organik maddeler kemiğin esnekliğini, inorganik maddeler ise sertliğini sağlar (21).

İnorganik maddelerin çoğunluğunu %85'lik bir payla kalsiyum fosfat oluşturur. Bunu %10'luk bir oranla kalsiyum karbonat takip eder. Ayrıca, az miktarda olmak üzere kalsiyum florid, magnezyum florid, magnezyum hidroksit ve magnezyum sülfat bileşikleri bulunur. Bunlardan başka, sitrat iyonları ve karbonat iyonları da yer alır (1). Kalsiyum ve fosfor birleşerek hidroksiapatit kristallerini meydana getirir. Hidroksiapatitin yüzeyindeki iyonlar hidrate edildiği için kristallerin etrafı su ve iyonlardan oluşmuş bir tabaka ile kaplanmıştır. Hidratasyon kabuğu adı verilen bu tabaka, vücut sıvıları ile kristal arasındaki iyon alışverişinin gerçekleşmesini sağlar (32).

Kemikte yüksek oranda bulunan kalsiyum fosfat, hidroksiapatit kristalleriyle benzer bir yapıya sahiptir. Başlangıçta kalsiyum fosfat şekilsiz olarak depolanır, daha sonra hidroksiapatit kristalleri şeklinde yeniden şekillenir. En son evrede kalsiyum fosfat ya çok ince plakalar halinde ya da 13-30 A° kalınlığında, yaklaşık 400 A° uzunluğunda çubuk şekilli kristaller halinde bulunur. Bu inorganik kristaller ya kollajen fibrillerin üzerinde ya da onlarla birlikte kemik matriksinde bulunur. Kemik mineralinde sitrat iyonu ve karbonat iyonu önemli miktarda bulunurlar. Sitrat, kristallerin yüzeyinde bulunurken, karbonatın yeri halen tartışma konusudur. Florit iyonu miktarı, içme suyundaki florit miktarına bağlıdır (1).

Matriksin organik maddesi, Tip 1 kollajen ve proteoglikan agregasyonları ile üç tip özel yapısal glikozaminoglikanları (kondroitin sülfat, keratan sülfat, hiyaluronik asit) içerir (90). Kemikte kollajen, yapı ve organizasyonu bağ dokusundakine benzer. Yaklaşık 500-700 A° çapında ve 670 A°'da bir çizgilenme gösteren fibrillerdir (53, 29).

1.c. KEMİK DOKU ZARLARI (Endosteum ve Periosteum)

Kemiğin dış yüzeyindeki zara periosteum iç yüzeyindeki zara endosteum denir (1,14). Periosteumda bol miktarda kollajen fibriller bulunurken az oranda elastik fibriller ve fibrositler bulunur. Fibrillerin arasında bolca kan damarları ve sinirler dallanarak Havers kanallarına, oradan da kemik iliğine ulaşırlar (7). Periosteumun iç tarafı, bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme yeteneğine sahip olan osteoprogenitör hücrelerden zengindir (32). Endosteum, kemik içindeki bütün boşlukları sarar ve tek tabaka halinde yassılaştırmış osteoprogenitör hücreler ile az miktarda bağ dokusundan oluşur (1). Periosteum ve endosteumun temel işlevi, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi, onarımını sağlamak ve osteoprogenitör hücreler aracılığıyla yeni osteoblastları aralıksız olarak oluşturmaktır (7).

Eklem kıkırdaklarıyla örtülü olan kemiklerin uç kısımlarında periosteum örtüsü bulunmaz. Aynı zamanda, tendon ve ligamentlerin kemiğe bağlantı bölgelerinde de periosteum bulunmaz (1).

1.1. KEMİK DOKUNUN FONKSİYONU

Kemiğin 4 temel fonksiyonu vardır, bunlar;

1. Kalsiyum, fosfat ve diğer iyonları depolamak,
2. Kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini ihtiva etmek,
3. Mekaniksel olarak dokuları desteklemek,
4. Merkezi sinir sistemini korumak (60).

Bu işlevlerine ek olarak, çizgili (iskelet) kas kasılmalarının doğurduğu kuvvetleri arttırarak vücutsal hareketlere dönüştürmeye yardımcı olmakta da görev alır (32).

1.2. EMBRİYONAL VE POSTNATAL DÖNEMDE KEMİK OLUŞUMU (osteogenez) VE GELİŞİMİ

İskelet sistemi, paraksiyal mezoderm, mezodermin lateral plağı (somatik tabaka) ve nöral krestten gelişir (60). Paraksiyal mezoderm, nöral tüpün her iki yanında segmentler halinde uzanan ve baş bölgesinde somitomer, oksipital bölgeden kaudale doğru da, somit adı verilen doku bloklarından oluşur (60). Somitler daha sonra, skleretom olarak adlandırılan bir metromedial ve dermomytom denilen bir dorsolateral bölümü oluşturmak üzere iki kısma farklılaşır. Sklerotom hücreleri polimorf bir görünüme bürünerek mezenşim veya embriyonik bağ doku olarak adlandırılan gevşek doku örgüsünü meydana getirirler. Mezenşimal hücrelerin özelliği, göç yeteneklerinin olması ve birçok değişik doku yönünde farklılaşabilmeleridir. Bu hücreler fibroblast, kondroblast ya da osteoprogenitör hücreler haline dönüşebilirler (60, 47).

Kondroblast ve osteoblastlara farklılaşan hücreler, çeşitli transkripsiyonel faktörlerin kontrolü altında döngülerini

gerçekleştirebilirler. İskelet gelişiminin mekanizması hücre-hücre ve hücre-matriks işbirliği ve hücre sel sinyal ve gen transkripsiyonu değerlerince düzenlenir (56). Transkripsiyon faktörlerini organize eden araçlar; büyüme faktörleri, stokinezler (immün reaksiyonlarını düzenleyen polipeptid moleküller), metabolitler ve hormonlardır (56, 70).

Postnatal dönemde kemikleşme, intramembranöz ve endrokondral kemikleşme olmak üzere iki farklı şekilde oluşmaktadır (28). Frontal (alın kemiği), parietal (üst kafatası kemiği), oksipital (artkafa kemiği) ve temporal (şakak kemiği) kemikler gibi kafatasının bazı yassı kemikleri ile mandibula (alt çene) ve maksillanın (üst çene) bazı kısımları intramembranöz kemikleşmeyle meydana gelirler (1,28,46). İnamembranöz kemikleşme, mezenşimal hücrelerin osteoprogenitör hücrelere dönüşmesi ve yeni kemik matriksinin oluşmasından sonra kalsifikasyonun tamamlanmasıyla meydana gelir (28,47). Ossifikasyonun ilk başladığı noktaya primer kemikleşme merkezi denir. Bu merkez, bir grup mezenşimal hücrenin osteoblasta dönüşmesiyle başlar. Yeni kemik matriksinin oluşmasını kalsifikasyon takip eder. Bazı osteoblastların etrafları sarılarak osteosit haline gelmeleri sağlanır (32,73). Mezenşimal doku hücreleri bölünerek kemikleşme merkezinin devamlı olarak büyümesinden sorumlu olan osteoblastları oluştururlar. Çeşitli ossifikasyon merkezleri radial olarak büyüüp birleşerek, başlangıçtaki bağ dokunun yerini alırlar (32). Kemik matriksini sentezleyip dışarı veren osteoblastlar, bir süre sonra bu materyal içinde hapsolüp kalırlar ve böylece kemik dokusunun olgun hücreleri olan osteositleri oluştururlar. Yeni birikmekte olan matriks içindeki lakünlerde yerleşen osteositler kemik yüzeyindeki osteoblastlarla çok ince uzantıları aracılığıyla ilişki halindedirler. Kemik kanalcıkları, bu hücrelerin uzantıları etrafında matriks birikimi ile oluşur. Trabekül yüzeyindeki osteoblastların kemiğin içine girmesiyle birlikte sayılarında görülen azalma, çevredeki bağ dokusunun farklılaşmamış hücrelerinden yeni osteoblast oluşması ile dengelenir (1). Süngerimsi kemiğin sürekli kalacağı bölgelerde, bağ dokusu yavaş yavaş kan hücrelerini oluşturacak olan hemopoiyetik doku haline dönüşür (61). Bağ

dokusunun kemikleşmeye katılmayan bölgeleri ise intramembranöz kemiğin periosteum ve endosteumunu meydana getirir (23). Uzun kemiklerin meydana gelmesi endokondral kemikleşmeyle olur (32, 73). Endokondral kemikleşmede meydana getirilecek kemik ilk olarak hiyalin kıkırdak modellerinden şekillenir (49,64).

Temel olarak endokondral kemikleşme 2 aşamadan ibarettir. İlk aşama, kemik modelin kondrositlerinin hipertrofisi ve harabiyetidir. Geriye, kalsifiye kıkırdak matriksinin birbirinden ayırdığı genişlemiş lakünler kalır. İkinci aşamada, osteoprogenitör hücreler ve kan kapillerlerinden oluşan osteojenik tomurcuk, dejenere olmuş kıkırdak hücrelerinden geriye kalan alanlara nüfuz eder. Osteoprogenitör hücreler, kıkırdağımsı septumun üstünü kemik matriksi ile kaplayan osteoblastlara dönüşür. Böylece kalsifiye kıkırdak dokusu septumları, daha önce başlayan ossifikasyona destek olur (32,70).

Endokondral kemikleşmede, ortaya çıkması gereken ilk kemik dokusu diafizleri saran perikondriyumun içindeki intramembranöz kemikleşme yoluyla olur (64,73). Böylece kıkırdağı saran perikondriyumun iç kısmında kemik halkası adı verilen silindirik bir kemik tabakası meydana gelir. Kemiği sardığı için perikondriyuma artık periosteum adı verilir. Yeni meydana gelen kemik halka besin maddelerinin difüzyonuna engel olduğu için kemik halka içinde kalan kondrositler dejenere olurlar ve kıkırdak matriksinin devamlılığını sağlayan yetenekleride ortadan kalktığı için kalsiyum çökmeye başlar ve kıkırdak matriksi kalsifiye olur (64,70). Periosteumdan köken alan osteojenik tomurcuğun kan damarları, osteoklastlar tarafından kemik halkada açılan deliklerden geçerek, kalsifiye olmuş kıkırdak matriksi içine girer. Kan damarlarının yanı sıra osteoprogenitör hücreler de bu alana girip proliferasyon olarak osteoblastları oluştururlar. Osteoblastlar kalsifiye olmuş kıkırdak artıkları üzerinde çoğalmaya başlar. Embriyonal gelişimin ileri safhalarında, epifizlerin ortasında sekonder kemikleşme merkezleri ortaya çıkar (32,70). Eklem kıkırdaklarında perikondriyum olmadığı için burada kemik halkaya benzer bir yapıda oluşamaz (32). Endokondral kemikleşme, bütün uzun kemiklerin

uzunluğuna büyümesinde rol oynayan bir mekanizmadır. İntrauterin dönemde kemikleşme, gelecekte kemik olacak kıkırdak modelinin merkezinde başlar ve azar azar kemik sonlarına doğru uzar (30). Doğumdan sonra genellikle epifizlerde ikinci kemikleşme merkezi şekillenir. Epifizlerde kemikleşme, süngerimsi kemiğin diafizindeki aynıdır. Olgunlaşmış kıkırdağın kemik iliği ve kemiğe dönüşümü; ikinci kemikleşme merkezinin kuruluşuyla birlikte sonlanır (45).

1.3. KEMİK BÜYÜMESİ

Kemik uzaması endrokondral kemikleşmeyle sağlanır (8). Deneysel çalışmalar, uzunluğuna kemik büyümesinin lokal ve sistemik biyokimyasal faktörler tarafından kontrol edildiğini göstermiştir. Uzun kemiklerin büyüme ve gelişmesi; D vitamini, lokal ve sistematik büyüme faktörlerine ve hormonlarına, örneğin, ön hipofizden salınan büyüme hormonuna, ovaryum ve testislerden salınan cinsiyet hormonlarına bağlıdır (24).

Doğumda, kemiğin diyafiz bölümü genellikle tam olarak ossifiye olmuştur. Buna karşın, epifiz olarak adlandırılan uç bölgeleri hala kıkırdak yapılarını korurlar (60). Ancak kısa bir süre sonra epifizlerde de ossifikasyon merkezleri ortaya çıkar. Diyafiz ve epifiz bölgelerindeki ossifikasyon merkezlerinin arasında, geçici olarak bir kıkırdak tabakası yer alır. Epifiz plağı adı verilen bu yapı, kemiklerin uzunlamasına büyümesinde rol üstlenir (60,73). Bu plağın her iki tarafında da endokondral ossifikasyon süreci devam eder ve kemik tam uzunluğuna ulaştığında, epifiz plakları kaybolarak, epifiz bölgeleri kemik gövdesi ile birleşir (39).

Epifiz tabakasında, epifizden diyafizin kemikleşme merkezine doğru sıralanmış beş hücre tabakası bulunur. Bu tabakalar: a) Epifize en yakın olan ve en üst sırada bulunan dinlenme bölgesi. Bu bölgede bulunan kıkırdak hücreleri, çoğalmayan ve herhangi bir değişme göstermeyen dinlenmekte olan hücrelerdir (1). b) Proliferasyon (çoğalma) bölgesi; mitoz bölünme geçiren kıkırdak hücrelerinden oluşur. Mitoz bölünme ve artan hücre aktivitesi sonucu tabaka kalınlaşır. Böylece epifiz plağının boyca

büyümesini sağlar. c) Hipertrofik bölge; daha yaşlı, genişlemiş hücrelerin bulunduğu ve kalsiyum depolanmasıyla ilgili dejeneratif değişikliklerin görüldüğü geçici kireçleşme bölgesidir. d) Dördüncü tabaka, diyafize en yakın tabaka olan kireçleşme bölgesidir. Hızlı kireçleşen ölü ya da ölmekte olan kıkırdak hücrelerinden oluşan ince bir tabakadır. e) Kemikleşme kuşağı olarak adlandırılan tabakada ise, endokondral kemik dokusu belirir. Kan kapillerleri ve periosteumdan köken alan hücrelerin mitoz bölünmeleri ile ortaya çıkan osteoprogenitör hücreler, kondrositlerden geriye kalan boşlukları doldurarak, kesintili bir tabaka halinde kireçlenmiş kıkırdak matriksin duvarları üzerinde dağılıp osteoblastları meydana getirir (1,11).

Fiziksel aktiviteler kemik gelişiminde önemli rol oynar. Özellikle çocukların ve gelişme çağındakilerin kemik mineral içeriği yaklaşık %90 kadar artarak en yüksek seviyeye ulaşır kemik büyümesi gerçekleşir. Eliakim ve Beyt'in, yapmış oldukları çalışma sonucunda; egzersizin, kemik mineralleşmesinde ve olgunlaşmasında etkili olduğunu, özellikle, çocukluk ve gelişme dönemindeki fiziksel aktivitelerdeki artışın, yaşamın ilerleyen dönemlerinde kemik sorunlarını (osteoporosis gibi) önlediğini göstermişlerdir (15).

Kemik gövdesinin enine büyümesi, periosteumun hemen altındaki intramembranöz kemik yapıların sert kemik, periosteumun altındaki intramembranöz kemikleşmenin ürünüdür sürekli birikmesiyle olur (47). Tamamen gelişmiş bir uzun kemiğin gövdesini oluşturan. Primer (olgunlaşmamış) kemikleşme merkezinin oluşmasından sonra, kıkırdak modelinin uçları bir yandan büyüyüp uzarken, diğer yandan da kondrositlerin çoğalmasıyla genişler. Kemiğin büyümesi için kemik yıkımı, kemik birikimi veya kemik yapımı kadar önemlidir. Kemik gövdesinin dışında yeni kemik dokusu birikmesi, kemik iliği boşluğunu genişletmek için periosteumun altındaki trabeküllerin içini yıkacak olan osteoklastların ortaya çıkmasıyla birlikte başlar (1).

1.4. JAPON BILDIRCINLARINDA KEMİK OLUŞUMU VE GELİŞİMİ

Japon bıldırcınlarında embriyonal dönem 16 gündür (51). Embriyonal dönemin kısa süreli olmasının yanı sıra, hem vücut yapısının çalışmaları kolaylaştıracak kadar küçük olması hemde diğer kanatlılara oranla daha hızlı büyümesi, çalışmalarda Japon bıldırcınlarına karşı ilginin artmasına neden olmuştur (37, 44). Pourlis ve arkadaşlarının (51), Japon bıldırcınlarının bacak ve kanatlarda kemik gelişimini incelemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada, inkübasyonun 6. ve 16. günleri arasında, bacakların yapısını oluşturan femur, tibia ve fibula kısımlarında, kanatların yapısını oluşturan humerus, ulna, ve radius kısımlarının diyafiz bölgelerinde ilk olarak primer kemikleşme merkezlerini göstermişlerdir (51).

Nakane ve Tsudzuki'nin (44), Japon bıldırcınlarında kafatası, omur ve kaburga kemikleri, göğüs kemiği, kanat ve bacaklarda, inkübasyonun 3. ve 17. günleri arasında bu alanlarda kemik gelişimini incelemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada, 3.günde sadece notokort ve çevresinin fark edilir olduğunu bildirmişlerdir (44, 23). Kafatasında, inkübasyonun 8. ve 10. günleri arasında hemen hemen bütün kemiklerde (frontal, prefrontal, premaksilla, maksilla, splaniyal mandibula), intramembranöz kemikleşmenin gerçekleştiği saptanmıştır (44). İnkübasyonun 11. gününde torakal omurlarının 13. günde ise servikal omurlarının oluştuğunu, inkübasyonun 14. gününde göğüs kemiğinde, inkübasyonun 15. gününde ise kaburga kemiklerinde kemikleşmenin başladığını tespit etmişlerdir (44).

2. İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRLERİ

(İnsülin-Like Growth Factors,IGFs)

Büyüme hormonu (Growth Hormone, GH), normal büyüme için gerekli olan ve tüm yaşam boyunca anabolik etki gösteren bir hormondur. Fakat, başta kemik ve kıkırdak dokularıyla iskelet kası olmak üzere büyüme yeteneğinde olan bütün beden hücrelerine doğrudan etkimeyip somatomedinler (insülin-like growth factors) adı verilen ara maddeler ile etkisini göstermektedir (72). Somatomedinler, büyüme hormonunun etkisiyle ağırlıklı olarak karaciğer ve diğer dokulardan salgılanırlar (12). Aynı zamanda IGF'ler, ektoderm, endoderm ve mezoderm kökenli yaklaşık 20 hücre tipinde DNA sentezini teşvik edebilme yeteneğine sahiptir (19,33).

İnsülin benzeri büyüme faktörlerinin büyüme üzerindeki birçok etkisi, insülinin büyüme üzerindeki etkilerine benzemektedir. Bu nedenle Somatomedinler diye adlandırıldıkları gibi, insüline benzeyen büyüme faktörleri (insülin-like growth factors, IGFs) olarak da adlandırılırlar (21). Dolaşımdaki başlıca IGF'ler insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1 ya da Somatomedin-C) ve insülin benzeri büyüme faktörü -2 (IGF-2) dir (19,72). Bu büyüme faktörleri molekül yapılarındaki C zincirlerinin ayrılmamış olması ve A zincirlerinin ucunda D domeni adı verilen bir uzantıya sahip olmaları hariç yapısal olarak insüline benzerler (19,71,72).

İnsülinin hücre büyümesi ve çoğalması üzerine etkilerini, IGF-1 ve IGF-2'nin gösterdiği benzer etkilerden ayırt etmek güçtür. Gerçekte, insülin ve IGF'ler büyüme üzerine birbirleriyle etkileşirler (45). IGF-1, 70 aminoasit içeren, yaklaşık 7500 dalton ağırlığında olan bir büyüme faktörüdür. Önceden somatomedin C olarakta adlandırılan bu polipeptit yapı bakımından proinsüline ve insülin reseptörüne bağlanmasıyla da insüline benzer. İnsan plazmasındaki IGF-2'nin yapısında 67 aminoasit bulunur (2,72). Yapısal olarak, IGF'ler ve insülinin karşılaştırılması şekil-1'de gösterilmiştir.

	insülin	IGF-1	IGF-2
--	----------------	--------------	--------------

Diğer isimleri	...	Somatomedin-C	Çoğaltıcı- stümüle edici aktivite (MSA)
Amino asit sayısı	51	70	67
Salındığı yer	Pankreatik B hücreleri	Karaciğer ve diğer dokular	Çeşitli dokular
Salınmasını düzenleyen	Glukoz	Büyüme hormonu, besinsel öğeler	Bilinmiyor
Plazma seviyesi	0.3-2 ng/ml	Değişken	Değişken
Plazmada bağlayıcı protein	Yok	Var	Var
Başlıca fizyolojik etkisi	Metabolizmanın kontrolü	İskelet ve kıkırdak büyümesi	Fötal gelişme sırasında büyüme

Şekil-1. İnsülin benzeri büyüme faktörü ve insülin'in yapısal olarak karşılaştırılması (24).

2.1. IGF'LERİN (İnsülin- Like Growth Factor) TARİHÇESİ

IGF sistemi; IGF-1, IGF-2, IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP) ve IGF reseptörlerinden (IGFR) oluşmuştur (5,17,18). Somatomedin C (sm-C), dokularda GH'a cevap veren somatomedin'e verilen isimdir. Klapper ve arkadaşları(16), sm-C ve IGF-1 molekül yapılarının aynı olup olmadığı üzerine yaptıkları çalışmada, hernekadar farklı biyolojik örneklerde çalışsalar da diziliminin aynı olduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle somatomedin C'ye IGF-1 adı verilmesi uygun görülmüştür (16).

İlk zamanlarda IGF'lerin saflaştırılması ve karakterizasyonunda peptitlerin büyük moleküllü protein yığınlarından (insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler) oluştuğu sanılıyordu. Özel IGF-1 taşıyan proteinlerin kanda varlığı 1974'te bildirilmiştir (40). Günümüze kadar memelilerde 8 farklı bağlayıcı protein tespit edilmiştir (35). IGF bağlayan proteinler (IGFBPs), hücresel yüzeydeki IGF peptit hareketlerinin ayarlanmasını sağlarlar (41,63).

Froesech ve arkadaşları (63), ve Burgi ve arkadaşları (9), insülin için yaptıkları radioimmunoassay denemelerde, insülin-benzeri aktiviteyi anti-insülin serum eklenmesiyle serumun biyodeğerlerini saptadılar. İnsan serumunda, protein karakterinde, farklı molekül ağırlığına sahip 2 farklı baskılanamayan insülin-benzeri aktivite saptanmıştır (Nonsuppressible İnsulin-Like Activity, NSILA). Bunlar, düşük moleküler ağırlığa sahip olan NSILA-S ve büyük moleküler ağırlığa sahip olan ise NSILA-P olarak adlandırılmıştır (61). Düşük moleküler ağırlığa sahip olan NSILA-S'da, insülin-benzeri büyüme faktörü-1 ve -2 (insülin-like growth factor-1 ve -2) olarak ifade edilen 2 polipeptid içerir (56).

Hipofizin ön kısmından salınan, büyümeyi arttırıcı etkisi olan büyüme hormonu (Growth Hormone, GH, Somatotropin, ST) 1922'de keşfedilmiştir (16). GH'nın dokular üzerine etkileri, direkt veya indirektir. İndirekt etkileri, IGF-1 tarafından yürütülmektedir (16). Somatomedinin keşfi, GH işlevinin temelini açıklayan Somatomedin Hipotezinin ortaya çıkmasını sağladı (16). Bu hipotez; GH ve IGF-1'in biyolojik olaylarda nasıl etki gösterdiklerinin anlaşılmasını sağlamıştır. Köken olarak

somatomedin hipotezi; büyüme hormonunun (GH) büyüme nasıl arttırdığı hakkında daha fazla bilgi edinmek amacıyla ortaya konmuştur (16). Birçok araştırmacı, GH'nın kıkırdakta sülfat artışını stimüle ettiğini ve bu etkinin indirekt olarak sülfasyon (sulfation) faktör veya somatomedin olarak adlandırılan bir serum aracılığıyla gerçekleştiğini göstermişlerdir (16,17,66). Düşük GH değerlerine sahip hipofizektomize (hipofizi çıkarılmış) ratlardan elde edilen serum, sülfat birlikteliğini uyarmış olup, bu hayvanlara GH verildiğinde sülfat artışı olduğu görülmüştür (66). Orlowski ve Chenausk (16), 4 günlük hipofizektomize edilen ratlara rekombinant insan GH verdiklerinde vücut ağırlığının arttığını gözlemişlerdir (63). GH yetersiz olan ratlara, GH verildiğinde kemik büyümesinin arttığı gözlemlenmiştir (16).

Somatomedin hipotezinin temel prensibi, GH'nın büyümedeki işlevlerine IGF'lerin aracılık ettiğidir. Şöyleki; otokrin/parakrin etkiden sorumlu olan IGF-1'in, GH'nın sorumluluğunda karaciğerde sentez edildiği ve daha sonra periferel hedef dokulara taşınarak GH'nın büyümedeki rolüne aracılık etmesi olarak açıklanmıştır (54,63,12). Bunun yanında, GH'nın, IGF-1'in arabuluculuğu olmadan hedef dokulara üzerine direkt etkileri olduğu da ispatlanmıştır (5).

Büyüme hormonu doğrudan canlı hayvan kemiklerinin epifiz kıkırdağına enjekte edilmesinin yalnızca bu kıkırdak bölgesinin büyümesine yol açmıştır (21). Bu nedenle somatomedin hipotezinin bazı yönleri hala tartışmalıdır. Bir olasılık, büyüme hormonunun (GH) dokuda lokal büyümeye neden olacak kadar yeterli miktarda lokal IGF-1 yapımına neden olabileceğidir. Başka bir olasılığa göre; bazı dokularda büyümenin hızlanmasından, büyüme hormonunun kendisi doğrudan sorumlu olduğu ve IGF-1 mekanizması büyüme hızlandıran bir araç olup ancak her zaman gerekli olmadığıdır (21).

2.2. IGF BAĞLAYICI PROTEİNLER

(Insülin-Like Growth Factor Binding Proteins, IGFBP's)

IGF'lerin biyolojik işlevlerinde önemli bir aracı olan IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP'ler), dolaşımdaki IGF'leri bir yerden bir yere taşımak ve yarı ömürlerini uzatmak için kendilerine bağlayarak (2,7,18), IGF fonksiyonunda hem bir inhibitör hemde bir uyarıcı olarak görev alırlar (71). IGFBP'lerin IGF'lere bağlanma istekleri ve IGF'lerin salınımı, IGFBP'lerin fosforilasyonu, glikolizasyonu ve özel proteolizisi tarafından kontrol edilir (2,43).

Molekül ağırlıkları, aminoasit dizilimleri, ve bağlayıcı yapı unsurlarındaki farklılıkları nedeniyle dolaşımda sekiz farklı özellikte IGF Bağlayıcı protein (IGFBPs) izole edilmiştir (35). Bunlar;

1) IGFBP-1 (25-30 kDa): IGFBP-1, IGF'lerin her ikisiylede yüksek affiniteyle bağlanır. IGFBP-1; insan amniotik sıvısında, fetal serumda ve decidua da bulunur (35). IGFBP-1, diğer IGFBP'lerle birlikte, IGF-1 biyoaktivitesini, IGF-1 reseptörünün düzenleyici otokrin etkilerini önleyerek arttırabilir (43).

2) IGFBP-2 (32-34 kDa): IGFBP-2, insanda; serebrospinal sıvısında, seminal plazmada ve lenfte, Ratlarda; amniotik ve serebrospinal sıvıda, kanatlılarda; vıteal sıvıda ve domuzlarda; foliküler sıvıda bulunur. IGFBP-2, tercihen IGF-1'e bağlanır ve fetal büyümede önemli bir role sahiptir (35). IGFBP-2, osteoblastların ve kondrositlerin temel bir bağlayıcı proteindir. Cıvcıv kanat ve bacak kemiklerinde varlığı tespit edilmiştir (41).

3) IGFBP-3 (53 kDa): IGFBP-3; insan ve ratta lenfte, serebrospinal sıvıda, insan ve domuz foliküler sıvıda, ratta colostum ve sütte ayrıca insanda seminal sıvıda ve gebeliğin son üç ayında amnion sıvısında bulunur (35).

4) IGFBP-4: Koyun kan plazmasında 24 kDa ve 29 kDa molekül ağırlığı olmak üzere 2 farklı formu bulunmuştur. Ayrıca; insan, rat ve domuz kan serumundada 24 kDa moleküler ağırlığa sahip olan IGFBP-4 bulunur (35).

5) IGFBP-5 (23 kDa): IGFBP-5; sadece IGF'lerle değil aynı zamanda yüzeydeki osteoblastlarda (ekstraselüler matriks) bağlanırlar. Andress ve Brnbaun, IGFBP-5' ilk kez insan osteoblast kültüründen izole etmişlerdir. Ayrıca, ratlarda kan serumunda IGFBP-6 ile birlikte bulunur. Bu protein böbrek, kemik ve endokrin dokularında dahi bulunmakta olup, akciğer gelişiminde de önemli rol üstlenmektedir (35).

6) IGFBP-6 (30-32 kDa): IGFBP-6; insan serebrospinal sıvısında bulunur. IGF-2'ye bağlanma affinitesi IGF-1'e oranla daha yüksektir (35).

7) IGFBP-7 ve IGFBP-8: IGFBP-7, IGFBP-8 ile birlikte IGF'lere düşük affiniteyle bağlanırlar. IGFBP-8; bağlayıcı dokuların büyüme faktörü olabileceği yönünde bulgular mevcuttur (35).

2.3. IGF RESEPTÖRLERİ

(Insülin-Like Growth Factor receptors, IGFRs)

IGF'ler, Tip-1 ve Tip-2 IGF reseptörleri olarak adlandırılan özel hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar (2). IGF-1 reseptörü (Tip-1 ya da IGF-1R), tirozin kinaz büyüme faktör reseptörünün bir üyesi olup insülin reseptörlerinin özellikle tirozin-kinazın homologudur. Bu reseptör, disülfid köprüsü tarafından 2α ve 2β altünitelerini bağlayan bir heterodimerden oluşmuştur. Altüniteler, plazma membran reseptörü ve sitoplazmik tirozin-kinaz kontrolü altında birbirine bağlanır (19). Tip-1 IGF reseptörü, IGF sisteminde büyüme ve metabolik yanıt için kritik belirleyici bir reseptördür. Ayrıca, hücre düzeyinde Tip-1 IGF reseptörünün, hücre döngüsünün ilerleyişi, farklılaşması ve gelişiminin kontrol edilmesinde koordine edici bir rolü vardır (5,43). IGF-1 reseptörü, genetik olarak ortadan kaldırılmış (knock-out) farelerde, solunum kaslarının az gelişmesine bağlı olarak erken postnatal dönemde solunum yetersizliğinden dolayı ölümler görülmüştür (24).

IGF reseptörü, yumurtadan çıkan civcivlerden izole edilen kas hücrelerinde büyümeyi uyardığı gözlenmiştir (45). IGF-1'in embriyodaki rolü, GH'dan bağımsız olarak IGF-1 reseptörü aracılığıyla olmaktadır.

Çünkü, mutant hayvanlar veya hipofiz bezi çıkarılmış deneklerde, GH'nın yokluğunun normal prenatal gelişimi etkilemediği beirlenmiştir (71).

IGF-2 reseptörü (Tip-2 ya da IGF-2R), IGF-1 reseptöründen (IGF-1R) farklı yapı gösterdiği, Mannoz-6-fosfat için bir reseptör gibi davrandığı bildirilmiştir. Tip-2 reseptörünün IGF'lerin metabolik faaliyetlerindeki rolü ise tam olarak saptanamamıştır (2,71).

2.4. IGF'LERİN SENTEZİ VE SALINIMI

IGF-1 sentez ve salınımı karaciğerde GH'a bağlıdır (41,63,71). Buna karşın IGF-2 gen ekspresyonu GH'dan çok fazla etkilenmez ancak doğum öncesinde fötüsün büyümesinde önemli role sahiptir. Erişkinlerde IGF-2 geni sadece koroid pleksusta ve beyin zarında görülmektedir (19,71).

Mekanizması çok karmaşık olan büyüme olayında yalnız büyüme hormonu ve IGF'ler değil aynı zamanda tiroid hormonları, insülin, eşey hormonları, kalıtsal etkenler ve çevresel etkenler de büyüme üzerinde rol oynarlar. Bu nedenle büyüme hormonu normal büyümeyi sağlayabilmesi için tiroid hormonları, insülin, androjenler ve diğer bazı hormonların ortamda bulunması ve birlikte etkimesi gerekmektedir (72).

İnsan ve laboratuvar hayvanlarında uterus içerisinde (intrauterin) büyüme, fötal büyüme hormonuna bağımlı değildir. Fötüs, büyüme hormonundan (GH'dan) bağımsız olarak büyür (72). Gebelik döneminde annede IGF oluşumunu korionik somatotropin (GH) kontrol eder (72).

Kanatlılarda, IGF'lerin sentez ve salınımı hem büyüme hormonuna bağlı hemde büyüme hormonuna bağlı olmayan bir kontrol mekanizmasıyla gerçekleşmektedir. GH:IGF-1 etki mekanizması en iyi fonksiyonunu embriyogenezis döneminde gösterir (41). Tavuk embriyosunda, GH sekresyonunun başlamasından önce inkübasyon başında, karaciğer hariç, değişik dokularda da (kalp, beyin) IGF-1 mRNA'sı tespit edilmiştir (41). Buna rağmen, gelişen kanatlı embriyolarında IGF sekresyonunu kontrol eden faktörler henüz bilinmemektedir (41).

Yetişkin omurgalılarda, IGF-1'in temel kaynağı karaciğer olmasına karşın, IGF-1 embriyogenezis boyunca karaciğerde üretilmez. IGF-1 embriyogenezisin sonlarına doğru karaciğer tarafından üretilmeye başlar (48). Embriyogenezis boyunca diğer dokular IGF-1 üretir. Omurgalı embriyoların 12. ve 13. günlerinde, IGF-1 ekspresyonu; göz, bacaklar, kalp, beyin ve midede saptanmıştır. Bu organlar gelişim esnasında IGF-1'in dolaşımdaki miktarında katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (48).

IGF'leri salınımına büyüme hormonundan başka çeşitli faktörlerde etkilemektedir (19). Bu etkenlerden biri normal beslenme olup IGF-1 oluşumu için gereklidir. Nitekim, açlık durumunda IGF-1 oluşumu azalır. Glikokortikoidler ve protein yetersizliğinde IGF-1 oluşumu önemli ölçüde aksar ve plazmadaki IGF-1 salınımı azalır. Bu durum İnsülin tedavisiyle normale döner (19,72). Yüksek dozda östrojen ise IGF-1 yapımını inhibe eder (72).

Ergenlik döneminde büyümenin hızlanması kısmen androjenlerin protein oluşumunu arttırmasına bağlıdır ve gerek kız gerekse erkeklerde bu dönemde böbrek üstü bezlerinden salınan androjenler artar. Ancak, bu durum eşey hormonları ile büyüme hormonu ve IGF-1 arasındaki ilişkilerde bağlıdır. Eşey hormonları plazmadaki IGF-1 miktarını arttırırlar (72). Fakat büyüme hormonu yetersizliği olan kişilerde bu artış görülmez. Bu yüzden eşey hormonları, büyüme hormonu salınımında görülen hızlı artışlara bununda IGF-1 salınımının artmasına neden olduğu belirtilmiştir (72). Kanatlılarda kuluçka sonrası IGF-1 sekresyonunun regülasyonu embriyoya nazaran, GH'ya daha çok bağlıdır (41).

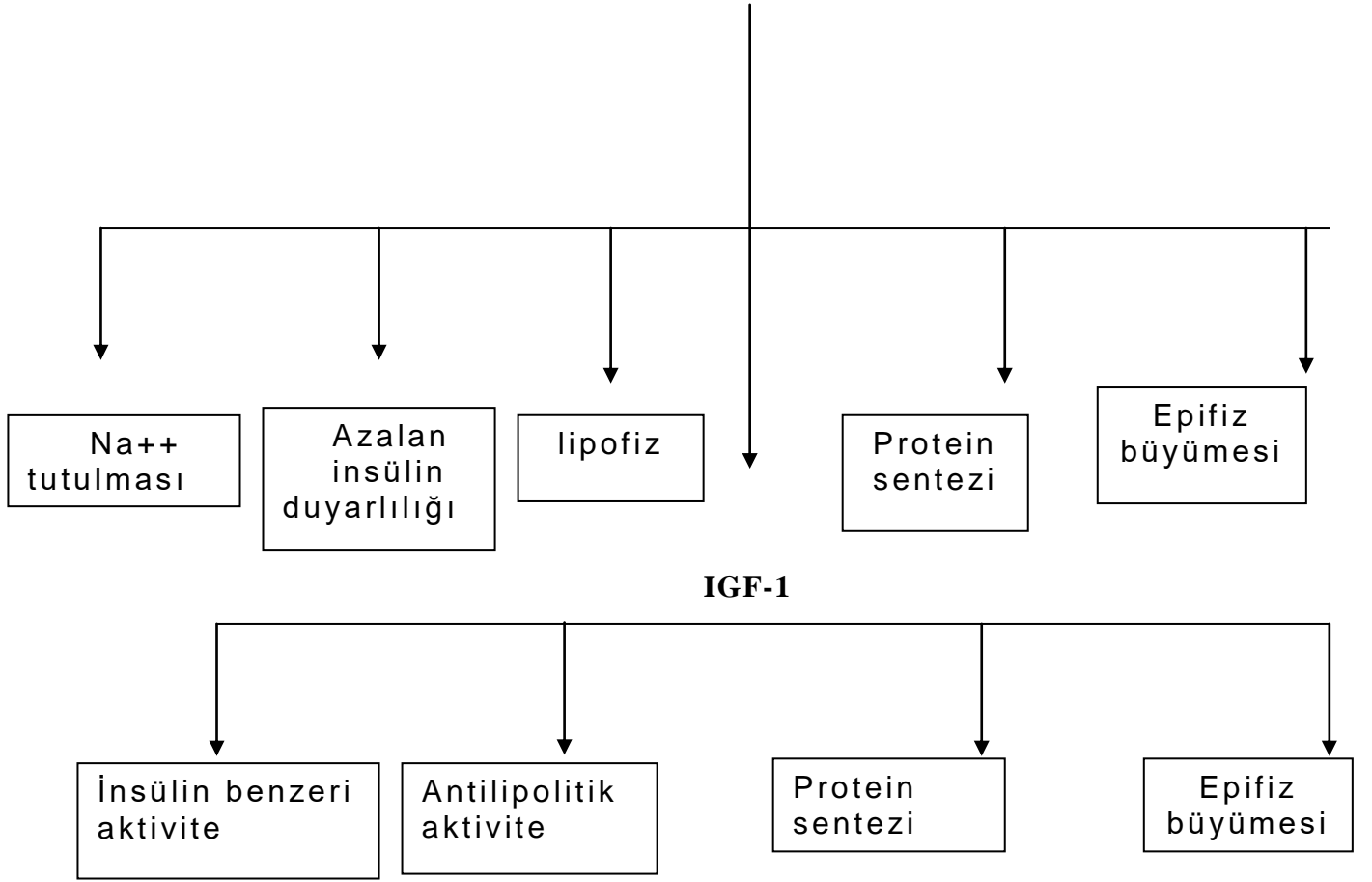
Büyüyen kuşlarda, GH:GH reseptörünün, IGF-1 eksenini ile olan ilişkisi endokrin duruma, genetiğe, yaşa ve beslenme şekline bağlı olarak değişir. Büyüme hormonu düzeyleri açlıkta artar. Fakat plazma IGF-1 seviyesi baskılanır (41). Cıvıvlerde GH:IGF-1 eksenini tanımlayıcı bir başka faktörde yaştır. IGF-1 mRNA seviyesinin 4 haftalıkken dokularda en üst seviyeye eriştiği fakat 10 haftadan sonra bazal düzeye düştüğü görülmüştür (41). İnsanda erken fetal periyotlar ve organogenezis boyunca büyüme ve gelişimde düzenleyici rol oynayan IGF'ler gelişimin erken dönemlerinde

yüksek düzeydedir (20,63). Plazma IGF-1 düzeyi çocukluk süresince yükselerek, 13-17 yaşlar arasında en yüksek noktasına ulaşır. Buna karşın, IGF-2 düzeyi doğumdan hemen önceki büyüme dönemindeki (prenatal büyüme) değerler düzeyinde kalır (72).

2.5. IGF'LERİN ETKİ MEKANİZMASI

Büyüme hormonunun (GH) etki mekanizması hakkındaki görüşler, yeni bilgiler elde edildikçe bir çok değişikliğe uğramıştır. Önceleri büyüme hormonunun dokular üzerine direkt etki ederek büyümeyi sağladığı düşünülürken, bugün bu etkisini esas olarak IGF'ler aracılığı ile yaptığı anlaşılmıştır (19). Ancak, hipofisektomili sıçanların proksimal tibial epifiz içerisine büyüme hormonu injekte edildiğinde, sadece verilen tarafta kıkırdak kalınlığını arttırdığı ve diğer dokular gibi kıkırdak dokusunda IGF-1 sentezlemeye başladığı saptanmıştır (19). Bu sonuçlar şu şekilde açıklanmıştır: Büyüme hormonunun kıkırdak doku üzerine etkisiyle kıkırdak doku kök hücrelerinin IGF-1'e yanıt verebilen hücreler haline dönüştüğü ve daha sonra yerel olarak IGF-1 yapımı ve salınımını arttırdığı gözlenmiştir (19). Dolaşımdaki IGF-1 de uzun kemiklerin uçlarındaki (epifiz) kıkırdaklaşmanın başlamasını, kıkırdak dokunun gelişimini ve uzamasını arttırmıştır. Bunu kıkırdağın yeni kemiğe dönüşümü izlemiş ve kemik gövdesi uzamıştır (72).

Büyüme hormonu kısa süreli, fakat IGF-1 uzun süreli etkilidir (21). Büyüme hormonu kanda plazma proteinlerine ancak zayıf olarak bağlanır ve bu yüzden kandan dokuya hızla geçer. Kandaki yarılanma süresi 20 dakikadan daha kısadır (21). Aksine, IGF-1, kanda bulunan kendisi gibi büyüme hormonuna cevap olarak oluşan bir taşıyıcı proteine sıkıca bağlanır. Bunun sonucu olarak, IGF-1 kandan dokuya yavaş olarak geçer ve yarı ömrü yaklaşık olarak 20 saattir (21). GH:IGF-1 ile ilgili biyolojik mekanizmalar şekil-2'de şematize edilmiştir.



Şekil 2. Büyüme hormonu (GH) ve IGF-1'in etki ettiği biyolojik mekanizmaların akış özeti (12).

2.6. IGF'LERİN (IGF-1 ve IGF-2) KEMİK DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİ

İnsülin-benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), bir çok dokunun özellikle de iskeletin büyüme ve farklılaşmasında önemli bir etkidir (57). IGF-1, Tip-1 kollagen sentezini ve hücre replikasyonunu artırır (33,56). Tip-1 kollagen sentezi ve matriks oluşumu endosteumda yoğunlaşırken, hücre replikasyon artışı daha çok periosteumda meydana gelir (33). IGF-2, hücre replikasyonu ve kollagen sentezindeki artış ve kollagen yıkımını azaltması bakımından IGF-1 ile aynı etkileri gösterdiği kanıtlanmıştır (33). Kemik hücre kültüründe, IGF-2, Tip-1 kollagen sentezi üzerine IGF-1'den daha etkiliyken, kemik gelişimi üzerine IGF-1'in daha etkili olduğu gösterilmiştir (33).

IGF-1'in, osteoblastlar üzerine anabolik etkilerinin olduğu in vivo ve in vitro çalışmalarla kanıtlanmıştır (74). Ayrıca bu çalışmalar sonucunda, IGF-1'in kondrosit ve kemik hücreleri oluşumunu uyardığı ve trabeküler kemik büyümesinin yanı sıra uzunluğuna kemik gelişiminide kontrol ettiği gösterilmiştir (57, 74). Uzunluğuna kemik büyümesindeki etkisi, kondrositlerin osteoblastlara dönüşmesiyle, periostal osteoblastlar üzerinden dıştaki kortikal zarın genişlemesiyle olur (57).

Kemik şekillenmesinden sorumlu bütün hücreler (osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar) IGF-1'i üretebilirler (58). Osteoblast hücre kültürüyle yapılan çalışmalarda, IGF'lerin gelişimin bütün safhalarında osteoblast fonksiyonunu (proliferasyon, farklılaşma, matriks üretimi, mineralleşme) arttırdığı görülmüştür (58,31).

İnsan ve kemirgenlerde yapılan in vitro çalışmalar, tip-1 IGF reseptörünün bu hücrelerde DNA sentezi, protein sentezi ve osteoblastların olgunlaşmasını ve farklılaşmasını stimüle ettiğini göstermiştir. IGF-1 ve IGF-2'nin her ikiside fötal rat osteoblastlarında kollagen ekspresyonunda artışı sağladığı bildirilmiştir (58). IGF-1'in kemik gelişimi üzerine etkilerinin incelenmesi sonucu elde edilen veriler, IGF-1 injekte edilmiş farelerde, IGF-1'in trabeküler ve longitudinal kemikleşme oranını arttırdığı tespit edilmiştir (74).

IGF-1'in osteoblastlar üzerine anabolik etkiye sahip olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, osteoklastlar ve kemik rezorpsiyonu üzerine etkileri tam olarak açıklanamamıştır (31). Kemik rezorpsiyonuyla ilgili in vitro çalışmalarda elde edilen bulgular, IGF-1'in uzun süre kemik iliği kültüründe osteoklast ve benzeri hücrelerin oluşumunu arttırdığı ve kemik doku kültürlerine ek olarak, IGF-1'in kemik rezorpsiyonunu stimüle eden etkiler üzerine inhibitör gibi davrandığı da saptanmıştır (31, 67).

In vivo ve in vitro çalışmalar sonucunda, GH ve IGF-1'in, osteoklastların kemik rezorpsiyonunda, parakrin arabulucularının salınımını uyararak kemik emilimine indirekt olarak etki edebildiği gösterilmiştir (67).

Ibbotson ve arkadaşları (29), IGF-1'in osteoklastlar üzerine direkt etkileri olduğunu göstermişlerdir. Slootweg ve arkadaşları (65), IGF-1'in osteoklastların şekillenmesini stimüle ettiğini fakat farklılaşmasını etkilemediğini bildirmişlerdir (31). Hill ve arkadaşları (22), IGF-1'nin hem direkt hemde indirekt etkileriyle osteoklastik aktiviteyi stimüle ettiğini belirlemişlerdir.

Rekombinant insan IGF-1 ile muamele edilen sağlıklı postmenapozal kadınlarda osteoblastik ve osteoklastik aktivite değerlerini saptamak amacıyla yapılan çalışmalarda, rekombinant insan GH ile muamele edilen bireylerin, IGF-1 konsantrasyonu ile birlikte, kemik oluşumunu ve kemik onarımının arttırdığı gözlenmiştir (61).

GH ve IGF-1 eksikliği olan insan ve hayvanlara IGF-1 ve GH'nin uygulanmasıyla uzunluğuna kemik büyümesinin arttığı saptanmıştır (29). IGF-1 ve IGF-1 reseptörünün (IGF-IR) homolog gen kombinasyonu ile elimine edildiği (knock-out) farelerde, IGF-1 sinyal yolunun doku büyüme ve gelişmesinde çok önemli olduğunu göstermiştir (29). IGF-1 eksikliği olan farelerde embriyonik dönemde boy büyümesinin azaldığı ve sonraki postnatal büyümenin oldukça geciktiği görülmüştür. IGF-1 geni ortadan kaldırılmış hastalarda intrauterin büyümenin geciktiği ve postnatal büyümenin gerçekleşmediği görülmüştür. Bunun yanında, rekombinant IGF-1'in (rhIGF-1) hipofizektomi yapılan ratlarda vücut ağırlığını arttırdığı tespit

edilmiştir (29). Bu deneysel çalışmalar ve klinik incelemeler, IGF-1 ve reseptörünün normal ekspresyonunun kemik doku büyüme ve gelişmesinde kritik rol oynadığını açıkça göstermektedir (29).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan 40 adet döllü Japon Bıldırcını (*Coturnix coturnix japonica*) Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinden sağlandı.

3.1. Enjeksiyon prosedürü: İnkübasyonun 3. günündeki bıldırcın yumurtalarının küt uçları % 70'lik etanol ile dezenfekte edildikten sonra bu uçların bir noktasından, chorio-allantoic zara zarar vermeyecek şekilde dişçi matkabı, (dental drill bit) küçük bir delik açıldı. Açılan delikten, ucuna 22 ölçekli enjektör iğnesi takılı otomatik pipetle, her bir yumurtanın içine bir kez olmak üzere 10 ml asetik asit ve % 0.1'lik BSA (Bovine Serum Albumin) ile hazırlanan rekombinant human IGF-1 (rhIGF-1, 100 ng/embriyo) enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra açılan delik küçük bir yapıştırıcı (sticker) ile kapatılarak kontrol grubu yumurtalar ile birlikte nem oranı % 86-87, sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanan inkübatöre konuldu (17). Uygulamada kullanılan rekombinant human IGF-1 (rhIGF-1) Dr. A. F. Parlow (UCLA, CA, USA) tarafından sağlandı.

3.2. Embriyoların Toplanması ve Doku Preparatlarının Hazırlanması:

Yumurtaların kuluçka makinasına ilk konulduğu saat "0" zaman dilimi kabul edilip, 7. günden itibaren kuluçkadan çıkış gününe kadar (16. gün) düzenli olarak her 24 saatte, enjeksiyon yapılan grup ve kontrol grubundan yumurtalar toplandı. Embriyoların sırt omur kemiği alınarak bouin ve %10'luk formol-alkolde tespit edildi.

Tespit olan doku örnekleri; dereceli alkoller (%70, %80, %90 ve %100), metil benzoat ve benzollerden geçirildikten sonra parafinle

bloklanarak her bloktan 6 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitlere rutin incelemeler için Crossmanın üçlü boyaması yapıldı (13).

Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi. Bulgular mikrofotografi ile tespit edildi. Mikrometrik ölçümler mikroskoba uyarlanan oküler mikrometre yardımıyla yapıldı. Hücre sayımları birim alanda (0.01 mm², bir birim alan kabul edildi.) ve notokordun her iki yanında paralel olacak şekilde yapıldı.

İstatistiki değerlendirme için minitab programı ile t-testi uygulandı (42).

5. BULGULAR

İnkübasyonun 7.günü; Sırt omur kemiği gelişimini incelediğimiz Japon bıldırcınlarında, inkübasyonun 7. gününde, kontrol grubu embriyolarda, kıkırdak hücreleri oluşmuştu fakat sırt omur kemiğini oluşturacak taslağın sınırları belirginleşmemiş olduğundan diğer organ taslaklarını oluşturacak hücrelerden ayırt edilememiştir (Şekil-3). Bu nedenle hücre sayım işlemi gerçekleştirilememiştir. Hücreler, özellikle notokordun çevresinde belirgin olarak ayırt edildi.

rhIGF-1 enjekte edilmiş embriyolarda, hücreler kontrol grubuna oranla daha fazla belirginleşmeye başlamıştı ve kıkırdak hücreleri ayırt edilebilmekle birlikte sırt omur kemiğini oluşturacak olan taslak çevredeki diğer organ taslaklarından ayırt edilebilmekteydi (Şekil-3). Periferde daha küçük olan hücrelerin merkeze yaklaştıkça büyüklüğünün arttığı görüldü.

İnkübasyonun 8.günü; Kontrol grubunda bulgular, 7.gün kontrol grubuyla benzer özellikler gösterdiği görülmüştür. Buna rağmen, merkezdeki hücreler kenardaki hücelere oranla daha belirgin olmakla beraber, sınırları tam olarak ayırt edilemediğinden sayım işlemi gerçekleştirilememiştir (Şekil-4B). 7. gün kontrol grubunda olduğu gibi kemik taslağını oluşturacak sınırlar 8. gün embriyolarında kesin olarak ayırt edilememiştir.

rhIGF-1 njekte edilmiş grupta, gelişmenin kontrol grubuna göre daha ileri olduğu gözlemlendi (Şekil-4A). rhIGF-1 enjekte edilmiş gruplarda sırt omur kemiğini oluşturacak taslağın tam şekillendiği görülmüştür. Kıkırdak hücreleri belirgin olarak ayırt edilmiştir.

İnkübasyonun 9. günü; Kontrol grubundaki gelişmenin bir önceki güne göre daha ileri düzeyde olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu embriyolarında kıkırdak hücreleri önceki güne oranla belirgin olup sırt omur kemiğini oluşturacak olan taslak sınırları ayırt edilmeye başlandı (Şekil-5B). İnkübasyonun bu günündeki kontrol grubunda birim alanda kıkırdak hücrelerinin sayısı ortalama 104.4 olarak belirlendi (Tablo 1).

rhIGF-1 uygulanan grupta, kıkırdak hücrelerinin büyüklüklerinin önceki gün rhIGF-1 uygulanan gruba göre arttığı ve bu hücrelerin çekirdeklerinin daha belirgin olduğu görüldü. Ayrıca, kemik taslağını oluşturan alanda genişledi (Şekil-5A). rhIGF-1 uygulanan grupta birim alanda kıkırdak hücreleri sayısı ortalama 165.2 olarak tespit edildi (Tablo 1). İnkübasyonun 9. gününde rhIGF-1 uygulanan grupla kontrol grubundaki kıkırdak hücre sayıları arasındaki farkın istatistikî açıdan ($P < 0.05$) önemli olduğu saptandı.

İnkübasyonun 10. günü; Kontrol grubunda, kemiği oluşturacak alan diğer günlere göre daha belirgin olmakla beraber merkeze yakın hücrelerdeki büyüme oranının, önceki güne oranla daha fazla artmış olarak görüldü. Hücreler arasında düzenli bir sıralanmanın başladığı görülmekteydi (Şekil-7). Bu gündeki kıkırdak hücre sayısının birim alanda ortalama, 239.00 olarak bulundu (Tablo 1).

rhIGF-1 uygulanan grupta, önceki gün büyümeye başlayan hücrelerde, özellikle notokordun çevresinde hipertrofi görüldü. Ayrıca, hipertropik ve proliferatif zon ayırt edilmekle beraber hipertrofiye uğrayan hücrelerin çekirdekleri kenara doğru itilmiş olarak görüldü (Şekil-6). Kıkırdak hücrelerinin birim alandaki ortalama sayısı, 274.6 olarak bulundu (Tablo 1). İnkübasyonun 10. gününde, kıkırdak hücre sayısının birim

alandaki artışının, rhIGF-1 uygulanan grupta, kontrol grubuna oranla daha fazla olduğu ve iki grup kıyaslandığında farkın istatistiki açıdan ($P<0.05$) önemli olduğu saptandı.

İnkübasyonun 11. günü; Kontrol grubunda, kıkırdak hücrelerinin önceki güne göre hem daha belirgin hem de daha büyük olduğu görüldü. Özellikle hücre bölünmesinin gerçekleştiği alanlarda hücreler yoğun olarak gözlendi (Şekil-9). Bu günde kontrol grubunda birim alandaki kondrosit sayısı ortalama olarak 278.00 olarak bulundu (Tablo 1). rhIGF-1 uygulanan grupta, ilk kemikleşme merkezlerinin gözlendiği gün inkübasyonun 11. günüdür. Kemikleşmenin başladığı bölgede kan damarları gözlendi (Şekil-8). rhIGF-1 uygulanan grupta, kemik odaklarının ve hipertrofi alanlarının artması nedeniyle birim alana düşen kıkırdak hücre sayısının azalmış olduğu tespit edildi. Birim alandaki kıkırdak hücre sayısı ortalama olarak 250.6 olarak belirlendi (Tablo 1).

rhIGF-1 uygulanan grup ile kontrol grubu kondrosit sayıları arasında birim alandaki farkın istatistiki açıdan ($P<0.05$) önemli olduğu saptandı (Tablo 1).

İnkübasyonun 12. günü; Kontrol grubunda ilk kemikleşme inkübasyonun 12. gününde görüldü (Şekil-11). Gerek hipertrofi alanlarının artması gerekse kondrositlerin büyüklüğünün artmasıyla bir önceki güne oranla gelişimin daha ileri düzeyde olduğu görüldü (Şekil-11). Birim alandaki kıkırdak hücre sayısı, 263.6 olarak bulundu (Tablo 1). rhIGF-1 uygulanan grupta, kemikleşme merkezlerinin genişlemeye başladığı gözlendi. Özellikle notokordun çevresinde geniş alanı kaplayan kemikleşme zonu görüldü (Şekil-10). Bu günde, rhIGF-1 uygulanan grupta önceki günde olduğu gibi kondrosit hücre sayısı azaldı. Birim alanda ortalama kondrosit sayısı, 246.4 olarak bulundu. rhIGF-1 uygulanan grup ile kontrol grubu arasında farkın ($P<0.05$) önemli olduğu ve rhIGF-1 enjekte edilen grubun gelişiminin daha hızlı olduğu görüldü.

İnkübasyonun 13. günü; Kontrol grubunda, odaklar halinde kemikleşme merkezleri tespit edildi. Diğer alanlardaki hücrelerin ise özellikle notokorda yakın alanlardaki kıkırdak hücreleri çaplarının artmış olduğu görüldü. Hipertropik zon ve proliferatif zonda ayırt edildi (Şekil-13). Birim alandaki ortalama kondrosit sayısı 265.20 olarak bulundu (Tablo 1).

rhIGF-1 uygulanan grupta, kemikleşme alanlarının son derece büyüdüğü ve diğer alanlardaki kıkırdak hücrelerinin çaplarının ise artmış olduğu görüldü. Kemikleşme odaklar halinde gerçekleşmeyip özellikle önceki günlerde görülen fakat 13. günden itibaren kaybolan notokordun bulunduğu alanda genişlemiş şekilde kemikleşme zonu olarak gözlemlendi. Tüm alan kemikleşme zonu, hipertropik zon ve proliferatif zon olarak bölgelere ayrılmış olarak görüldü (Şekil-12). Birim alanda ortalama kıkırdak hücre sayısı, 237.2 olarak sayıldı (Tablo 1).

rhIGF-1 uygulanan grupta, kontrol grubunda birim alandaki ortalama hücre sayısı arasındaki farkın istatistikî açıdan ($P<0.05$) önemli olduğu saptandı.

İnkübasyonun 14. günü; Kontrol grubu embriyolarında, kemik odakları sayıların arttığı görüldü. Bu alanların dışında özellikle notokorda yakın bölgelerde hipertrofiye uğrayan hücrelerle kenara yakın olarak bulunan proliferatif zondaki hücreler ayırt edildi (Şekil-15). Bugünde birim alanda sayılan kıkırdak hücre sayısı, 236.0 olarak belirlendi.

rhIGF-1 uygulanan grupta ise, 13. günde genişlemeye başlayan kemikleşme bölgesinde genişlemenin daha fazla arttığı görüldü. Önceki günlerde olduğu gibi hipertrofik zon ile proliferatif zon ayırt edildi (Şekil-14). Birim alanda kıkırdak hücre sayısı ortalama 179.0 olarak sayıldı.

rhIGF-1 uygulanan grup ile kontrol grubunun birim alandaki hücre sayısı arasındaki farkın istatistikî açıdan $P<0.05$ düzeyinde önemli olduğu bulundu.

İnkübasyonun 15.günü; Kontrol grubunda, kemikleşme merkezinin bir önceki güne oranla daha fazla büyüdüğü ve notokordun kaybolduğu alanda kemikleşme merkezinin oluştuğu gözlemlendi. Bu alan dışındaki diğer bölgelerde ise odaklar halinde irili ufaklı kemikleşme merkezleri ayırt edildi (Şekil-17). Bugünde birim alandaki kıkırdak hücre sayısı 236.0 olarak bulundu.

rhIGF-1 uygulanan grupta, kemikleşme zonunun önceki güne oranla daha fazla genişlediği bu alanda trabeküllerin oluştuğu görüldü. Kemikleşme zonu, hipertrofik zon ve proliferatif zon ayırt edildi (Şekil-16). Birim alandaki hücre sayısı 174.60 olarak bulundu. Her iki grup birim alandaki hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında, ($P<0.05$) istatistiki açıdan fark olduğu bulundu.

İnkübasyonun 16. günü; rhIGF-1 uygulanan grupta kemikleşme zonunun tüm alana yayıldığı görüldü. Önceki güne paralel olarak hipertrofik zon, proliferatif zon ayırt edildi ve trabeküllerde görüldü (Şekil-18). rhIGF-1 uygulanan grupta birim alanda ortalama kıkırdak hücre sayısı, 149.0 olarak bulundu.

Kontrol grubunda, çok sayıda büyüklükleri farklı kemik odakları görüldü. Bu odaklar önceki güne oranla daha genişlemiş olduğu görüldü. İnkübasyonun bugününde notokordun kaybolduğu, yerini kemikleşme alanlarının doldurduğu gözlemlendi (Şekil-19). Kontrol grubunda birim alandaki hücre sayısı ortalama 187.80 olarak bulundu.

Kontrol grubu ve rhIGF-1 enjekte edilen grup arasında birim alanda sayılan hücre sayısı kıyaslandığında, iki grup arasında farkın ($P<0.05$) önemli olduğu tespit edildi.

Tablo 1. 7. günden 16. güne kadar embriyonal gelişim süresince, rhIGF-1 enjekte edilmiş ve kontrol grubu embriyolarında sırt omur kemiğinde

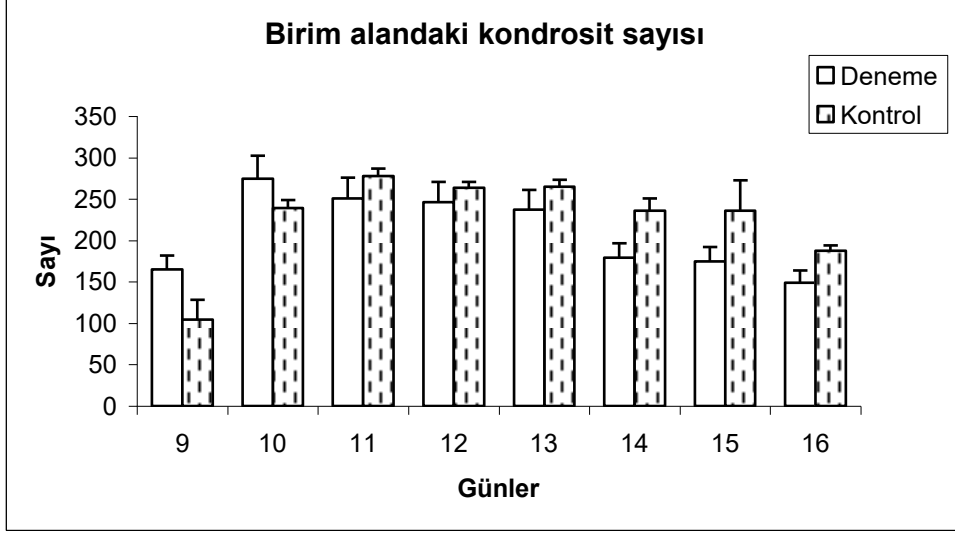
kondrosit hücre sayılarının gruplar arasında istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ve t-testi değerleri.

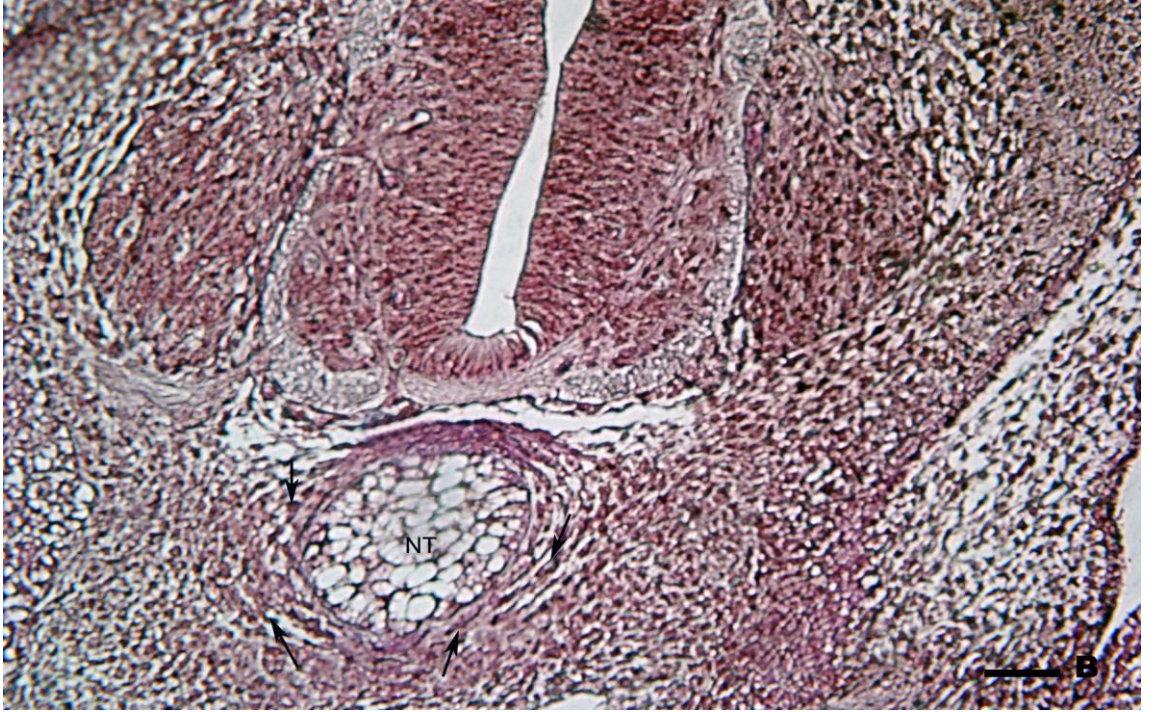
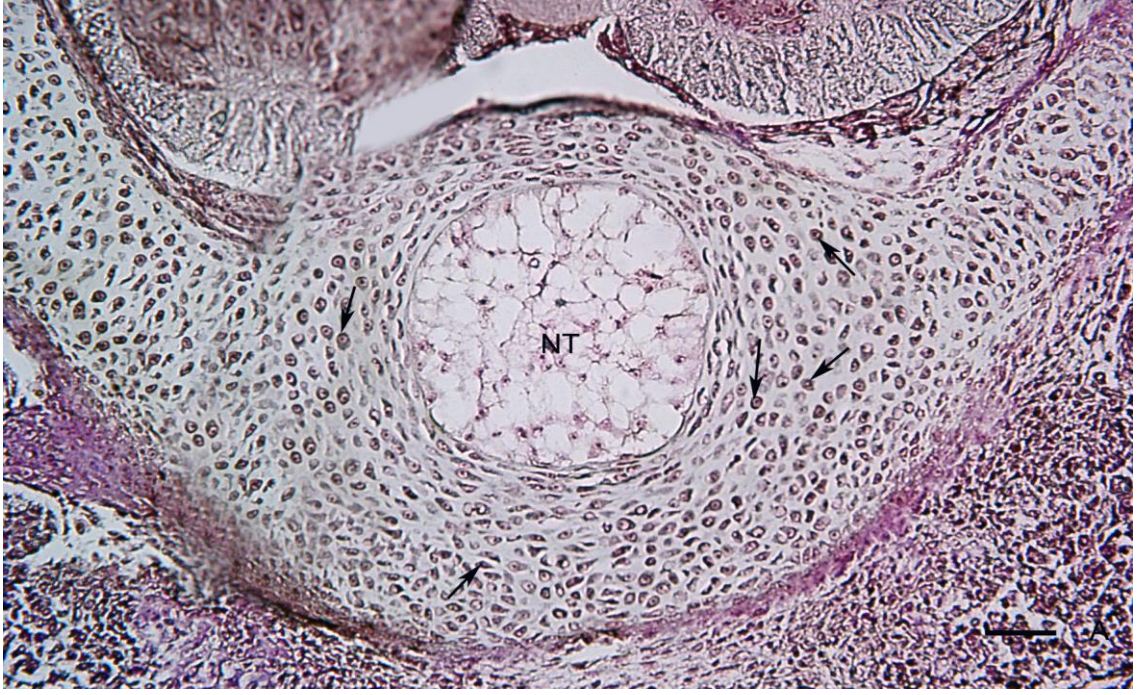
Gün	n	IGF-1 uygulanan grup	Kontrol grubu	t-değeri
9	10	165.20±2.9	104.40±2.9	5.55
10	10	274.60± 2.7	239.00±4.3	6.96
11	10	250.60± 5.5	278.00±4.0	-4.00
12	10	246.40±1.9	263.60±3.2	-4.58
13	10	237.20±6.2	265.20±3.7	-3.89
14	10	179.00±8.0	236.00±6.5	-5.52
15	10	174.60±2.9	236.2±16	-3.71
16	10	149.00±8.9	1±2.787.60	-4.17

P<0.05

n: sayım yapılan birim alan sayısı.

Grafik 1. rhIGF-1 uygulanan ve kontrol grubu embriyolarında sırt omur kemiğinde hücre sayısının yaşa bağlı değişimi.

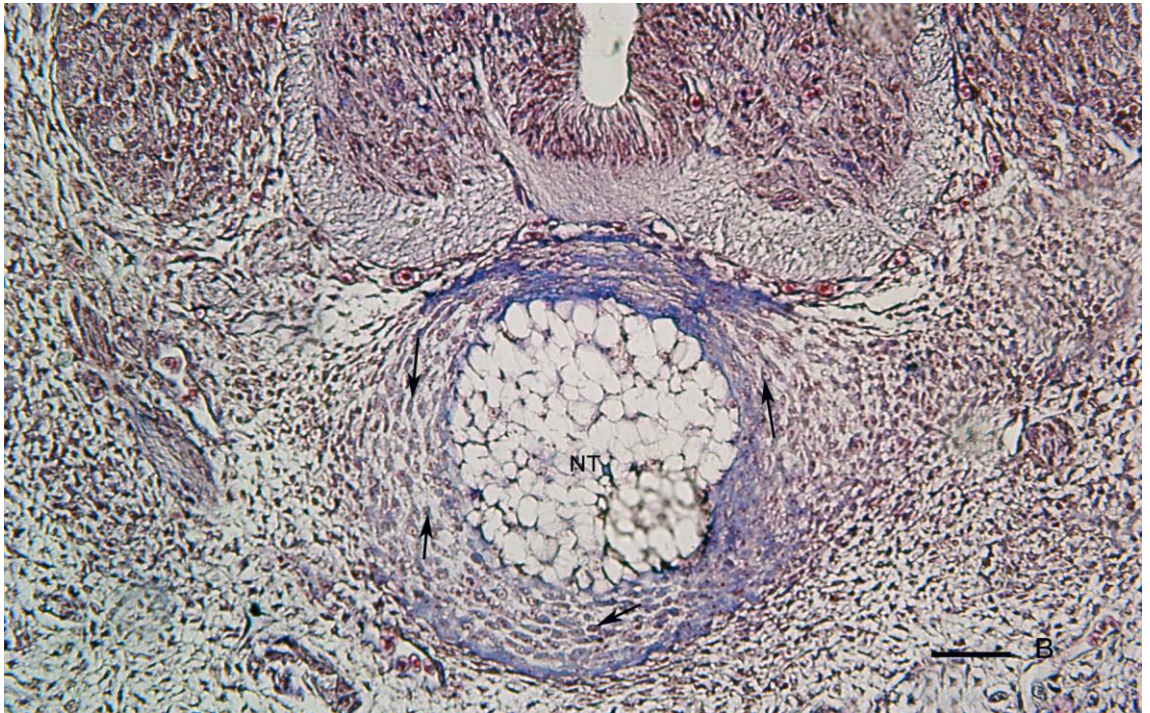
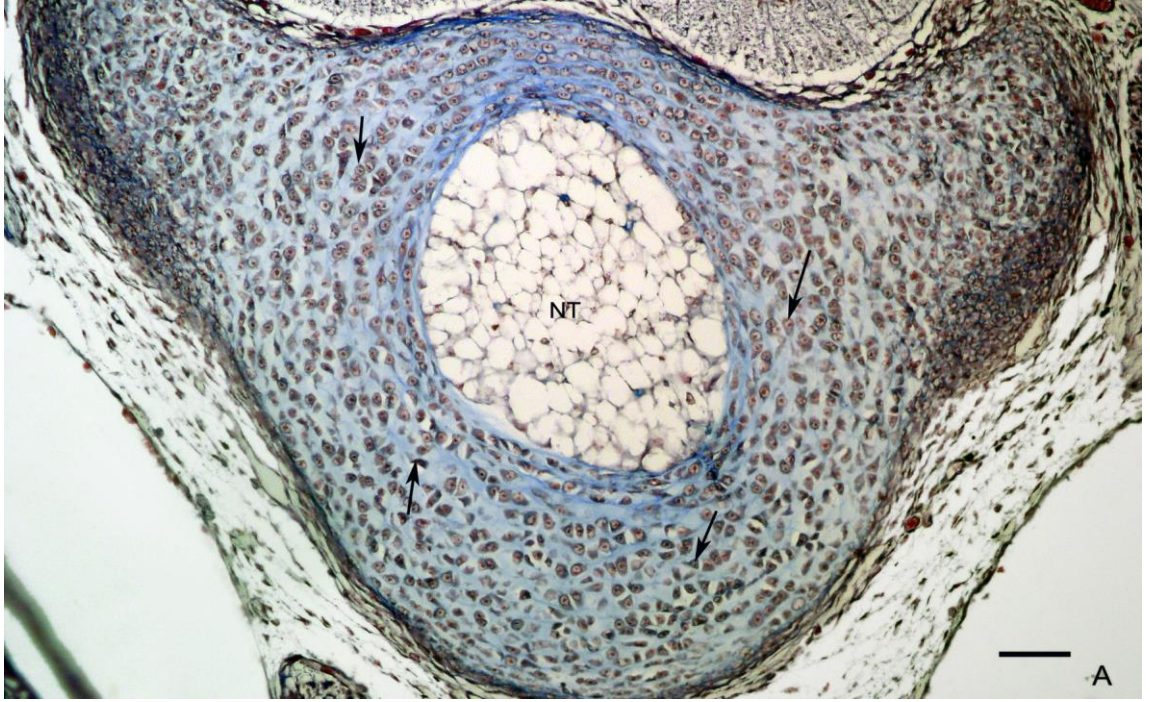




Şekil 3. İnkübasyonun 7. günü kıkırdak doku.

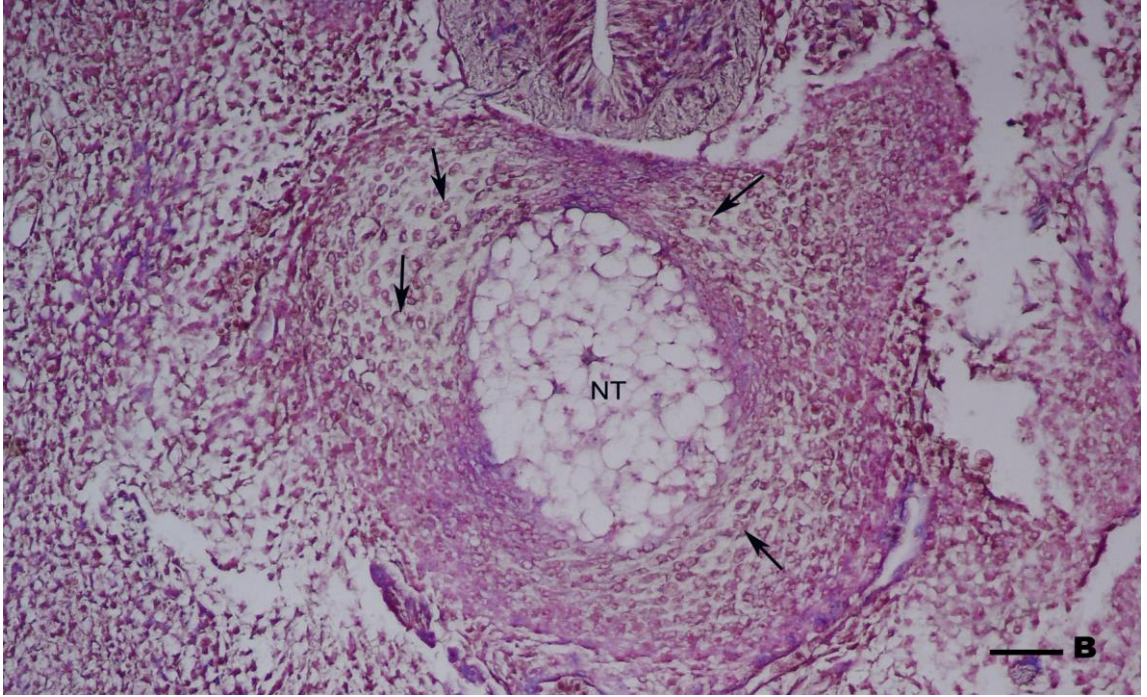
A: rhIGF-1 enjekte edilen grup. B: kontrol grubu. Oklar: kıkırdak hücreleri.

NT: Notokord. Bar: 100 µm.



Şekil 4. İnkübasyonun 8. günü kıkırdak doku.

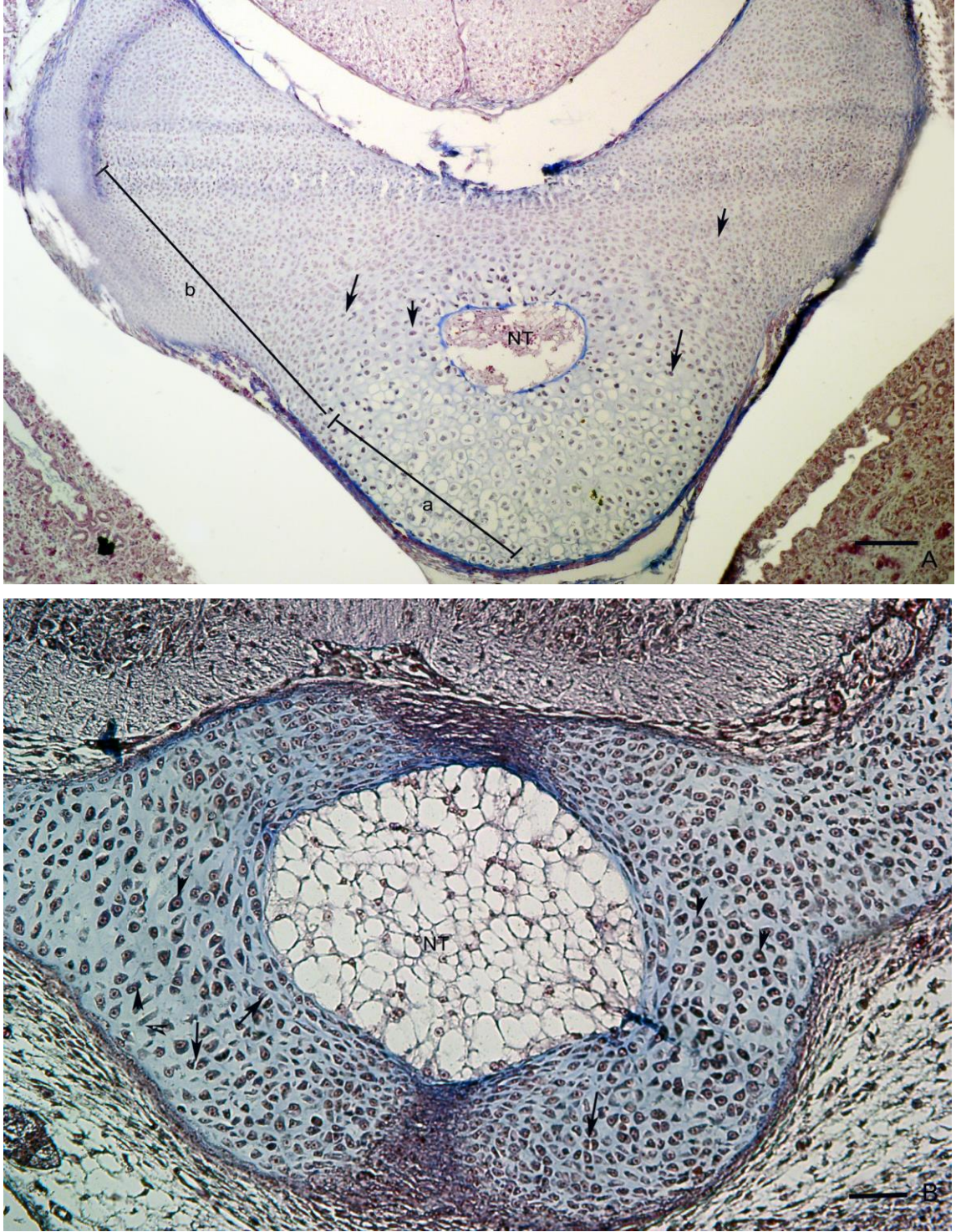
A: rhIGF-1 enjekte edilen grup. B: kontrol grubu. Oklar: kıkırdak hücreleri. NT: Notokord Bar: 100 µm.



Şekil 5. İnkübasyonun 9. günü kıkırdak hücrelerinde büyüme.

A: rhIGF-1 enjekte edilen grup. B: kontrol grubu. Oklar: kıkırdak hücreleri.

NT:Notokord. Bar: 100 µm.

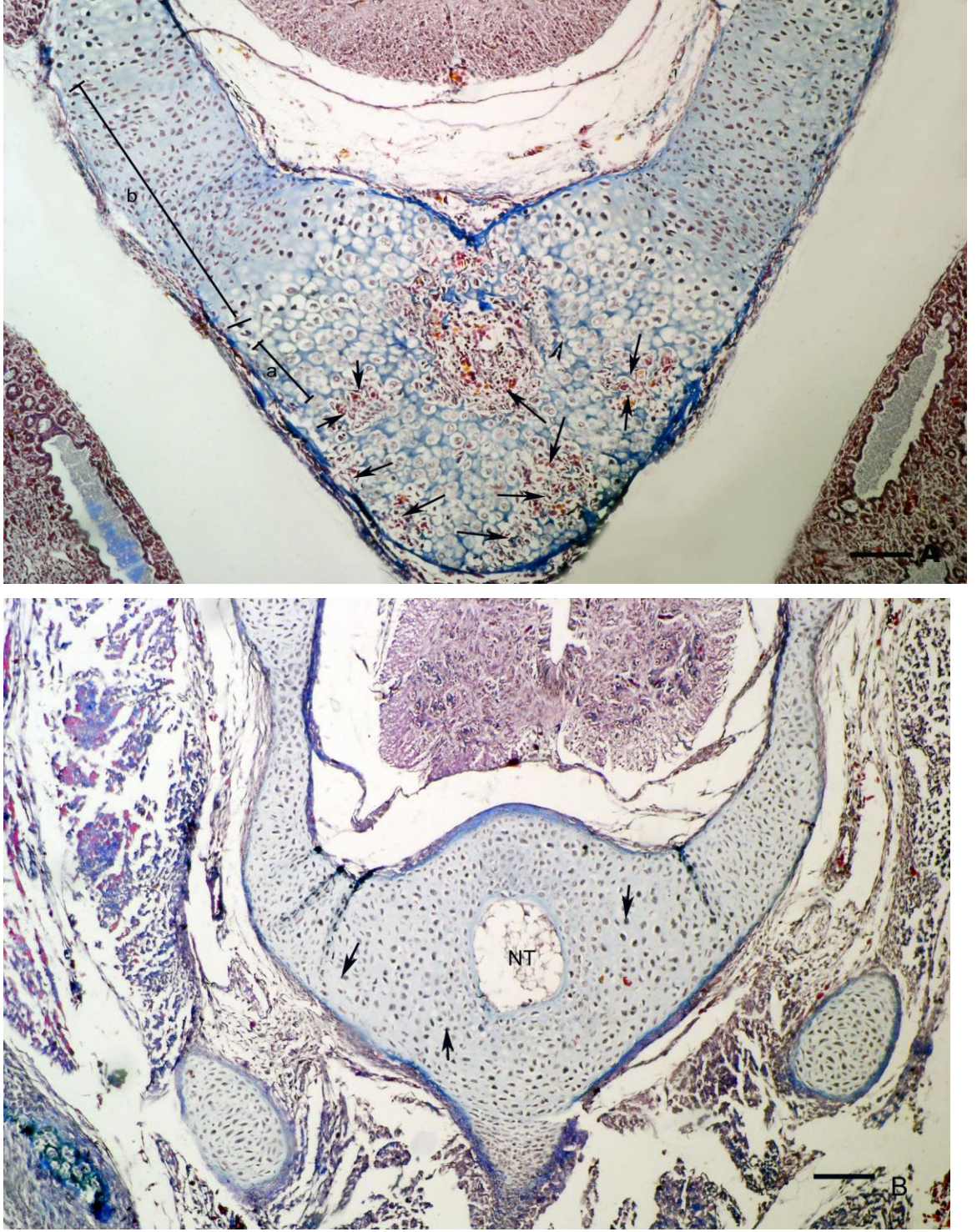


Şekil 6. İnkübasyonun 10. günü

A: rhIGF-1 enjekte edilen grup. a: hipertrofik zon. b: proliferatif zon. Oklar: Kıkırdak hücreleri.

B: kontrol grubu. Ok başları: kıkırdak hücreleri. Oklar: İzogen gruplar

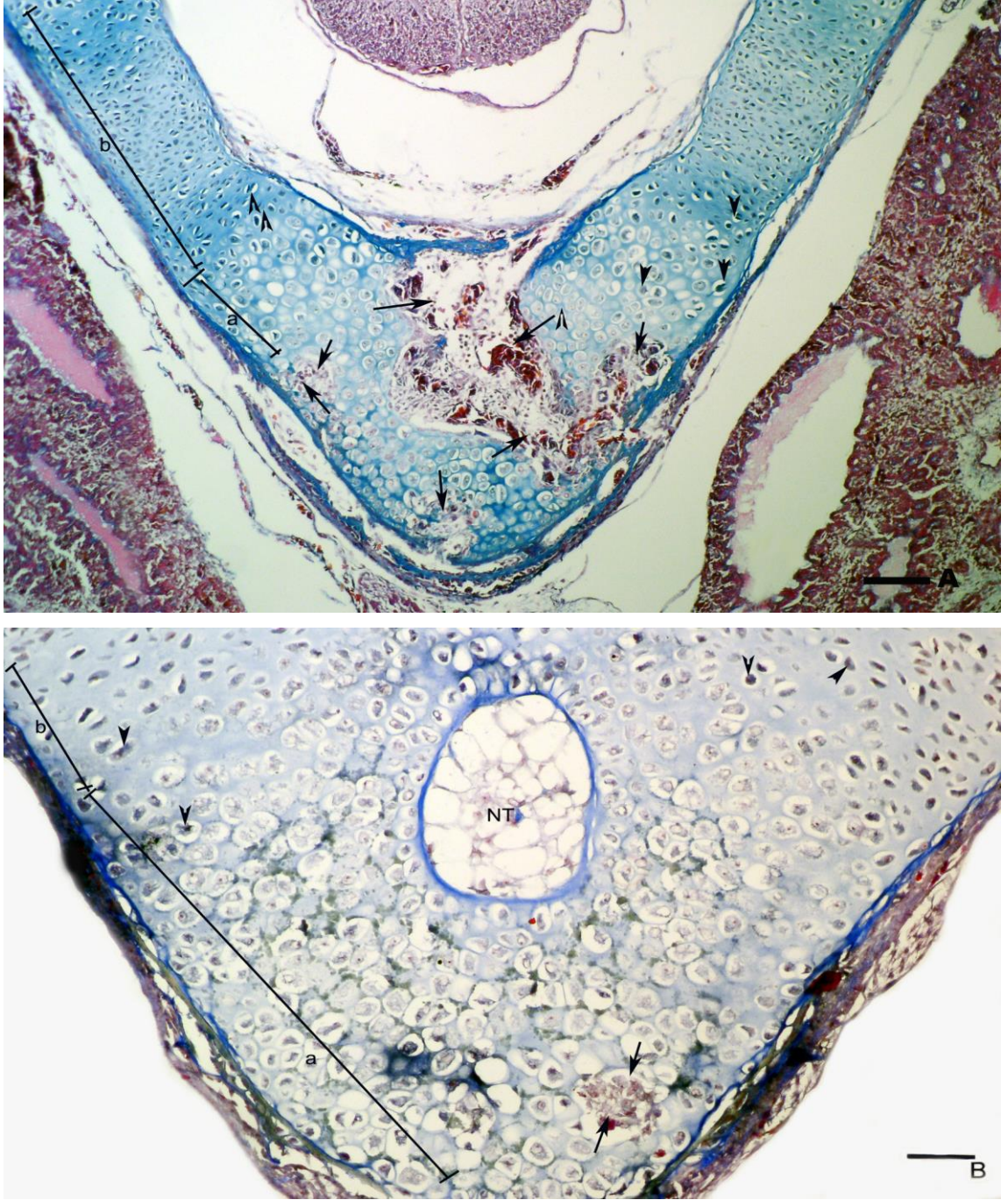
NT: Notokord. Bar: 100 μm.



Şekil 7. İnkübasyonun 11. günü.

A: rhIGF-1 enjekte edilmiş grup. a.Hipertrofik zon. b.Proliferatif zon. Oklar: Kemikleşme merkezleri.

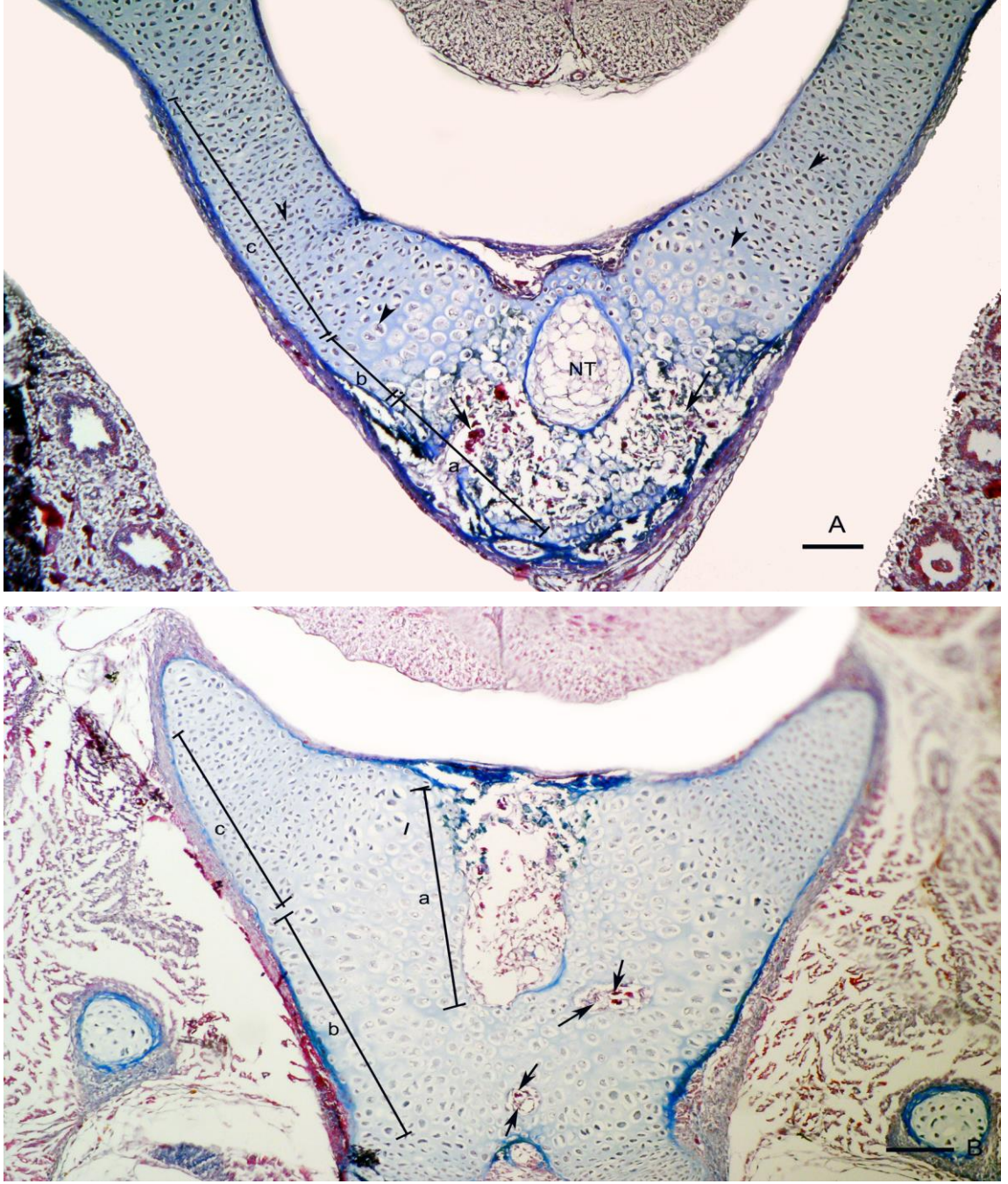
B: Kontrol grubu. Oklar: Kıkırdak hücreleri. NT:Notokord. Bar: 200 µm.



Şekil 8. İnkübasyonun 12. günü.

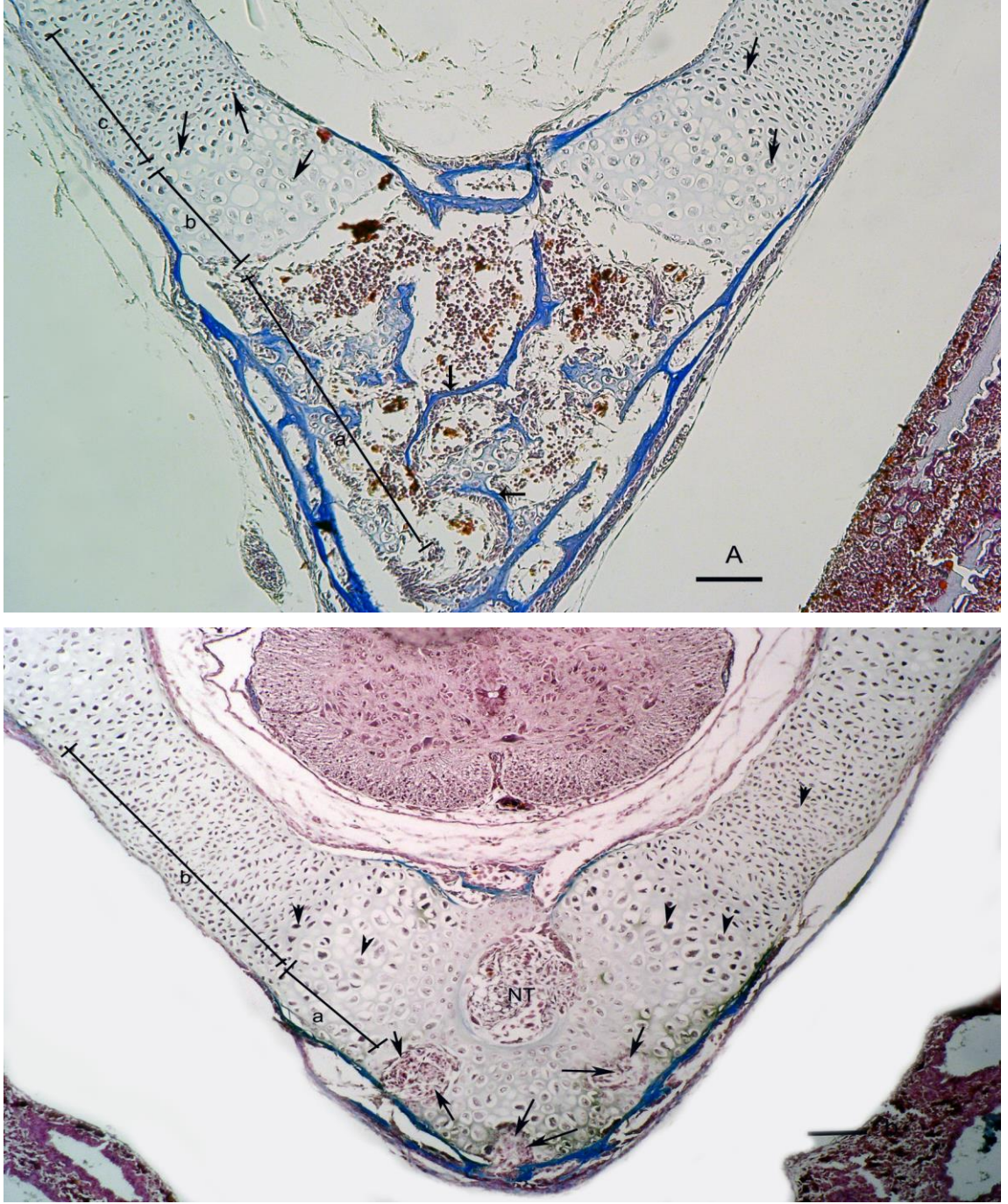
A: rhIGF-1 enjekte edilen Grup. Ok başları: Kıkırdak hücreleri. Oklar: Kemikleşme merkezleri. a: Kemikleşme zonu. b: Hipertrofik zon. c: proliferatif zon.. Bar: 200 µm.

B: Kontrol grubu. a: Hipertrofik zon. b:Proliferatif zon. Oklar: Kemikleşme merkezi. OK başları: Kıkırdak hücreleri. NT: Notokord. Bar: 100 µm.



Şekil 9. İnkübasyonun 13. günü

A: rhIGF-1 enjekte edilen Grup. B: Kontrol grubu. Oklar: Kemikleşme merkezleri. Ok başları: Kıkırdak hücreleri. a: Hipertrofik zon. b: Proliferatif zon. NT: Notokord. Bar: 200 μ m.



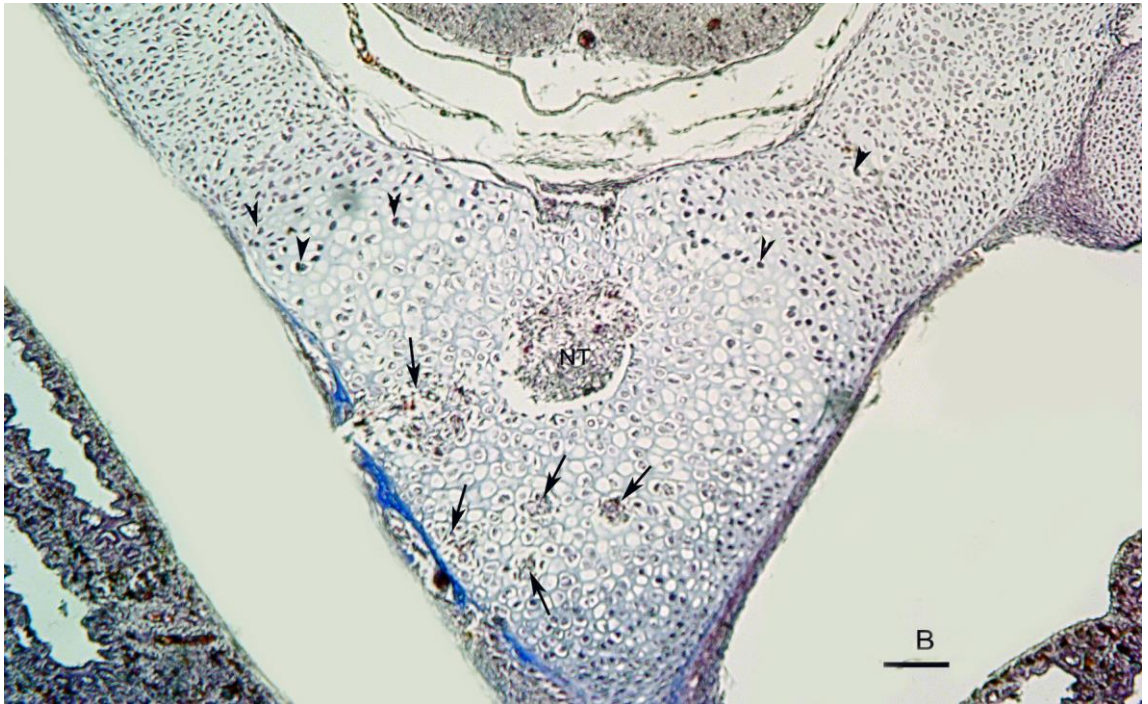
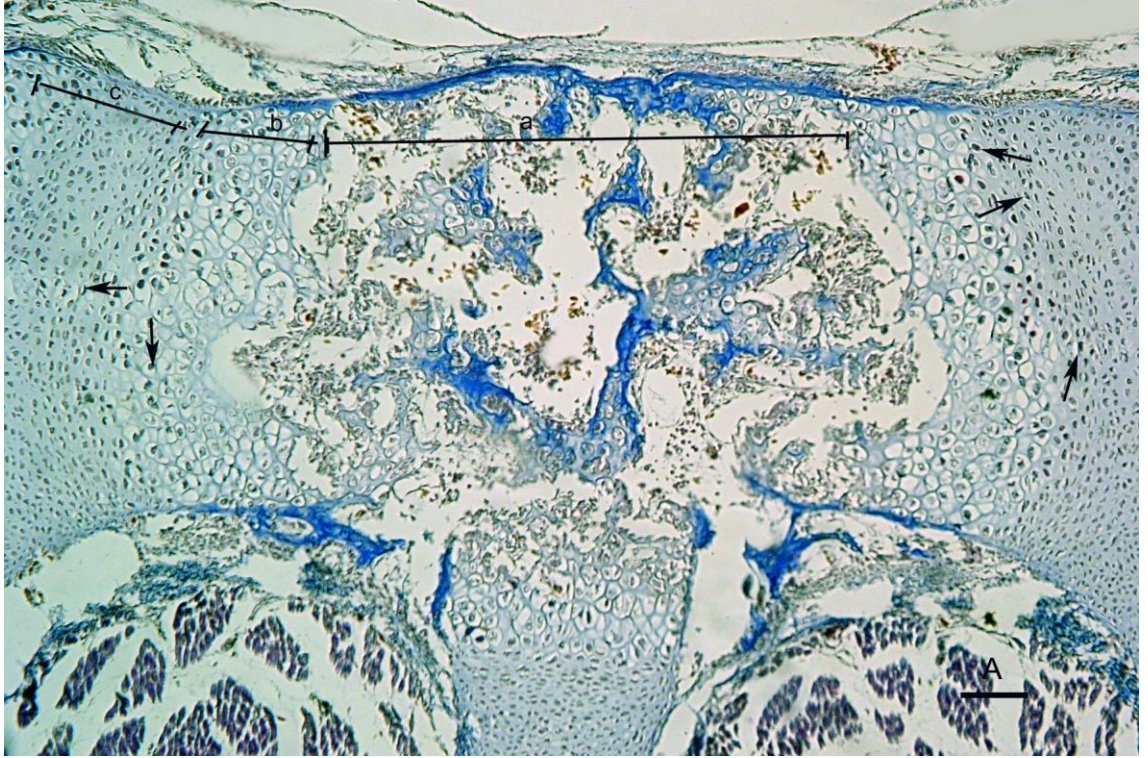
Şekil 10. İnkübasyonun 14.günü.

A: rhIGF-1 enjekte edilmiş grup. a. Kemikleşme zonu. b.Hipertrofik zon. c.Proliferatif zon.

Oklar: Kıkırdak hücreleri.

B: Kontrol grubu. Oklar: Kemikleşme merkezleri. Ok başları: Kıkırdak hücreleri.

NT: Notokord. Bar: 200 µm.

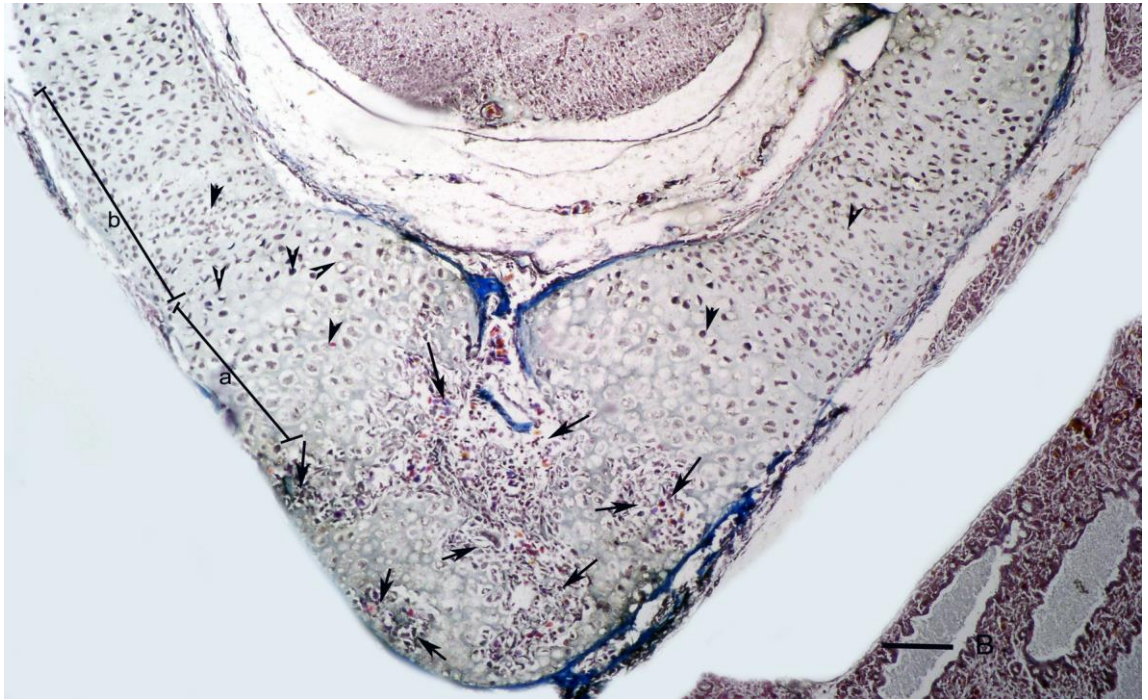
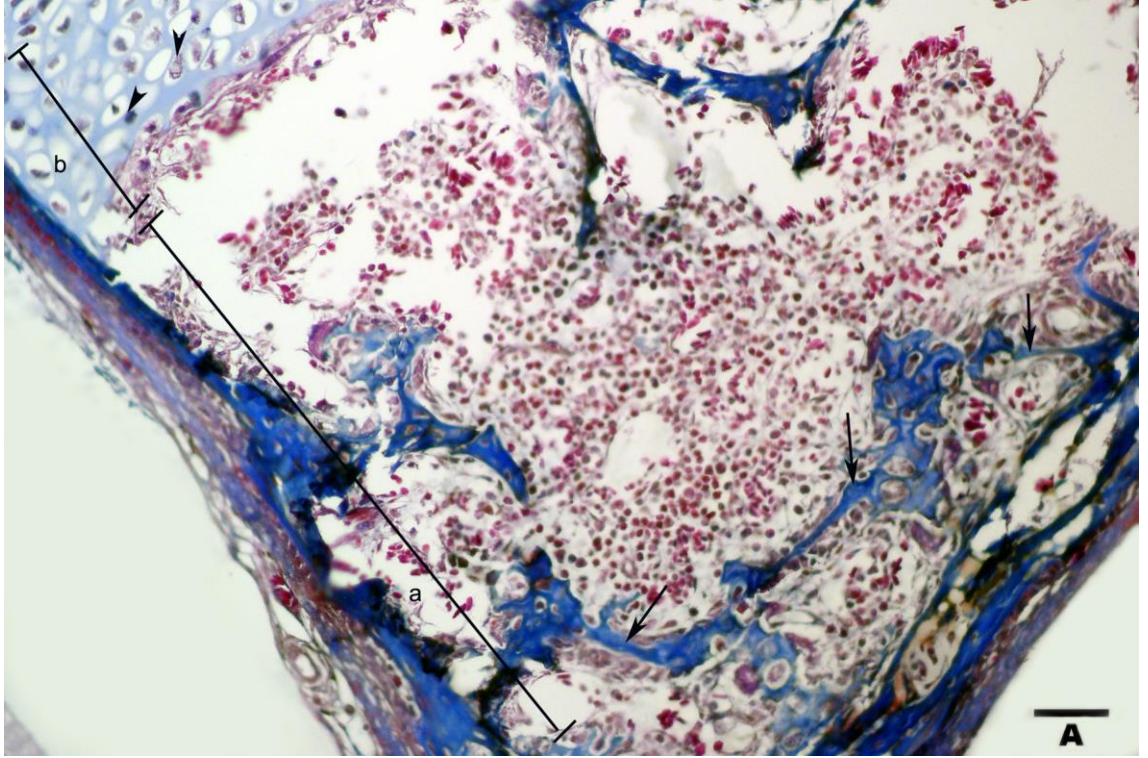


Şekil 11. İnkübasyonun 15. günü.

A: rhIGF-1 enjekte edilmiş grup. Oklar: Kıkırdak hücreleri. Bar: 100 µm.

B: Kontrol grubu. Oklar: Kemik odakları. Bar: 200 µm.

a: Kemikleşme zonu. b: Hipertrofik zon. c: Proliferatif zon.



Şekil 12. İnkübasyonun 16. günü.

A: rhIGF-1 injekte edilmiş grup. a. Kemikleşme zonu. b.Hipertrofik zon. Ok başları:

Kıkırdak hücreleri. Oklar: Trabeküller. Bar: 100 µm. B: Kontrol grubu. Ok başları: Kıkırdak

hücreleri. a: Hipertrofik zon. b: Proliferatif zon. Oklar: Kemikleşme merkezleri. Bar:200 µm.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanatlılarda kemik gelişiminin kısa sürede gerçekleştiği, bunun sebebinin ise yumurtlama periyodu boyunca, kalsiyuma yüksek derecede ihtiyaç duyulmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Kemik oluşumuyla kalsiyum (Ca) ihtiyacının daha kolay giderildiği belirtilmiştir (39).

IGF-1'in ve GH'nin somatotropik olaylardaki rolünün açıklanmasından günümüze değin bu sistemin kemik büyümesindeki rolü daha fazla araştırılmaya başlanmıştır. Nakane ve Tsudzuki'nin, Japon bildircinlerinde, 3 ve 17. günler arasında iskelet oluşumuyla ilgili yapmış oldukları çalışmada, omur kemiklerinde, ilk kemikleşmenin 10. günde servikal bölgenin merkezinde olduğunu saptamış olup, 11. günde de torakal omurların merkezinde olduğunu gözlemlemişlerdir (44).Çalışmamızda, inkübasyonun 7. ve 16. günleri arasında Japon bildircinlerinin sırt omurlarında yapmış olduğumuz çalışmalar sonucunda, kontrol grubunda ilk kemikleşme merkezini 12. günde gözlemledik. Diğer taraftan, rhIGF-1 uygulanan grupta ise ilk kemikleşme merkezinin 11. günde saptanmış olması, IGF-1'in kemik oluşumunu hızlandırdığını göstermektedir. Poulis ve arkadaşlarının, Japon bildircinlerinin bacak ve kanat kemiklerinde toplam 6 bölgede yapmış oldukları araştırmalar sonucunda, 6. ve 7. günler arasında, çalışılan kemiklerin diyafiz merkezlerinde primer ossifikasyon alanları gözlemlemişlerdir. İnkübasyonun 8. gününden 16. gününe kadar yapmış oldukları gözlemlerde, kemikleşme bölgelerinde hem büyümenin gerçekleştiğini hemde bu bölgelerin sayılarının arttığını saptamışlardır. Sırt omur bölgesinde yaptığımız bu çalışmada da, inkübasyonun 7. gününden 16. gününe kadar yapılan incelemelerde, ilerleyen günlerle beraber, hem kemikleşme merkezleri sayılarının arttığı, hemde bu bölgelerin genişliğinin arttığı görülmüştür (51).

Ratların omur kemiğiyle yapılan çalışmalarda, IGF-1'in osteoblastların osteositlere farklılaşmasını arttırdığı belirtilmiştir (42). İskelet gelişimini incelemek amacıyla yapılan çalışmada, IGF-1 in yetersiz olduğu farelerde türdeşlerinden daha küçük doğduğu görülmüştür. Bu

fareler, GH ile muamele edildiklerinde, büyüme başaramadıkları görülmüştür. Bu nedenle, GH'nın postnatal iskelet gelişimi üzerine etkilerinin, IGF-1'e bağlı olduğu anlaşılmıştır. IGF-1 değerleri yetersiz olan farelerle yapılan son çalışmalar, bu hayvanlarda büyüme plağında, iki haftalık normal tipleri ile karşılaştırıldığında büyüme bölgelerinin daha sınırlı olduğu görülmüştür. Çoğalma zonu olarak da adlandırılan büyüme plağında, hem bu bölgedeki kondrosit sayılarında hem de hipertropik zonundaki kondrosit sayılarında azalma olduğu görülmüştür. Aynı hayvanlara IGF-1 enjekte edildiği zaman, kemik uzamasının arttığı, proliferatif ve hipertropik zonun her ikisinde yeniden yapılandığı gözlenmiştir. Yapılan çalışma, IGF-1'in kondrosit proliferasyonu ve hipertrofisinin her ikisini de düzenleyebileceğine kanıttır (50). Japon bıldırcınlarında yaptığımız bu çalışmada bu bilgileri destekler şekilde, IGF-1 uygulanan gruptaki kondrosit hücre sayıları ile kontrol grubundaki kondrosit sayılarının istatistiki olarak karşılaştırıldığında, farkın $P < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Kıkırdak ve kemik gelişiminin temel düzenleyicisi olan IGF-1 (23), köken hücreler üzerine de olumlu yönde etkili olup, bu hücrelerin büyüme ve farklılaşmasında önemli bir role sahiptir (39). Pourlis ve arkadaşlarının (51), Japon bıldırcınlarında inkübasyonun 6. ve 16. günleri arasında bacak ve kanatlarda kemik gelişimini incelemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada, ilk 8. günden itibaren kemiği oluşturacak olan alanlarda kıkırdak hücre sayısının arttığını yumurtadan çıkıştan kısa bir süre öncesine kadar ise kıkırdak hücre sayısının son derece azaldığını tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışma sonuçları, bu çalışmayı destekler niteliktedir. Birim alanda sayılan kıkırdak hücre sayısı 8. günden itibaren artış göstermiştir. Ayrıca IGF-1 enjekte edilen gruplarda 11. günden itibaren kontrol gruplarında ise 12. günde itibaren birim alandaki kıkırdak hücre sayısı azalmaya başlamıştır.

İnsan IGF-1'inin tavuk biyolojik aktiviteleri üzerine etkilerine dair birçok kanıt bulunmaktadır. Örneğin, insan IGF-1'inin, tavuk embriyo

kondrositlerinde; RNA, proteoglikan ve DNA sentezini uyardığı gözlenmiştir. (9).

IGF ailesi (IGF-1 ve -2, IGF reseptörleri, IGF bağlayıcı proteinler) embriyonik ve postnatal büyümede çok önemli rollere sahiptir (16). IGF-1'in kemik büyümesine etkileriyle ilgili çalışmaların az olmasıyla beraber, mevcut çalışmalar, IGF-1'in özellikle kıkırdak ve kemik büyümesi üzerine etkili olduğunu göstermiştir (72). Diğer omurgalılarla karşılaştırıldığında memeli IGF'leri ve IGF bağlayıcı proteinleri hakkında birçok bilgi vardır. Kanatlılarda IGF'lerin yapı ve fonksiyonlarıyla, kanatlı IGFBP'lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve fonksiyonu ile ilgili daha detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır (41).

Sonuç olarak; Japon bıldırcınlarında, sırt omur bölgesinde kemik gelişimiyle ilgili yaptığımız çalışmada, her iki grupta da 7. günde şekillenmiş olan fakat tam olarak ayırt edilemeyen kıkırdak hücrelerinin artan günlerle beraber ayırt edilmeye başladığı ve 7. günden itibaren sürdürülen gözlemler sonucunda, iki grup arasında farkın 9. 11. ve 15. günler arasında önemli olduğu saptanmıştır. Ayrıca, kontrol grubu ile rhIGF-1 uygulanan gruplar, birim alandaki hücre sayısı bakımından yaşa bağlı olarak kıyaslandığında, farkın istatistiki açıdan $P < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Japon bıldırcınlarında, kemik gelişimi üzerine IGF-1'in etkilerini incelediğimiz araştırmamız sonucunda; IGF-1'in kemik gelişimi üzerine etkilerinin olumlu olduğu ve kemik gelişimini hızlandırdığı sonucuna varılmıştır.

6.ÖZET

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1'in Japon Bildircin Embriyolarında, omur bölgesinde, kemik gelişimi üzerine etkilerinin histolojik olarak incelenmesi amacıyla yaptığımız araştırmada, materyal olarak 40 adet döllü Japon Bildircin yumurtası kullanıldı.

İnkübasyonun 3. günündeki yumurtaların küt uçları, %70'lik ethanol ile dezenfekte edildikten sonra bu küt uçların bir noktasından chorio-allantoic zara zarar vermeden, her bir yumurtanın albumini içerisine bir kez olmak üzere rekombinant human IGF-1 injekte edildi. İnkübasyonun 7.ve 16. günlerinde kontrol ve rhIGF-1 uygulanan gruplardan, her gün toplanan embriyolarla histolojik preparatlar hazırlandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Gelişim boyunca elde edilen bulgular sonucunda, inkübasyonun 7. gününde omur kemiğini meydana getirecek olan kıkırdak hücrelerinin her iki grupta oluşmaya başladığı, ve rhIGF-1 uygulanan embriyolarda ilk kemikleşme merkezi 11. günde, kontrol grubunda ise, 12, günde tespit edildi. Birim alanda hücre sayılarının karşılaştırılması sonucu; IGF-1 uygulanan grup ile kontrol grubu arasında farkın $P<0.05$ düzeyinde önemli olduğu belirlendi.

Araştırmamız sonucunda; rhIGF-1 uygulanmasının kemik gelişiminde olumlu etkilere sahip olduğu ve kemik gelişimini hızlandırdığı sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

The effects of rhIGF-1 on bone (particulary vetebrae) development of apanese quails were histologically investigated during embriyonic development. Forty fertilized eggs were used.

Quail eggs were injected once with recombinant human IGF-1 on embriyonic day. Prior to injection the blunt end of the egg was sterilized with 70 % ethanol and a dentall drill bit was used to create a single hole, without genetrating the chorioallantoic membrane. Embryos from bith control and rhIGF-1 injected groups during 7. th and 16. th days of invitation were collected for histological analysis with light microscopy.

Ossification of thorocal bones were firs observed on 11. and 12. days for control and rhIGF-1 injected groups, respectively. Additionally, the number of chondrocyts were significantly increased in rhIGF-1injected groups compared to that of control.

In conclusion, the administration of rhIGF-1 accelerated the bone formation during quail embriyonic development.

8. KAYNAKLAR

1. Akay, M. Turan.: Genel Histoloji. Palme yayıncılık, 5. Baskı, Ankara. 2001.
2. Allan, G.J., Flint., DJ., Patel, K.: Insulin-like growth factor axis during embriyonic development. 122,31-39. London, 2001
3. Anderson, H.C., Hodges, P.t.,Aguileria, X.M., Missana, L., andMoylan, P.E.: Bone morphogenic protein (BMP) Localisation Developing Human and Growth Plate, Metapysis, Epipysis ana Articular Cartilage. Cytochemistry, vol. 48, 1493-1502. Kansas. 2000.
4. Andress, Dennis L.: IGF-binding protein osteoblast activity and bone accretion in ovariectomized mice. Department of medicine. Vol. 281, Seattle, Washington. August 2001.
5. Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J., Efstratiadis, A.:Role of insülin-like growht factors in embriyonic and postnatal growht. Vol. 75.73-82. New York 1993.
6. Baum, Kierszen., Abraham, L.: Histology and Cell Biology. Topathology, USA. 2002.
7. Başaran, A.: Tıbbi Biyoloji. 5. Baskı. Nobel&Güneş Tıp Kitabevi. Bursa. 1999.
8. Bichard, M.T., Huybrechts, L.M., Decuypere, E., Kühn, E.R., Monvoisin, J.L., Coquerelle,G., Carrier, J., Simon, J.: Effect of insulin - like growth factor-1 (IGF-1) infusion and dietary tri- iodo thyronine (T3) supplementation on growht, body composition and plasma hormone levelsin sex-linked dwarf mutant and normal chickens. Endocrinology. 133.101-110. 1992.
9. Burger, Elisabeth, H., Klein-Nulend, Jenneke.: Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network. Department Of Oral Cell Biology. 1999, Amsterdam.
10. Canover, Ca.: In vitro studies of insulin like growth factor-1 and bone. Growth Hormone And IGF Research. 10, 107-110, 2000.
11. Carlos, Luiz., Carneiro, Jose.: Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevi, 10. Baskı, 2003.
12. Darling-Raedeker, Maurine., Thornton, William, E., Macdonald, Ruth, S.: Growth Hormone and IGF-1 Plasma Concentration and Macronutrient İntake Measured

- in a Free-living Elderly Population During a One-Year Period. Vol. 17 No. 4, 392-397, 1998. Columbia.
13. Demir, Ramazan.: Histolojik boyama teknikleri. Palme Yayıncılık. Ankara, 2001.
 14. Deniz, E.: Tıbbi Biyoloji Ankara. 1992.
 15. Eliakim, A., Beyt, Y.: Exercise training, menstrual irregularities and bone development in children and adolescents. *Pediatr.* 16:199-200, 2003.
 16. Etherton, T.D.: Somatotrophic function: The somatomedin hypothesis revisited. *J. Anim. Sci.* 82: E239- E244, 2004.
 17. Florini, J.R., Ewton, D.Z., and Coolican, S.A.: Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrine reviews.* Vol. 17, No. 5 U.S.A., 1996.
 18. Fu, Z., Kubo, T., Noguchi, T., Kato, H.: Developmental changes in the mRNA levels of IGF-1 and its related genes in the reproductive organs of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *IGF Research.* 11, 24-33. 2001.
 19. Ganong, W.F.: Tıbbi Fizyoloji. Barış Kitabevi. 1999.
 20. Giddings, S.J., Carnaghi, L.R.: Insulin receptor gene expression during development: Developmental regulation of insulin receptor mRNA abundance in embryonic rat liver and yolk sac, developmental regulation of insulin receptor gene splicing, and comparison to abundance of insulin-like growth factor 1 receptor mRNA. *Molecular Endocrinology*, 101:73-82. 1992.
 21. Guyton, A.C., Hall, J.E.: Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıbbi Kitapevleri Ltd. Şti. İstanbul. 1996.
 22. Hill, P.A., Reynold, J.J., Mickle, M.: Osteoblast mediate insulin-like growth factor-1 and 2 stimulation of osteoclast formation and function. 136:124-131, *Endocrinology.* 1995.
 23. http://www.abdn.ac.uk./medicine_therapeutic/bone/bone%20anatomy%20and%20cellbiology.hti. 2005. Bone anatomy and cell biology..
 24. http://www.cloetta_stittung.ch/superti_ref.pdf. 2005. Molecular pathology of Skeletal Development.
 25. <http://www.guige.stanford.edu/96reports/96mech1.html>. 1996
Improving musculoskeletal function-understanding skeletal development, adaptation and aging.

26. <http://hercules.oulu.fi/isbn9514266064/html>. 2005.
Structure and function of bone tissue.
27. <http://www.medes.fr/Eristol/Osteoporosis/Bone.html>.
Bone physiology
28. http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_3bone_growht.html. 2005.
Bone Developmentant Growth
29. Ibbotson, KJ., Orcutt CM., Souza, SM., Paddock, CL., Arthur, JA., Janowsky, ML., Boyce, RW.: Contrastion effects of parathyroid hormone and insülin-like growth factor-1 in an aged ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. 17: 425-432. 1992.
30. Jacenko, O., Roberts, D.W., Campbell, M.R., McManus, P.M., Gres, C.J., Tao, Zhuliangs.: Linking heamatopoiesis to endrocondral skeletogenesis through analysis of mice transgenic for kollagen x pathology. 160:2019-2034. 2002.
31. Jonsson, KB., Wiberg, K., Ljunghall, O.: İnsulin-like growth factor 1 does not stümlulate bone resorption in cul. 59:366-370. Department of Internal Medicine, 1996. Sweden.
32. Junqueira, L.C., Carneire, J., Kelley, R.O.: Temel Histoloji. Barış Kitabevi. 7. Baskı. 1993.
33. Kocamış, H., Kirkpatrick- keller, D.C., Klandorf, H., and Killefer, J.: In ovo administration of recombinant human insulin-like growht factor 1 arters postnatal growht and development of the broiler chicken poultry science. 77:1913-1919, 1998.
34. Koka, S., Vance, J.B., Maze, G.I.: Insulin-like growht factors 1 and 2 (IGF-1, 2). Vol.3, 1995.
35. KostECKA, Z., Blahovec, J.: Insulin-like growth factor binding proteins and their functions. Department of chemistry, biochemistry and biophysics. Vol: 33, 90-94. 1999. Slavakia.
36. Lewis, M.L., Lorusso, T.J., and Fournier, M.: Effect of insulin-like growht factor 1 and /or growht hormone on diaphragm of malnourished adolescent rats. Pyysiology. Vol. 82, No.4, 1994.

37. Lilja, Clas., Blom Jonas., Marks ,Henry, L.: A comparative of embriyonic development japanese quail selected for different pattens of postnatal growth. 104, Zoooogy. 2001. Sweden.
38. Liu, D., Denbow, D.M., Denbow, C., Herbein, J.H., Neit, H.P., Wilson, J.H.: The effects of dietary lipids on bone chemical mechanical, and histological properties in japanese quail (*Coturnix. C. Japonica*) Virginia, 2000.
39. Loveridge, L.: Bone: More than a stick. Vol: 77-82, *J.Anim.Sci.* 1999, Cambridge, UK.
40. McMurty, J.P., Francis G.L., and Upton. Z.: Insulin-like growht factor in poultry. *Domestic animal andocrinology.* Vol. 14:199-223, 1997.
41. McQueeny,K., and Dealy, C.N.: Roles of insulin-like growht factor-1 (IGF-1) and IGF-1 binding protein-2 (IGFBP2) and -5 (IGFBP5) in developing chick limbs. *Growht hormone&IGFresearch.* 11:346-363, 2001.
42. Minitab: Minitab Reference Manual. Release 10 for Windows minitab Inc., USA, 1994.
43. Murray, R.k., Mayes,P.A., Granner, D.K., Rodwell, V:W.:Harper'in *Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul, 595-614.* 1993.
44. Nakane, Yoshifurni., Tsudzuki, Masaoki.: Development of skeleton in japanese quail embryos. *Animal science.* 41, 523-534. 1999 . Japane.
45. Ohbayashi,N., Shibayoma, M.,Kurotaki, Y., Imanishi, Mayumi., Fujimori, T., Hoh, N., and Takada, S.: F8F18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. Vol.16, No.7, 2002.
46. Ohlsson, C., Bengtsson, B.A., Isakson, O.G.P., Andreasson, T.T., and Słootweg, M.C.: *The endocrine society.* 19:55-79, 1998.
47. Olsen, B.R., Reginato, A.M., and Wang, W.: Bone Development. Vol.16:191-220. *Cell and development Biology.* 2000.
48. Pablo, De,F.T., Robcis, H.I., Caldes, T., Aemany, J., Scavo, L.,and Serrano, J.: Insulin-like growht factors in chicken embriyogenesis. *Endocrinology.* 11:558-577. 1990
49. Peterson, K.F., Jacob, R., West, A.B., Sherwin, R.S., and Shulman, G.I.: Effects of İnsulin-like growht factor-1 on glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Pathology.* Vol.273, Issue.6, E1189-E1193, 1997.

50. Phornphutkul, Chanika., Wu, ke-Ying., Yang Xu., Chen Qian, Gruppuso, Philip A.: Insuline-like growth factor-1 signalling is modified during chondrocyte differentiation. *Pediatric Endocrinology*. 10.1677, 2004. USA.
51. Pourslis, A.F., Magras, I.N., pedritis, D.: Ossification and growth rates of limb long bones during the prehatching period in the Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Anat.Histology, Embriyology*. 27, 61-63. 1998. Greece.
52. Rauch, F.,and Schoenau, E.: Skeletal development in premature infants: A review of bone physiology beyond nutritional aspects. *Archives of disease in chilhood fetal and neonatal edition*. 86:F82-F85, 2002.
53. Ren, J., Sowers, J.r., Walsh, MF.,and Brown, R.A.: Reduced contractile response to insulin and IGF-1 in ventricular myocytes from genetically obese zucker rats. *Pysiology*. 279:H1708-H1714. 2000.
54. Rocha, E.M., Cunha, D.A., Cameiro, E.M., Boshero, A.C., Sead, M:J., and VELLASE, L.A.:Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the Human ocular surface. *Physiology*. 43:963-967, 2002
55. Rocky, T.: Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. *Clinical orthopadics6Related Research*. S105-S117. 2004
56. Ronis, M.J.J., Aronson, J., Gao, G.g., Hogue, W., Skinner, R.A., Badger, T.M., and Lumpkin, C.K.: Skeletal effects of developmental lead exposue in rats. *Toxicological sciences*. 62, 321-329. 2001.
57. Rosen, Clifford,J.: Insulin-like growth factor 1 and calcium balance: Evolving concepts of an evolutionary process. *Endocrinology*, Vol: 144 2003. USA.
58. Rosen, Clifford, J.: Insulin –Like Growth Factor system and bone. 277-278, *Endocrinology-diabetes*, 2001.USA.
59. Rugh, Robert.: A guide to vertebrate development. Burgess publishing company. Sevent edition.
60. Sadler, T.W.: Langman’s Medikal Embriyoloji. Palme Yayıncılık 6. Baskı. 1993.
61. Sağlam, M., Aştı, R.N., Özer, A.: Genel Histoloji. Yorum Matbaacılık. 6.Baskı, Ankara. 2001.
62. Schwander,J.C., Hauri, C., Zapf, J., and Froesch, E.R.: Synthesis and secretion of IGf-1 aaaaaand its binding protein by the perfused rat liver.: Dependence on growht hormone status. *Endocrinology*. 113:297-305 1983.

63. Shoba, L., An, M.R., Franks, J., Lowe, W.L.: Developmental regulation of insulin-like growth factor-1 and growth hormone receptor gene expression. *Molecular and cellular Endocrinology*. 125-136, 1999.
64. Shum, L., and Nuckolls, Glen.: The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. 4: 94-106. U.S.A. 2002.
65. Sloopweg, MC., Most, WW., Van, Beek, E., Schot, LPC., Lövik, CWGM.: Osteoklast formation together with interleukin-6 production in Mouse long bones is increased by insulin-like growth factor-1. 32: 433-438. *J. Endocrinology*.
66. Sowers, M.R., Schall, T., Grewal, J., Cheu, X., Jannausch, M.: IGF-1, osteocalcin and bone change in pregnant normotensive and pre-eclamptic women. *Clinical Endocrinology&Metabolism*. Vol.86, No. 12, 5898-5903, 2001.
67. Ueland, Thor.: GH/IGF-1 and bone resorption in vivo and in vitro. Vol: 152, 327-332. *Endocrinology*. 2005. Norway.
68. Theodore, C., Gerald, Fitz.: *the coturnix quail/Anatomy and Histology*. The Iowa State University Pres. First edition., 1969.
69. Tixier-Boichard, M., Huybrechts.,L.M., Decuyper, E., Kühn, E.R., Monvoisin, J.L., Conquerelle, G., Carrier, J., Simon,J.: Effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) infusion and dietary tri-iodo thyronine (T3)supplementation on growth, body composition and plasma hormone levels in sex-linked dwarf mutant and chickens. *Endocrinology*. 133.101-110. 1992.
70. Watkins, Bruce, A., Seifert, Mark F.: Conjugated linoleic acid and bone biology. *Anatomy*. Vol: 19, 478s-486s. 2000. Indiana.
71. Yakar, S., Liu, J.L., Roith, D.L.: The growth hormone/ insulin-like growth factor-1 system: Implications for organ growth and development. *Pediatric Nephrol*. 14: 544-549.
72. Yılmaz, B.: *Hormonlar ve üreme fiziolojisi*. Feryal Matbaacılık. Ankara. 1999.
73. Zenobia, A., Frank, B., Todd, L., Phyllis, L.: Skeletal development and regeneration. *Orthopedics*. 10:6 1999.
74. Zhang, Mei., Xuan, Shouhong., Bouxsein, Mary, L., Stechov, Dietrich, Von., Akeno, Nagako., Faugere, Marie, Claude., Malluche, Hartmut., Zhao, Guisheng., Rosen, Clifford, J., Clemens, Thomas.: Osteoblast-specific knockout of the Insulin-like growth factor receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *Genetics and development*. 2002. New York