



**TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ ERİŞKİN İNSAN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN TGF- β 1 İLE
UYARILMIŞ KONDROJENİK DEĞİŞİMİ SÜRECİNDE, C-
TİPİ NATRİÜRETİK PEPTİD'İN DOZA BAĞIMLI ETKİSİNİN
GÖSTERİLMESİ**

Sema SERTER

**Haziran, 2010
DENİZLİ**

**TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ ERİŞKİN İNSAN MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİNİN TGF- β 1 İLE UYARILMIŞ KONDROJENİK
DEĞİŞİMİ SÜRECİNDE, C-TİPİ NATRİÜRETİK PEPTİD'İN DOZA
BAĞIMLI ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

Sema SERTER

Danışman: Doç. Dr. A.Çevik TUFAN

**Haziran, 2010
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Sema SERTER tarafından, Doç. Dr. A. Çevik TUFAN yönetiminde hazırlanan “**Trabeküler Kemik Kökenli Erişkin İnsan Mezenşimal Kök Hücrelerinin TGF- β 1 İle Uyarılmış Kondrojenik Değişimi Sürecinde, C-Tipi Natriüretik Peptid’in Doza Bağımlı Etkisinin Gösterilmesi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Recep KUTLUBAY
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Gülçin ABBAN
Jüri Üyesi

Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Jüri Üyesi (Danışman)

Yrd. Doç. Erdoğan KOCAMAZ
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/07/10 tarih ve 2010/11-6 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı: Sema Serter

TEŞEKKÜR

Tezin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında, tez çalışması için ortamın sağlanmasında, tezin her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini, özverilerini ve bilgilerini esirgemeyen tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. A.Çevik TUFAN'a ve Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr.Recep KUTLUBAY'a teşekkür ederim.

Tezim sırasında bana her türlü yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a, Sayın Yrd.Doç.Dr. E.Oğuzhan OĞUZ'a ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan ve tezimin yapılmasında emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana destek olan, maddi ve manevi katkılarını esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ ERİŞKİN İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN TGF- β 1 İLE UYARILMIŞ KONDROJENİK DEĞİŞİMİ SÜRECİNDE, C-TİPİ NATRİÜRETİK PEPTİD'İN DOZA BAĞIMLI ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Serter, Sema

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Çevik TUFAN

Haziran 2010, 63 sayfa

Kök hücreler embriyonik dönemden başlayarak fetal ve doğum sonrası yaşamda doku ve organların gelişimleri ve idamelerinde önemli rol oynarlar. Bu çalışmada trabeküler kemik kökenli insan mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) pratik bir hücre kültürü yöntemi ile izolasyonu, bu hücrelerin karakterizasyonları ve değişim potansiyellerinin gösterilmesi ve bunu takiben bu MKH'lerin transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid (CNP) sinyal yolunun kondrogenez üzerindeki doza bağımlı etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Ortopedik artık cerrahi materyalden alınan 1-2 cm³'lük trabeküler kemik örnekleri steril şartlarda, %10 FBS, 50 μ g/ml penisilin-streptomisin içeren DMEM (yüksek glukoz, L-glutamin pozitif) içerisinde laboratuvara taşınmıştır. Steril şartlarda aynı besi yeri içerisinde parçalara ayrılan materyal 4-5 kez temiz besi yeri ile yıkanmıştır. Bu kemik fragmentleri, yüzeylerinde bulunan hücre materyalden arındırılmak için 2mM L-glutamin, 50 μ g/ml askorbik asit, 256U/ml kollajenaz ve 50 μ g/ml penisilin-streptomisin içeren DMEM içerisine aktararak, 37C⁰'de, %5 CO₂'li ve nemli inkübatörde 3-4 saat bekletilmiştir. Takiben steril izotonik solüsyon ile 4-5 kez yıkanmıştır. Temiz besi yerine alınan kemik fragmentleri kültür kaplarına aktarılmış ve 37C⁰'de, %5 CO₂'li ve nemli inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücrelerin trabeküler kemik fragmentlerinden migrasyonları ve çoğalmaları süreci takip edilmiş, 3-4 günde bir besi yeri tazesi ile değiştirilmiştir. %60-70 doygunluğa ulaşan kültürler pasajlanarak 3. pasaj (P3) hücreler elde edilmiştir. Bu hücrelerde MKH'lere özgü hücre yüzey belirleyicilerinin immunfluoresan analizi ve hücrelerin uygun mikro çevre koşulları altında osteojenik, kondrojenik ve adipojenik

değişimleri uyarılmıştır. MKH'lerin in vitro kondrojenik değişimleri, çökelti kültürlerinde, TGF- β 1'in (10 ng/ml) uyarıcı etkisi altında gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte farklı dozlarda (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) CNP uygulanarak, kondrojenik matriks içeriğindeki glikozaminoglikan sentez değişiklikleri Alcian mavisi boyaması ile incelenmiştir.

Hücrelerin kemik fragmentlerinden ilk migrasyonları 7-11. günlerde, hücrelerin kemik fragmentleri çevresinde doygun bir düzeye ulaşmaları 11-20. günlerde ve hücrelerin tüm kültür ortamında, odaklar arası bölgelerde de doygun seviyeye ulaşmaları 14-26. günlerde gözlenmiştir. P3 hücrelerin immunfluoresan analizi sonucunda STRO-1, CD73 ve CD105 için (+); CD34, CD45 ve CD144 için (-) oldukları gösterilmiştir. Bu MKH'lerin uygun mikro çevre koşullarında osteojenik, kondrojenik ve adipojenik değişimleri ve bu dokulara özgü molekülleri mRNA düzeyinde ifade ettikleri gösterilmiştir. TGF- β 1 ile uyarılmış kondrojenik değişim sürecinde elde edilen kondrojenik dokularda 10^{-8} M ve 10^{-7} M CNP'nin Alcian mavisi boyanma koyuluğunu doza bağımlı olarak arttırdığı, 10^{-6} M CNP'nin ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında boyanma koyuluğunu azalttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada trabeküler kemik fragmentlerinden MKH'lerin izolasyonlarında kullanılacak pratik bir hücre kültürü yönteminin uygulanması ve elde edilen hücrelerin kondrojenik değişimlerinin gösterilmesinin yanı sıra bu süreçte etkin olan CNP sinyal yolunun doza bağımlı etkisi ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Mezankimal kök hücreler, TGF- β 1, CNP, NPR-B, kondrogenez.

ABSTRACT**DOSE DEPENDENT EFFECT OF C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE DURING
TGF- β 1 INDUCED CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF
TRABECULAR BONE-DERIVED ADULT HUMAN MESENCHYMAL STEM
CELLS**

Serter, Sema

M.Sc. Thesis in Histology and Embriyology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Çevik TUFAN

June 2010, 63 pages

Starting from the embryonic stages, stem cells play important roles in tissue and organ development during the fetal period and also their maintenance after birth. The aim of this study was to isolate trabecular bone-derived human mesenchymal stem cells (MSCs) via a simple cell culture technique, followed by their characterization, and demonstration of their differentiation potential and finally to investigate the dose dependent effect of CNP signaling in TGF- β 1 induced chondrogenic differentiation of MSCs.

Trabecular bone fragments of 1-2 cm³ obtained from wasted surgical material were taken into DMEM (high glucose, L-glutamine positive) supplemented with antibiotics (50 μ g/ml penicillin-streptomycin) and %10 FBS. Bone fragments were minced and washed for 4-5 times. They were transferred to a flask containing 2mM L-glutamine, 50 μ g/ml ascorbate, 256U/ml collagenase and 50 μ g/ml penicillin-streptomycin, placed in a humidified incubator at 37°C and %5 CO₂ until the cellular material on the bone surface disappeared (3-4 h). Afterwards fragments were washed with isotonic solution for 4-5 times, plated in culture containers and placed in a humidified incubator at 37°C and %5 CO₂. Migration and outgrowth of MSCs from trabecular bone fragments were followed. Medium was changed every 3-4 days. When cultures reached %60-70 confluency, cells were passaged. Immunofluorescence analysis of specific cell surface markers was performed on third passage (P₃) cells. Differentiation of these MSCs to osteocytes, chondrocytes and adipocytes in cell culture were demonstrated. In vitro chondrogenic differentiation of MSCs was performed under the induction of TGF- β 1 (10 ng/ml) in pellet culture. Changes in glycosaminoglycan synthesis within the chondrogenic matrix of pellets

after treatment with different doses (10^{-8}M , 10^{-7}M , 10^{-6}M) of CNP was analyzed on the basis of Alcian blue staining.

Results revealed that first cells appeared migrating out from the bone fragments after 7-11 days. Cells proliferated and became confluent in close proximity of bone fragments after 11-20 days. Cells became confluent throughout the culture after 14-26 days. Immunofluorescence analysis of P3 MSCs revealed positive staining for STRO-1, CD73 and CD105 and negative staining for CD34, CD45 and CD144. Differentiation of these MSCs into osteocytes, chondrocytes and adipocytes were demonstrated and expressions of tissue specific molecules at mRNA level were shown. Cultures induced with TGF- β 1 and treated with different doses of CNP showed that CNP supplementation at 10^{-8}M and 10^{-7}M concentrations increased Alcian blue staining intensity in a dose dependant manner, whereas at 10^{-6}M concentration suppressed it.

In conclusion, this study demonstrated the isolation of human trabecular bone-derived MSCs utilizing a simple cell culture technique, and also their characterization and differentiation potential. CNP effects on glycosaminoglycan synthesis during early chondrogenic differentiation were dose depended, and 10^{-7}M CNP concentration was the most effective dose.

Key words: Mesenchymal stem cells, TGF- β 1, CNP, NPR-B, chondrogenesis.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet.....	i
Abstract.....	iii
İçindekiler.....	v
Şekiller dizini.....	vii
TablolarDizini.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI	2
2.1. KökHücreler.....	2
2.1.1. Kök Hücresinin Tanımı ve Kök Hücre Türleri.....	2
2.1.2. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri.....	5
2.1.2.1. Farklanma (Plastisite).....	5
2.1.2.2. Kendini Yenileme, Bölünme Biçimleri ve Kök Hücre Nişi.....	6
2.1.2.3. Köklülük (Stemness).....	9
2.1.3. Mezenkimal Kök Hücreler.....	10
2.1.3.1. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları.....	11
2.1.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Fiziksel Özellikleri ve In Vitro Çoğaltılmaları.....	12
2.1.3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünojenotipik Özellikleri.....	14
2.1.3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli.....	15
2.1.3.4.1. Adipojenik farklılaşma.....	15
2.1.3.4.2. Osteojenik farklılaşma.....	16
2.1.3.4.3. Kondrojenik farklılaşma.....	16
2.1.3.4.4. Nöronal farklılaşma.....	16
2.2. İskelet Sistemi Gelişimi.....	18
2.2.1. İntramembranöz kemik gelişimi.....	18
2.2.2. Endokondral kemik gelişimi.....	19
2.2.2.1. Endokondral Kemik Gelişiminin Aşamaları.....	19
2.2.2.2. Endokondral Kemik Gelişimini Etkileyen Başlıca Faktörler.....	21
2.2.2.3. Model Sistemlerde Endokondral Kemik Gelişimi ve Kondrogeniz Fazlarının Başlıca Belirleyicileri.....	24
2.3. Kondrogeniz ve Natriüretik Peptid Sinyal Yolları.....	25
2.3.1. Genel Olarak Natriüretik Peptitler ve Reseptörleri.....	27
2.3.1.1. Natriüretik Peptid Ailesi.....	27
2.3.1.2. Natriüretik Peptid Reseptörleri.....	30
2.3.1.2.1. Natriüretik peptid reseptör A.....	33
2.3.1.2.2. Natriüretik peptid reseptör C (Natriüretik peptid clearance reseptör).....	33
2.3.1.2.3. Natriüretik peptid reseptör B.....	33
2.4. Hipotez ve Çalışmanın Amacı.....	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM	36
3.1. Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu Ve Kültüre Edilmesi.....	36
3.2. Osteojenik Ve Adipojenik Tek Tabaka Kültürlerin Farklılaşması.....	37

3.2.1. Adipojenik değişimin Oil Red O boyaması ile hücre analizi.....	38
3.2.2. Osteojenik değişimin Alizarin Red S boyaması ile hücre analizi.....	38
3.3. Yüksek Yoğunlukta Pellet Kùltürlerin kondrojenik farklılaşması.....	39
3.3.1. Kondrojenik değişimin Alcian mavisi boyanması ile hücre analizi.....	39
3.4. İmmunohistokimyasal boyama	40
3.5. RNA izolasyonu ve Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) analizi	40
3.6. İstatistiksel analizler.....	41
4. BULGULAR	43
4.1. Kollajenaz ile muamele edilen yetişkin insan trabekùler kemik parçalarından izole edilen kùltürlerin morfolojik olarak gözlemlenmesi.....	43
4.2. İnsan trabekùler kemik parçalarından elde edilen kùltürlerin immünofloresan boyama ile karakterizasyonunun yapılması	43
4.3. İnsan trabekùler kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin RT-PCR ile gen ekspresyonu analizin yapılması ve değişim potansiyelinin histolojik olarak gösterilmesi	46
4.4. CNP ve NPR-B'nin <i>in vivo</i> koşullarda RT-PCR gen ekspresyon profilleri	46
4.5. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde CNP ve NPR-B ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	48
4.6. Trabekùler kemik kökenli insan mezenkimal kök hücrelerinin TGF- β ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid'in doza etkisinin gösterilmesi	50
5. TARTIşMA	52
6.	
SONUÇLAR	57
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİş	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Kök hücre nişi.....	8
Şekil 2. İnsan embriyonik kök hücrelerinde yapılan DNA mikrodizin analizlerine göre 918 gen bölgesinin işlevlerine göre dağılımı	9
Şekil 3. In vitro kültürde trabeküler kemik kökenli insan mezankimal kök hücreleri.....	13
Şekil 4. Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaları	17
Şekil 5. Uzun kemiklerde endokondral kemikleşme.	23
Şekil 6. İnvitro Kondrogenez.....	25
Şekil 7. Natriüretik peptidiler birbirleri ile yapısal benzerlik gösteren ancak genetik olarak farklı hormonlardır.....	28
Şekil 8. Natriüretik peptidlerin bilinen üç farklı reseptörü vardır	31
Şekil 9. Natriüretik Peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri	32
Şekil 10. Kollajenaz ile muamele edilen yetişkin insan trabeküler kemik parçalarından izole edilen kültürlerin morfolojik olarak gözlemlenmesi.....	44
Şekil 11. İnsan trabeküler kemik parçalarından elde edilen kültürlerin immüno Floresan boyama ile karakterizasyonunun yapılması	45
Şekil 12. İnsan trabeküler kemik iliği kaynaklı mezaşimal kök hücrelerin RT-PCR ile gen ekspresyonu analizinin yapılması ve değişim potansiyelinin histolojik olarak gösterilmesi	47
Şekil 13. CNP ve NPR-B'nin <i>in vivo</i> koşullarda RT-PCR gen ekspresyon profilleri	48
Şekil 14. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde CNP ve NPR-B ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	49
Şekil 15. Trabeküler kemik kökenli insan mezenkimal kök hücrelerinin TGF- β ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid'in doza bağımlı etkisinin gösterilmesi	51

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Kökenlerine, farklanma etkinliklerine veya farklanma yönlerine göre kök hücre türleri	4
Tablo 2. Kök hücrelerin farklanma yetkinliği (plastisite)	6
Tablo 3. Trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücre izolasyonu gerçekleştirilen hastaların özellikleri	37
Tablo 4. Gen ekspresyonlarının analizinde kullanılan RT-PCR primerleri	42

1.GİRİŞ

İnsan Genom Projesi ile elde edilen bilgiler, bilim dünyasında yeni ve önemli birçok gelişmeye yol açmıştır. Bu gelişmeler özellikle moleküler tıp, kanser biyolojisi, genetik, biyomedikal mühendisliği, gelişim biyolojisi ve biyoinformatik gibi alanlarda pek çok yeni araştırmaya, yeni tanı yöntemlerinin ve tekniklerinin geliştirilmesine ve modern klinik uygulamalara imkân sağlamaktadır. Kök hücreler de hızla ilerleyen biyomedikal teknolojilerin en fazla önemle üzerinde durulan bir bileşeni konumundadırlar.

Kök hücreler embriyonik dönemden başlayarak fetal ve doğum sonrası yaşamda doku ve organların gelişimleri ve idamelerinde önemli rol oynarlar. Kısaca bir tanım yapmak gerekir ise kök hücreleri, asimetrik bölünerek çoğalabilme, böylelikle kendilerini yenileyebilme ve kan, karaciğer, kas, kıkırdak, kemik ve benzeri daha pek çok özelleşmiş görevler üstlenen organları oluşturabilecek hücrelere farklılaşabilme özelliğine sahip hücrelerdir. Can (2009) tarafından Türkiye Bilimler Akademisi yayınlarından “Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar” başlıklı raporda özetlendiği üzere “her hücre bir hücreden meydana gelir” (Rudolph Virchow). İki haploid gamet hücresinin bir araya gelmesiyle oluşan ve zigot olarak adlandırılan döllenmiş ovum hem embriyona ve ardından tüm dokuların oluşmasına hem de embriyonik gelişmeye destek görevi gören ek dokuların gelişmesine öncülük eden canlılardaki en yetkin farklılaşma kapasitesine sahip hücredir. Bu özelliğinden dolayı “totipotent” hücreler olarak da adlandırılırlar.

Zigottan yola çıkarak embriyonik yaşamda tanımlamaya başladığımız kök hücreler yetişkinde de vücudun pek çok farklı yerlerinde dağılım gösterirler. Bu dağılıma örnek olarak kan, kemik iliği, yağ dokusu, kemik doku, pek çok parankimal organlar vb. gösterilebilir. Örneğin, kemik iliği kaynaklı hematopoetik kök hücrelerinden olgun kan hücreleri köken alır.

Günümüzde normal dokuların farklılaşması ve gelişimi yanı sıra, pek çok hastalığın patobiyolojisinde rol alan hücresel ve moleküler mekanizmalara yönelik araştırmaların artması ve kök hücrelerin farklılaşma aşamalarında etkili olan kontrol mekanizmalarının ortaya çıkarılması çeşitli hastalıkların kök hücre ve gen aktarımı yaklaşımları ile tedavi edilebilmesi sürecine ışık tutacaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kök Hücreler

2.1.1. Kök Hücresinin Tanımı ve Kök Hücre Türleri

Zigot'un 5-6 kez birbiri ardına bölünme geçirmesi sonucu önce morula oluşur. Morula aşamasındaki hücreler embriyonik dönemde halen daha embriyon ve embriyon dışı tabakaların tümünü oluşturabilme potansiyeline sahip olduklarından "Totipotent Embriyonik Kök Hücreler" olarak adlandırılırlar (Tablo-1).

Bu aşamadan birkaç bölünme sonra oluşan yapıya ise blastokist denir. Blastokist aşamasındaki embriyona ait hücreler bütün diğer organları oluşturmak üzere çoğalır, farklılaşır ve kararlı bir yapı kazanarak iç hücre kitlesini oluştururlar. İç Hücre kitlesi dışında kalan hücreler ise embriyon dışı tabakaları oluşturacak olan trofoblastik hücrelere farklılaşırlar. Dolayısı ile iç hücre kitlesini oluşturan hücrelere de embriyonik kök hücreler adı verilir (Tablo 1). Ancak bu embriyonik kök hücreler, sadece embriyona ait bütün hücre ve dokuları oluşturacak olan ana iskeleti meydana getirdiklerinden ve embriyon dışı tabakalara farklılaşamadıklarından "Pluripotent Embriyonik Kök Hücreler" olarak adlandırılırlar (Tablo-1). Bunun dışında gastrula aşamasındaki embriyonda bulunan ve ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere her üç embriyonik germ yaprağını oluşturan hücrelere dönüşebilme kapasitesindeki epiblastlar da "Pluripotent Embriyonik Kök Hücreler" olarak adlandırılırlar (Tablo-1). Yine her bir germ yaprağını oluşturan ve her birisi farklı somatik hücrelere farklılaşabilen ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri de bir anlamda "Pluripotent Embriyonik Kök Hücreler" olarak adlandırılırlar (Tablo-1). Embriyonik kök hücreler, embriyonik gelişimin erken fazlarında elde edilen ve vücudumuzda bulunan bütün 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. Ayrıntılı bilgi için 'www.closerlookatstemcells.org'. Embriyonik kök hücreler gelişmekte olan organizmada bulunmazlar. Dolayısı ile fetal hayattan başlayarak, başta kemik iliği olmak üzere

vücudumuzun çeşitli organ ve dokularında bulunan kendini çoğaltabilen, farklılanabilen ve kararlı hale gelebilen kök hücrelere “Yetişkin Kök Hücreler” adı verilir (Tablo 1). Yetişkin kök hücreler doku yada organa özel olan kök hücre tipidir. Yetişkin kök hücrelerini içerdiği bilinen erişkin organ ve dokulara örnek olarak deri, kas, kemik iliği ve sindirim sistemi verilebilir. Tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılan birkaç kök hücre uygulaması vardır. Bunlardan biride yetişkin kök hücrelerdir. Bu kök hücreler, kordon kanı ve kemik iliği transplantasyonlarında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (Ayrıntılı bilgi “www.closerlookatstemcells.org” internet sitesinden edinilebilir).

Yetişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelerle kıyaslandığında kısıtlı sayıda hücrelere farklılaşma kapasitesindedirler. Bu özelliklerinden dolayı prokürsör (öncü) hücre olarak isimlendirilebilirler (Can, 2009). Yetişkin kök hücrelerinden bulunduğu dokuya göre birden fazla türde hücreye farklılaşabilen hücrelere “Multipotent Yetişkin Kök Hücreler”, örneğin hematopoetik kök hücreler, tek bir dokuda yerleşik tek bir hücre tipine farklılaşabilen hücrelere ise “Unipotent Yetişkin Kök Hücreler”, örneğin kas dokusundaki uydu hücreler, adı verilir (Tablo-1).

Mezankimal kök hücreler yetişkin bir kök hücre tipidir. Bu hücreler başta kemik iliği olmak üzere; kırıkta, kemik ve yağ dokularında sınırlı sayıda üretilebilir. Kemik dokusunun tamiri, osteoartrit ve kırıkta dokusunun tamiri gibi alanlarda klinik kullanım potansiyeli mevcuttur. Birçok çalışmada, mezankimal kök hücrelerin bağışıklık yanıtın düzenlenmesinde rol oynadığı ve bağışıklık yanıtı baskıladığı kanıtlanmıştır (Ayrıntılı bilgi “www.closerlookatstemcells.org” internet sitesinden edinilebilir).

Tablo-1’de özetlenen hücrelere ek olarak, insanda gelişimin ikinci haftasının başında epiblast tabakasından köken alan ve ilk kez dördüncü haftanın başında vitellus kesesi duvarında gözlemlenen kök hücrelere “Primordial Germ Hücreleri” denir. Bu hücreler, kadında ovogonyumları (ovositlerin öncüsü); erkekte ise spermatogonyumları (spermatozonların öncüsü) oluşturacak olan ana kök hücrelerdir (Can, 2009).

Doğum esnasında ve gebelik sırasında elde edilerek uygun koşullar altında saklanabilen, çoğalma ve farklılaşma yeteneklerine sahip kök hücrelere “Fetus Kök Hücreleri” denir (Can, 2009). Bebek gelişiminde, yaklaşık olarak 10 haftalık fetüsten elde edilir. Fetus kök hücreleride yetişkin kök hücreler gibi genellikle dokuya spesifiktir ve buldukları doku

yada organa özel olgun hücre tipleri oluştururlar (Ayrıntılı bilgi “www.closerlookatstemcells.org” internet sitesinden edinilebilir).

Bu gruptaki kök hücrelere örnek olarak; amniyon sıvısındaki kök hücreler, plasenta kaynaklı kök hücreler ve göbek kordonu stroması kaynaklı kök hücreler verilebilir.

Son dönemde ön plana çıkan diğer iki önemli kök hücre grubu ise; göbek kordonu kök hücreleri ve uyarılmış pluripotent kök hücreleri (İPS hücreleri)’dir. Göbek kordonu kök hücreleri bebekte kordon kanından sağlanabilir. Bu hücreler yetişkin kök hücreleri gibi dokuya spesifik kök hücrelerdir. Bu hücreler değişik hücrelere farklılaşabilir ve çoğalabilir. Kök hücreler günümüzde özellikle kanser olmak üzere bilinen birçok hastalığın ve yaralanma sonucu oluşan organ ve doku kayıplarının tedavisinde yarar sağlamaktadır. İPS hücreleri ise bilimadamları tarafından 2006 yılında keşfedilmiştir. Araştırmacılar bu hücreleri, embriyonik kök hücreler gibi davranış gösteren, özelleşmiş bir fonksiyona sahip ‘Yeniden Programlanmış Hücreler’ anlamına gelen ‘uyarılmış pluripotent kök hücreler’ olarak tanımlamaktadırlar. Embriyonik kök hücreler ve İPS hücreleri bütün doku ve organlara dönüşebilme gibi karakteristik özellikleri paylaşmaktadırlar. Fakat iki kök hücre grubu aynı değildir. Davranış bakımından azda olsa farklılık göstermektedirler (Ayrıntılı bilgi “www.closerlookatstemcells.org” internet sitesinden edinilebilir).

Tablo-1. Kökenlerine, farklılık etkinliklerine veya farklılık yönlerine göre kök hücre türleri.

İsim	Hücre tipi (yerleşim)	Farklanma etkinliği	Farklanma yönü
EKH*	Morula aşmasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve embriyon dışı tabakalar
EKH	Blastokist aşmasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyon gövdesi (tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Ektoderm, endoderm, mezoderm hücreleri
EKH	Ektoderm, endoderm, mezoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler ^a
YKH**	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Hücrenin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	(ör. Kas dokusundaki uydu hücreler)

EKH*: Embriyonik kök hücreler; YKH** : Yetişkin kök hücreler; Bu tablo Can (2008)’den alınmıştır.

2.1.2. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

2.1.2.1. Farklanma (Plastisite)

Farklanma terim olarak, büyüme ve farklanma faktörlerinin, sitokinlerin, hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücrelerarası iletişimlerin birlikte etki etmesiyle meydana gelen, hücrelerin olgunlaşma ve uzmanlaşmaları sırasında oluşan değişiklikleri ifade etmek için kullanılır. Farklanma aşamasında hücre, bölünmeyi durdurur ya da çevresinden gelen sinyallere yanıt vermek için hücre içi reseptörler ve aktivasyon yollarını aktive ederek tetikte bekler (Can, 2009).

Laboratuvar ortamında kök hücrelerin istenilen hücre türüne farklanması belli kimyasal ve fiziksel koşulların sağlanması ile mümkün olur. Örneğin yetişkin bir kök hücrenin yağ hücresine farklılaşması için belli dozlarda kimyasallar ile (deksametazon, indometazin, izobutil metilksantin ve insülin gibi doğal hormonlar) kültür ortamı hazırlanır. Yetişkin bir kök hücresinden yağ hücresine farklılaşmış bir hücrede; yağ hücresine özgü proteinlerin sentezi, yağ hücresi fenotipinin kazanılması, nötral yağların ve trigliseridlerin depolandığı büyük yağ damlacığının ortaya çıkması beklenir. İn vitro ortamda genellikle birkaç haftada bu yolla elde edilen yağ hücrelerinin in vivo karşılıklarıyla kıyaslanacak düzeyde olgunlaşmaları kök hücre çalışmaları alanında son hedef gibi gözüken “in vitro ortamda farklandırılan kök hücrelerin canlıya nakledilmesiyle elde edilecek tedavi etkinliği, kök hücrelerin farklandırılmadan nakledilmesiyle elde edilebilir mi?” sorusunu akla getirmektedir (Can, 2009).

Farklanmakta olan bir hücrede protein sentezi ile ilgili işlevlerin tümünde ileri derecede bir artış görülür. Farklanmakta olan kök hücrelerde görülen protein sentezindeki bu artış hücreye gerek yapısal, gerekse işlevsel anlamda özgünlük kazandırmayı hedefler. Bu yönüyle bakıldığında, örneğin embriyonik kök hücreler her üç germ yaprağına özgü proteinleri sentezleme yetisi gösterebilirken, farklanma basamaklarında ilerlemiş ve tek bir germ yaprağına özgü öncü kök hücreleri sadecebu germ yaprağına ait proteinleri sentez yetisi gösterebilir. Buda farklanmada sona yaklaşıldığının bir ölçüsü olarak kabul edilir (Can, 2009).

Kök hücrelerin en önemli özelliklerinden biri farklanma kapasitelerinin yüksek oluşudur. Tablo 2, kök hücrelerin farklanma potansiyellerini örnekleri ile özetlemektedir. Yapılan çalışmalarda araştırmacılar bir yönde farklanmış hücrenin bir başka hücreye doğru farklanmasına ara farklanma (transdiferansiyasyon) olarak tanımlamaktadırlar (Can, 2009).

Tablo 2. Kök hücrelerin farklanma yetkinliği (plastisite). Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Ulusal Sağlık Enstitüsü, totipotent kavramını "sınırsız kapasite", pluripotent kavramını da "birçok dokuya köken verebilme" olarak tanımlamıştır (2000).

Kısaltılmış biçimi	Anlamı	Örnek
Toti	Bütün	Embriyon
Multi	Birçok	Hematopoetik
Pluri	Çok	Hematopoetik
Oligo	Az	GİS kök hücreleri
Quadri	Dört	GİS kök hücreleri
Tri	Üç	Bronş epiteli
Bi	İki	Safra kanalı
Uni	Bir/tek	Prostat

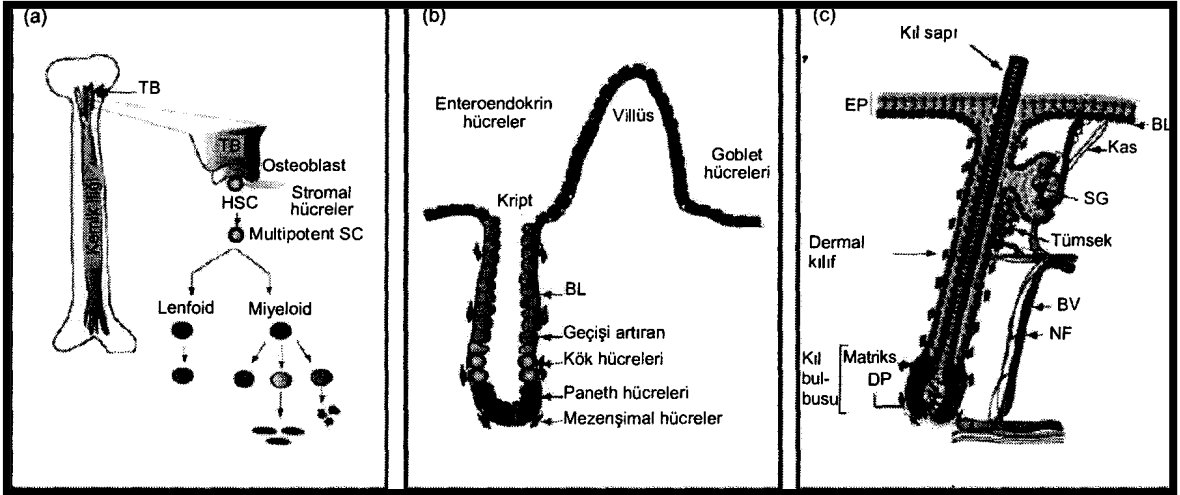
Bu tablo Can (2009)'dan alınmıştır.

2.1.2.2. Kendini Yenileme, Bölünme Biçimleri ve Kök Hücre Nişi

Bir kök hücrenin kendini yenileyebilmesi kendi kopyalarını oluşturacak şekilde çoğalarak, gerektiğinde organ yada dokuya özgü öncü hücrelere farklılaşabilmesidir. Kök hücreler ile farklanmakta olan hücreler arasındaki denge, yetişkin insan hücrelerinin ve dokularının uzun süreli korunması ve onarımında önemlidir. Bu hücrelerin kendini yenileme mekanizmalarının tespiti doku onarımı ile ilgili hücresel tedaviye yönelik çalışmalara ışık tutacaktır (Can, 2009).

Kök hücreleri ile öncü hücreler arasındaki fark; kök hücrelerin öncü hücreleri oluşturacak hücelere dönüşmesi sürecinde aynı zamanda kendi kopyalarının da oluşturmasıdır. Bu olay hem hücre içi hem de hücre dışı etkenlerin birlikte çok sıkı kontrol edilmesini sağlayan asimetrik hücre bölünmesi ile olur. Hücre içindeki asimetrik bölünme ile organeller, protein grupları ve RNA'nın tek bir seçilmiş hücreye aktarılması sağlanır. DNA'da hücreler arasında asimetrik olarak dağıtılır. Bu mekanizma dahilinde ilk olarak DNA yavru hücrelerden kök hücre özelliğini koruyacak olan hücreye gider ve kararlanır. Diğer tarafta öncü hücreye dönüşecek olan diğer hücre yeni DNA sentezler. Bu sistem sayesinde kök hücrelerde sabit genom korunurken, DNA'da mutasyon gibi zararlı etkilerden korunmuş olur. Kök hücrelerin hücre dışı asimetrisini hücrenin dışındaki mikroçevre (hücre dışı matris bileşenleri, komşu hücreler ve salgı proteinleri) oluşturur. Bu mikroçevreye 'niş' adı verilir. Hücre dışı asimetrisi ile hücre sayısı ve hücrenin bulunduğu ortam kontrol altında tutulur. Örneğin; *Drosophila* ovariumunda, mitoz mekiği niş dik açıyla konumlanır. Niş yakın olan hücre kök hücre özelliğini korurken diğer hücre nişten uzaklaştığı için kök hücre özelliğini kaybeder. Bu durum bölünme ekseninin niş tarafından kontrol edildiğini gösterir (Can 2009).

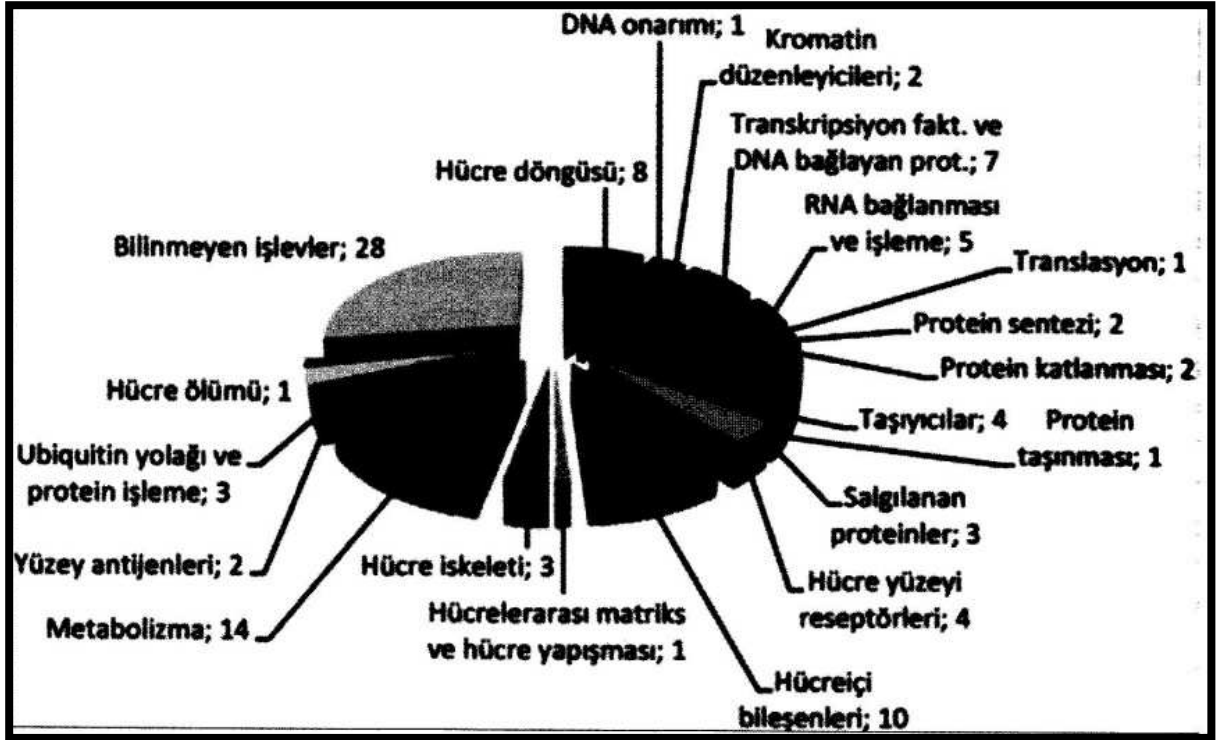
Sonuç olarak, hücre içi ve dışı sinyallerin kutuplaşması, hücrenin kendini yenilemede önemli etkenlerden birisidir. Kök hücrelerin niş ortamından uzaklaşmaları kendini yenileme özelliklerinin ortadan kalmasına neden olur. Kök hücre nişine örnek olarak, kemik iliğindeki kök hücre nişinde, ise osteoblastlar, endotel hücreleri, hematopoetik kök hücreler, büyüme faktörleri, kollajen ve çok sayıda hücrelerarası matris bileşeni yer alır. Şekil-1'de 'kök hücre nişi' kavramına örnek olarak kemik iliğindeki hematopoetik kök hücre nişi, ince bağırsaktaki kök hücre nişi ve kıl folikülü kök hücre bileşenleri ile şematize edilerek gösterilmiştir. Gelişme, yaşlanma, yaralanma ve hastalık gibi durumlara bağlı olarak hücre içi ve hücre dışı faktörlerin değişime uğraması, kök hücrelerin bu durumdan negatif yönde etkilenmesine yol açabilir. Kök hücrelerin kendini yenileme mekanizmasının hassas bir denge içinde ayarlanması, bir yandan farklılaşmakta olan yeni hücreler oluşurken öte yandan kök hücre havuzu sabit tutulmaya çalışılması gerekir (Can, 2008).



Şekil 1. Kök hücre nişleri: Üç farklı kök hücre nişi gösterilmiştir. (a) Kemik iliğindeki endosteal hematopoetik kök hücre (HSC) nişi. HSC'ler, trabeküler kemiğin (TB'nin) endosteal yüzeyine yakın yerleşim gösterirler ve endosteal osteoblastlardan oluşan bir alt küme, bu nişin bir bölümünü oluşturur. Osteoblastlar ile HSC'ler arasındaki temas ortadan kalktığında, HSC'ler aktive olur ve kan hücrelerinin dizinlerini oluşturmaya farklılaşırlar. (b) İnce barsakta, kök hücreleri, burada hücre tüpü olarak adlandırılan kriptlerin tabanına yakın bir bölgede yerleşmişlerdir. Barsaktaki kök hücreler, dört farklı soyu oluştururlar: Paneth hücreleri, enteroendokrin hücreler, goblet hücreleri ve emici enterositler. Kript epiteli, dıştan mezenşim ile sarmalanmış bir bazal lamina (BL) ile ayrılmıştır. Mezankimal hücreler, kök hücre aktivitesini düzenleyen sinyaller yayarlar. (c) Deride, kıl folikülü kök hücreleri, yağ bezlerinin (SG'lerin) altında ve erekteör pili kasının bileşkesinde yerleşmiş olan 'tümsek' bölgesinde bulunurlar. Folikül, bir bazal lamina (BL) ile çevrelenmiştir; BL'yi ise bir dermal kılıf çevreler. Tümsek kök hücreleri, transiti artıran mezankimal hücreleri oluştururlar; bu hücreler de çoğalır ve kıl sapını ve onu çevreleyen kanalı oluşturmak üzere farklılaşırlar. Matriks hücreleri, özelleşmiş mezankimal hücrelerden oluşan bir cep olan derma papilla (DP) ile çevrelenmiştir. Sinir lifleri (NF'ler) epidermisi (Ep) ve tümseği inerve ederler ve kan damarları (BV) besinleri sağlar. De Bari ve ark. (2006)'dan alınmıştır.

2.1.2.3. Köklülük (Stemness)

Kök hücreleri diğer hücrelerden hücreSEL ve moleküler düzeyde farklı kılan özellikler bütününe ‘köklülük’ denir. Bu kavramda rol oynadığı düşünölen özgün gen ifadeleri ve translasyon sonrası bir dizi değışimler Şekil-2’de özetlenmiştir.



Şekil 2. İnsan embriyonik kök hücrelerinde yapılan DNA mikrodizin analizlerine göre 918 gen bölgesinin işlevlerine göre dağılımı (%). Sato ve ark. (2003)’dan alınmıştır.

Günümüzde kök hücre tipini belirlemenin en yaygın yolu daha önceden kök hücrelere özgü olduğu bilinen bir takım belirteçler kullanmaktır. Bu belirteçlerden çoğu “CD”

(Farklanma Kümeleri=Clusters of Differentiation) başlığı altında toplanır. Bu belirteçler sinyal yolları üzerinde ve hücre-hücre yapışma molekülleri olarak işlev görürler. Örnek olarak, hamatopoetik kök hücreler için en yaygın kullanılan belirteçlerden bazıları ; CD33 ve CD45 iken mezankimal kök hücreler için ise bu belirteçler; CD29, CD90, CD105, CD73, CD44 şeklinde sıralanabilir (Ayrıntılı bilgi “<http://www.sciencegateway.org/resources/prow/>” internet sitesinden edinilebilir).

2.1.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler “destek hücresi” özelliği taşıyan, stromal kökenli, erişkin kök hücre tipidir. Bu hücreler hematopoetik özellikte olmayan (non-hematopoetik) pluripotent kök hücrelerdir ve pek çok değişik hücre türüne farklılaşma yetenekleri vardır. Birçok dokudan elde edilebilirlikleri, sayıca çoğalabilmeleri ve dayanıklı olmaları nedeniyle tıbbın bir çok alanında kullanım potansiyeline sahiptirler. Bütün bunların yanında çoğunlukla immün sistem üzerine baskılayıcı özellik taşımaları, salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matris ile yakın ilişki halinde bulunmaları ilgiyle karşılanmaktadır (Çetinkaya, 2009).

Mezankimal kök hücrelerin dezavantajı elde edildikleri dokularda az sayıda bulunmalarıdır. Bu durum temel bilim araştırmalarında ve klinik kullanım alanlarında mezankimal kök hücrelerin in vitro çoğaltılmalarını gerekli kılar. Yine karşılaşılan bu durum yüzünden hücre kültürü pasajlamaları ile maruz kalınan birçok uyarıcı faktör kök hücrelerin biyolojik ve immünofenotipik özelliklerinde farklanmaya yol açabilir. Mezankimal kök hücreler ile yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu in vitro çalışmalar olup, bu hücrelerin tanımlanmış özelliklerinin büyük çoğunluğu in vivo özelliklerini yansıtmaz. Kültür ortamlarında pasajlamaya bağlı olarak hücre yaşlanması, sitogenetik bozukluk ve düşük de olsa malign transformasyon riski bulunmaktadır. Bütün bu durumlar mezankimal kök hücrelerin klinik alan uygulamaları açısından dikkate alınması gereken özelliklerdir (Çetinkaya, 2009).

Mezenkimal kök hücreler yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilen bağ dokusu hücreleridir. Bu hücreler ilk kez Fridenstein tarafından 1976 yılında tanımlanmışlardır. Fridenstein, kemik iliği kültürlerinde FCS (fötal buzağı serumu) kullanarak fibroblast benzeri hücreler elde etmiş, daha sonrada bu hücrelerin kemik ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabileceğini göstermiştir. Önceleri, CFU-F (Colony forming unit fibroblast) ve “Kemik iliği stromal fibroblast”ları olarak anılan bu hücrelere günümüzde, araştırmacılar arasında farklı tanımlamalara yol açsada, mezenkimal kök hücreler adı verilmektedir (Çetinkaya, 2009).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), pre-klinik çalışmalar için insan MKH’lerini tanımlamada belli ölçütler getirmiştir. ISCT kriterlerine göre;

- “kök hücre” olarak isimlendirilmek yerine “mezankimal stromal hücre” veya “multipotent mezankimal stromal hücre/ MSC” olarak isimlendirilmiş olmaları önerilmiştir. Ayrıntılı bilgi için ‘<http://www.celltherapysociety.org/>’.
- MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler (Çetinkaya, 2009);
 1. Plastik yüzeye yapışması (plastik adherens),
 2. stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu,
 3. ve multipotent farklılaşma potansiyelidir.

2.1.3.1. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

MKH’ler için ana kaynak kemik iliğidir. Kemik iliğinde MKH’ler dışında mezoderm kökenli hematopoetik ve endotel kök hücreleri bulunur. Farklı çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücreye karşı ortalama 2 ile 100 arasında değişen sayıda MKH mevcut olduğu gösterilmiştir (Çetinkaya, 2009).

Kemik iliği dışında MKH kaynakları olarak; karaciğer, kas dokusu, sinovial sıvı, kemik, periost, lipoaspirasyon materyalleri, göbek kordonu kanı, göbek kordonu stroması, plasenta, amniyon sıvısı, diş pulpası ve maksillofasial dokuları sıralayabiliriz. Solid dokulardan enzimatik izolasyon yapılabilir.

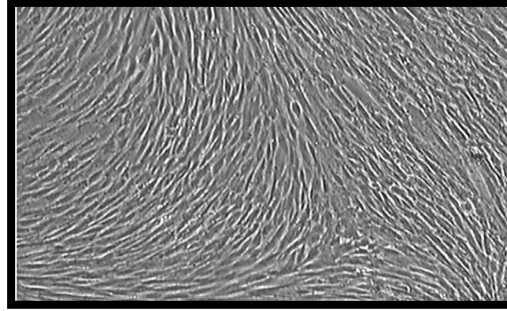
İzole edilen hücreler yukarıda belirtildiği gibi fibroblastoid morfolojide olup, kültür kaplarına yapışabilen, çok yönlü farklılaşabilen ve spesifik yüzey belirleyicilerini taşıyan hücrelerdir.

Yapılan çalışmalarda köken alınan doku tipine göre, bu hücrelerin farklılaşma özellikleri ve fonksiyonları bakımından farklılık gösterebileceği belirtilmiştir. Bu yüzden doku onarımlarında o bölgeye spesifik doku kullanımının daha avantajlı olacağı vurgulanmıştır (Çetinkaya, 2009).

Mezenkimal kök hücrelerle yapılan çalışmalarda en güncel konulardan biri hücrelerin dokularda yerleşimi ve niş bölgelerinin incelenmesidir. Periferik kanda osteojenik farklılaşma yeteneği olan nonhematopoetik ve MKH karakterinde hücreler olduğu gösterilmiştir. Ağır hasar olan durumlarda periferik kandan MKH izole edilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, MKH'lerin dokularda perisitler gibi perivasküler bölgede konumlandığını, komşu hücrelerin olgunlaşma, farklılaşma ya da sessiz kalma gibi hücre fonksiyonlarını kontrol ettiğini göstermiştir (Çetinkaya, 2009).

2.1.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Fiziksel Özellikleri ve In Vitro Çoğaltılmaları

Daha öncede belirtildiği gibi mezenkimal kök hücreler dokularda çok az sayıda bulunmaktadır. MKH'ler faz kontrast mikroskopu altında, hücre kültür ortamlarında incelendiğinde, iğ şeklinde fibroblast benzeri hücreler oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 3). Hücreler düşük konsantrasyonda koloni oluştururken, yüksek yoğunlukta hücre bulunan ortamda yan yana dizilmiş hücre grupları halinde buldukları gözlemlenmiştir. Mezenkimal kök hücreler klinik uygulamalarda ve bilimsel araştırmalarda kullanılabilmesi için in vitro çoğaltılmaları gereklidir. Bu hücrelerin in vitro çoğaltıldıkları zaman kültürde farklılaşma potansiyellerini ve fonksiyonlarını korudukları gösterilmiştir (Çetinkaya, 2009).



Şekil 3. In vitro kültürde trabeküler kemik kökenli insan mezankimal kök hücreleri
(Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Abd, 2010)

In Vitro Kültür Şartları

İn vitro kültür ortamında plastik flask tabanına yapışma (adezyon) göstermiş olan MKH'ler % 10-15 FCS/FBS varlığında, fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilmektedirler.

Kemik iliğinden izolasyon için dansite gradient yöntemi kullanılırken diğer dokulardan MKH izolasyonu için enzimatik ayrıştırma yöntemi kullanılır. En sık kullanılan enzimler kollajenaz tip-1 (3 µg/ml) ve dispaz (4 µg/ml) karışımıdır (Çetinkaya, 2009). Süspansiyon haline getirilen hücreler kültür vasatı içinde, kültür kaplarına (T25 , T75 'lik flakslar vb.) konularak % 5 CO₂ içeren 37°C'lik ve %95 nemli inkübatörde inkübasyona bırakılır. Hücre çoğalma yeteneği, kullanılan FBS'in kalitesi ile doğrudan ilişkilidir. Ekim yapılan heterojen hücre topluluğu arasında az sayıda bulunan MKH'lerin çoğaltılması için %10'luk FBS içeren bir kültür ortamı hazırlanmalıdır (Çetinkaya, 2009).

Standart hücre kültürlerinde, kültüre edilen az sayıdaki MKH topluluğu, plastik kabın tabanına adezyon molekülleriyle tutunur. Yirmidört, kırksekiz 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 yirmidört saat bekletilip, daha sonra sıvı nitrojen içerisinde saklanabilir. Buna alternatif olarak kontrollü dondurma cihazları da geliştirilmiştir (Çetinkaya, 2009).

Hücrelerin çoğalma hızı; verici yaşı, hayvan türü, kültür vasatı özellikleri, ekilen hücre yoğunluğu gibi faktörlere bağlı değişim göstermektedir. Hücreler belli bir pasaja kadar çoğalmalarını devam ettirirken, pasajlar ilerledikçe (örneğin P10 ve üzeri) çoğalma hızlarında azalma görülebilmektedir. Pasaj sayılarının artmasıyla birlikte hücrelerde stres belirtileri ortaya çıkabilmekte ve bunların hücrelerin özelliklerini olumsuz etkileyebileceği bilinmektedir. Birçok çalışmada ilerleyen pasajlarda MKH'lerde sitogenetik telomer kısalması vb. bozukluklar geliştiği bildirilmiştir. Telomeraz aktivitesinin MKH'ler de yüksek olarak bulunması in vitro çoğalma kapasitelerini korumaları ile ilişkilidir. MKH'lerde istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasını önlemek amacıyla P3-P5 gibi erken pasajların kullanımı önerilmektedir (Owen, 1998).

2.1.3.3. Mezankimal Kök Hücrelerin İmmünojenotipik Özellikleri

Heterojen hücre kültürlerinde sadece MKH'leri tanımlayan spesifik bir antijen henüz tanımlanmadığından MKH'leri ortamda bulunan diğer hücre gruplarından ayırt etmek için hematopoetik kök hücreler veya hücrelerin izole edildiği dokuya özgü antijenlerin negatif olması gerekmektedir. MKH'lerin adezyon, hücre-hücre, hücre-hücre dışı matriks ilişkilerinde rol oynayan, ve stromaya özgü antijenleri yüksek oranda eksprese ettikleri, hematopoetik hücrelere özgü antijenleri ise ekspre etmedikleri saptanmıştır. Kemik iliğinden elde edilen MKH kültürlerinin immünojenotipik özellikleri, akım sitometri tekniği ile incelenmiştir (Çetinkaya, 2009). Bu çalışmaya göre; MKH'lerin stroma ile ilişkili antijenlerden tipik kabul edilenlerden SH2 (CD10⁵), SH3-SH4 (CD73), CD90, CD29, CD44 için pozitif olması beklenirken, hematopoetik antijenlerdeki (CD45, CD34, CD14 veya CD11b, HLA sınıf II, CD79 α veya CD19 vb.) pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekmektedir.

ISCT kriterlerine göre bir MKH popülasyonunun %95 veya daha fazlasının CD10⁵ (endoglin olarak bilinir ve orijinal olarak MAb SH2 şeklinde tanımlanmıştır), CD73 (ekto- 5' nükleotidaz olarak bilinir ve orijinal olarak MAb SH3 ve SH4 şeklinde tanımlanmıştır), CD90 (Thy-1 olarak da bilinir) antijenleri için pozitif olması gerekmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, CD146 için pozitif hücre popülasyonunun MKH'lerin osteojenik farklılaşmasında kayda değer bir ölçüde fazla olduğu göstermiştir (Çetinkaya, 2009).

2.1.3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli

Mezenkimal kök hücrelerin, uygun mikro çevre koşulları sağlandığında birçok hücre tipine farklılaşma potansiyelleri, MKH'leri rejeneratif tıp uygulamalarında ilgi çekici bir hale getirmiştir. Çetinkaya (2009)'da özetlendiği üzere vitro koşullarda MKH'lerin; kondrojenik, adipojenik, osteojenik ve miyojenik farklılaşma potansiyelleri metin olarak göstermiştir. Bunlara ilave olarak; MKH'lerin endotel hücreleri, pankreas beta hücreleri, epitelyal hücreler, hepatositler, nöroglial hücrelere de farklılaşabildikleri göstermiştir (Çetinkaya, 2009). Bunlar içinde, özellikle nörona farklılaşmanın mümkün olup olmadığı halen araştırmacılar arasında tartışma konusu olsada, nöronal farklılaşmayı aktive eden stimulanlarla 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 stimulanlarla kondrojenik, adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri rahatlıkla gösterilmektedir.

Adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma özelliklerin belirtilmesi MKH'lerin tanımlanması için gereklidir (Şekil-4). MKH'lerin farklılaşması ile ilgili dezavantajlardan biriside MKH'lerin kendi kökeninden olmayan adiposit, osteosit, miyosit, hepatosit, pankreas beta hücresi gibi hücrelere trans-farklılaşmasının in vivo koşullarda sınırlı olmasıdır. Bu durum klinik uygulamalar açısından önem taşımaktadır. Buna karşılık, bağ doku kökenli dokuların onarımında MKH'lerin farklılaşma özelliğinin daha aktif rolü olabileceği düşünülmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri şu şekildedir (Çetinkaya, 2009).

2.1.3.4.1. Adipojenik farklılaşma

MKH'ler idame kültürlerinde %90-100 oranında doygun hale geldiklerinde, DMEM-düşük glukoz içerisinde %10 FCS, 1 µM deksametazon, 60 µM indometazin, 500µM IBMX (izobütümetilksantin) ve 5µg/ml insülin ile hazırlanan kültür vasatı ile adipojenik farklılaşma stimüle edilir. 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılır.

3 hafta sonra adipojenik farklılaşma analizi yapılır. Bu analiz için Oil Red O boyaması ve lipoprotein lipaz (LPL) gen ekspresyon analizleri önerilmektedir (Tuli ve ark. 2003, Nöth ve ark. 2002).

2.1.3.4.2. Osteojenik farklılaşma

MKH'ler idame kültürlerinde %50-60 oranında doymuş hale geldiklerinde, DMEM-düşük glukoz içerisinde %10 FCS, 100 nM deksametazon, 10 nM betagliserofosfat ve 0.2 mM askorbik asit ile hazırlanan kültür vasatı ile osteojenik farklılaşma stimüle edilir.

37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılır. 3 hafta sonra kültürdeki ekstraselüler matrikste kalsifikasyon, kalsiyum fosfat depoları analizi yapılır. Bu amaçla Alizarin Red S boyaması ve osteokalsin (OC), kemik sialoprotein (BSP), alkalin fosfat (ALP), tip I kollajen (Col I α 2) gen ekspresyon analizleri önerilmektedir (Tuli ve ark. 2003, Nöth ve ark. 2002).

2.1.3.4.3. Kondrojenik farklılaşma

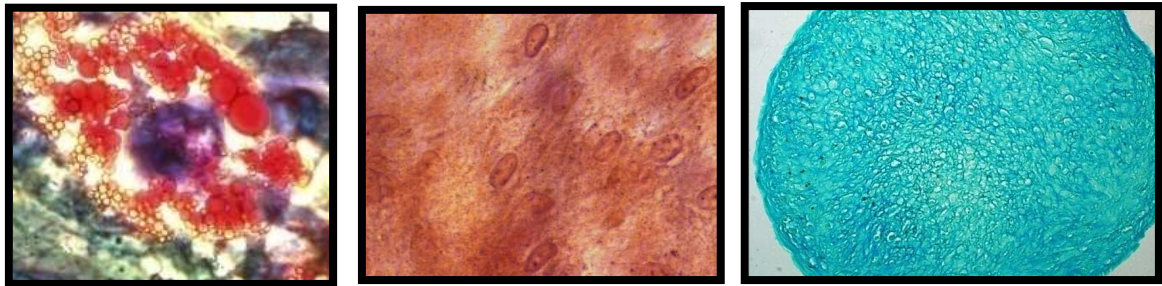
MKH'ler pellet (çökelti) kültürler haline getirilir (1,5-2,5 \times 10⁵ hücre/pellet) Hücre pelleti üzerine DMEM-HG (yüksek glukoz) içerisinde 100 nM deksametazon, 10 ng/ml TGF β , 50 μ g/ml askorbik asit ve 50 mg/ml ITS+Premiks ilave edilerek hazırlanmış olan kültür vasatı konularak kondrojenik farklılaşma stimüle edilir. 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılır. 3 hafta sonra kondrojenik farklılaşma analizi yapılır. Bu amaçla matriks glikozaminoglikan içeriği Alcian mavisi boyası ile boyanabilir ve tip X kollajen, aggrecan, tip II kollajen ve Sox 9 gen ekspresyon analizleri önerilmektedir (Tuli ve ark. 2003, Nöth ve ark. 2002).

2.1.3.4.4. Nöronal farklılaşma

Doku kültür kapları içindeki hücreler üzerine, DMEM-LG içerisinde 200 μ M BHA (bütillenmiş hidroksianisol), 10 μ M forskolin (FSK), 20 mM valproik asit (VA), 2% DMSO, 25 mM KCl, 1 μ M hidrokortizon, 5 μ g/ml insulin ve %1 pen/streptomisin ile hazırlanan farklılaşma vasatı ilave edilerek nöronal farklılaşma stimüle edilir. 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılır. Kırkbeşinci dakika ile 24. saat arasındaki morfolojik değişiklikler takip edilir.

Farklılaşan hücrelerin hedeflenen hücrelerin özelliklerine sahip olup olmadıklarını anlamak için nöronal belirleyicilere yönelik histokimyasal, immünohistokimyasal veya immünofloresan yöntemler kullanılarak ekspresyon analizleri yapılabilir. Ayrıca karşılaştırmalı gen ekspresyon analizleri kullanılabilir.

A. Adipojenik farklılaşma B. Osteojenik farklılaşma C. Kondrojenik farklılaşma



Şekil 4. Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaları (Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AbD, 2010)

Kök hücre plastisitesi, bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara farklılaşma özelliğini tanımlamaktadır (Keller, 2002). Mezenkimal kök hücrelerin, kendi dizinleri dışındaki farklı hücre dizilerine de farklılaşabilme niteliği, özellikle rejeneratif tıp ile ilgili dallarda çok ilgi uyandırmış, bu konuda çok sayıda çalışma yapılmış ve “kök hücre plastisitesi” adı altında toplanmıştır. Kemik iliği kökenli MKH’ler ile yapılan çalışmalarda bu hücrelerin endotel hücreleri, pankreas beta hücreleri, epitelyal hücreler, hepatositler, nöroglial hücrelere de farklılaşabildiği gösterilmiştir. In vitro ortamda hazırlanan farklılaşma protokollerinde stimüle edici ajanlar olarak TGF beta, FGF4, HGF, VEGF gibi moleküller kullanılmaktadır. Endotel hücresi geliştirmek için VEGF 10ng/ml + Fibronektin + deksametazon + askorbik asit 2-fosfat, epiteloid hücreler kullanılırken ve hepatosite farklılaşma için fibroblast büyüme faktör (FGF) ve hepatosit büyüme faktör (HGF) kullanılmaktadır.

Kalp kası için kardiyak troponin, iskelet kası için distrofin, astrositler için GFAP (glial fibriller asidik protein) ekspresyonu, hepatosit farklılaşmasını kanıtlamak üzere de albumin, epitel hücre belirteci olarak sitokeratin ekspresyonuna bakılabilir.

İnsanlarda yapılan çalışmalarda allojenik kemik iliği transplantasyonu yapılan osteogenezis imperfektalı hastalara maternal yolla MKH verilmiş, MKH verilen hastanın bağırsak epitelyum hücreleri arasında verici tip hücreler gözlemlenmiştir. Bu araştırma, maternal yolla verilen MKH'lerin bağırsak epitelyum hücrelerine farklılaştığını göstermiştir. İlerleyen çalışmalar bu farklılaşmanın çevre koşulları ile ilişkili olduğu , hücrelerin hasarlı bölgeye doğru göç ederek hasar iyileşmesine yardımcı olduğunu göstermiştir (Çetinkaya, 2009).

MKH'lerin in vivo trans-farklılaşmasına dayalı çok sayıda hayvansal deney yapılmıştır. Bu çalışmalarda, MKH'lerden in vivo ortamlarda pulmoner Tip 1 alveolar epitel hücreleri, iskelet kası ve kalp kası hücreleri, hepatosit, nöronal hücre, astrosit, ince barsak epitel hücreleri meydana getirdiği immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Hücreler her ne kadar çok yönlü farklılaşabiliyor olsalarda hasar tamirinde çok fazla pozitif sonuçlarla karşılaşmamaktadır (Çetinkaya, 2009).

2.2. İskelet Sistemi Gelişimi

Vertebralılarda iskelet sistemi mezoderm ve crista neuralis hücrelerinden orijin alır (Ahrens vd. 1977, Moore vd. 1993). Primitif kemik yapıların oluşumunda ilk aşama mezenşim hücrelerinin yoğunlaşması ile ortaya çıkan model yapılarıdır (Moore vd. 1993, Hickok vd. 1998, Hall vd. 2000). Bu aşamadan itibaren kafatası kemiklerinde olduğu gibi bazı kemikler bu mezenşim doku içerisinde intramembranöz yolla, diğerleri ise extremitelerin uzun kemiklerinde olduğu gibi endokondral yolla gelişimlerini tamamlarlar. (Moore vd.1993).

2.2.1. İntramembranöz kemik gelişimi

Bu tip kemik gelişimi, yoğunlaşarak membranöz bir tabaka oluşturmuş mezenşim doku hücrelerinden, vaskülarizasyonu takip eden dönemde doğrudan osteoblastik hücre değişimi yolu ile oluşur (Moore vd.1993). Bu doğrudan değişim mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, Bone Morphogenetik Protein (BMP) grubu faktörlerin bu değişimde önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Gilbert 2001).

Osteoblastik değişime uğrayan hücreler osteoid doku veya prekemik adı verilen bir matriks salgılayarak, hücreler arası alanı doldururlar. İlerleyen dönemde prekemik dokunun kalsifikasyonu ve osteoblastlardan osteositlerin değişimi, gelişen kemik dokusunun organizasyonunu sağlar. Bu tip kemikleşmeye en güzel örnek yassı kafatası kemiklerinin gelişimleridir.

2.2.2. Endokondral kemik gelişimi

Bu tip kemik gelişimi, yoğunlaşmış mezenşim hücrelerinin oluşturduğu primitif kemik modellerinin önce kıkırdak dokuya değişimleri, ardından da bu kıkırdak dokunun yerini kemik dokuya bırakması yolu ile oluşur (Moore vd. 1993, Hickok vd. 1998, Hall vd. 2000). Dolayısı ile kondrogenез bu mekanizmanın önemli bir morfojenetik parçasıdır.

Geçmiş moleküler ve hücre düzeyindeki çalışmalar, endokondral kemik gelişiminde kondrogenез ve osteogenезin çok erken embriyonik dönemde planlandığını ve bu iki mekanizmanın birbirini takip eden fakat birbirinden bağımsız iki ayrı gelişim mekanizması olduklarını ortaya koymuştur (Hickok vd. 1998, Delise vd. 2000). Gerek kondrogenез süresince, gerekse takip eden osteogenез mekanizmaları esnasında meydana gelebilecek genetik ve/veya moleküler aksaklıklar ileri dönemde karşımıza birbirlerinden ayırt edilmeleri morfolojik yönden çok zor olan, ortak bir kemik ve/veya ekstremitte defekti fenotipi ile çıkacaklardır.

2.2.2.1. Endokondral Kemik Gelişiminin Aşamaları

Endokondral kemik gelişimi değerlendirildiğinde aşağıda sıralanan aşamalardan geçmektedir. (Şekil-5):

1. Lateral plate mezoderminden orijin alan mezenşim hücrelerinin, primitif ekstremitte tomurcuğu bölgelerine migrasyonları ve mitoz yolu ile proliferasyonları.

2. Prolifere olan bu mezenşim hücrelerinin ekstremite tomurcuklarının merkez orta bölgelerinde, hücreler arası teması arttırarak birbirlerine yaklaşmaları ve hücre kümeleri oluşturmak sureti ile yoğunlaşmaları.

Yapılan çalışmalar bu aşamada rol oynayan en önemli faktörlerin, hücre bağlantı molekülleri ailesine ait olan N-cadherin ve N-CAM (N-Cell Adhesion Molecule)'in prekondrojenik hücrelerdeki ekspresyonlarında görülen belirgin artış olduğunu ortaya koymuştur (Oberlender vd. 1994, Tavella vd. 1994). Bu dönemde ekstra cellüler matriks (ECM) mezenşim hücrelerinin birbirleri ile yakın temaslarına izin veren bir yapıda olup Kollajen Tip-I, hyaluronan, tenascin, fibronektin gibi faktörlerden zengindir (Hall vd. 1995, Hickok vd. 1998, Hall vd. 2000). Ayrıca, prekondrojenik mezankimal hücrelerde spesifik olarak eksprese edilen ve bir transkripsiyon faktörü olan Scleraxis'in kıkırdağa özel genlerin transkripsiyonlarını tetiklediği gösterilmiştir (Cserjesi 1995). Bu protein kıkırdak doku yerini kemik dokuya bırakıncaya kadar aktif kalır. Yine önemli bir transkripsiyon faktörü olan *Sox9* geninin de spesifik olarak prekondrojenik yoğunlaşma bölgelerinde eksprese edildiği ve bir sonraki aşama olan mezankimal-kondrojenik değişimi tetiklediği bilinmektedir (Wright vd.1995).

İnsanlarda *Sox9* geninde görülen mutasyonlar "Campomelik Dysplasia" adı verilen ve uzun kemiklerin deformite ve açılanması ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Delise vd. 2000).

3. Yoğunlaşmış mezenşim hücrelerinin birbirleri ile olan hücreler arası bağlantıları kaybederek kondrositlere değişimleri. Bu dönemde kondrositlerdeki N-cadherin ve N-CAM ekspresyonlarında belirgin bir azalma gözlenir (Oberlender vd. 1994, Oberlender vd. 1994, Tufan vd. 2001). Ayrıca kondrositlerden kıkırdak dokuya özgü bir ECM depozisyonu başlar.

Bu ECM'in en önemli bileşenleri olarak Kollajen Tip-I yerini Kollajen Tip-II, -IX, ve -XI'e bırakırken ilave olarak Gla proteini, kondroidin sülfattan zengin proteoglikanlar, aggrecan proteini, ve link (bağlantı) proteini salgılanmaya başlarlar (Hickok vd. 1998, Hall vd. 1995, Hall vd. 2000).

4. Kondrositlerin matürasyonları ve hipertrofiye uğramaları. Bu dönemde tipik olarak ECM'deki Kollajen Tip-II, -IX, ve -XI yoğunluklarını Kollajen Tip X'a bırakırlar ve ECM daha fazla fibronektin ve daha az proteaz inhibitörü içerir (Hickok vd. 1998, Hall vd. 1995,

Hall vd. 2000). 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 ekstremitelerde 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 alırlar (Şekil-5). Bu bölgelerdeki kıkırdak hücreleri hipertrofiye uğrarlarken Kollajen Tip-X bakımından zenginleşen ECM kalsifiye olmaya başlar. Bunu öncelikli olarak diyafizial bölgede vasküler dokunun perikondriumdan kıkırdak dokusuna infiltrasyonu ve osteoprogenitör hücrelerin kıkırdak dokuya taşınması izler. Bu yolla aynı zamanda ileride kemik iliğini oluşturacak hücreler de kıkırdak dokuya taşınmaya başlanır. Eş zamanlı olarak hipertrofiye kondrositlerde planlanmış hücre ölümü (apoptoz) gözlemlenirken, osteoprogenitör hücreler de osteoblastik hücrelere değişim göstermeye başlarlar. Ortaya çıkan apoptotik hücre yapıları kemik matriksinin mineralizasyonunda önemli rol oynarlar.

2.2.2.2. Endokondral Kemik Gelişimini Etkileyen Başlıca Faktörler

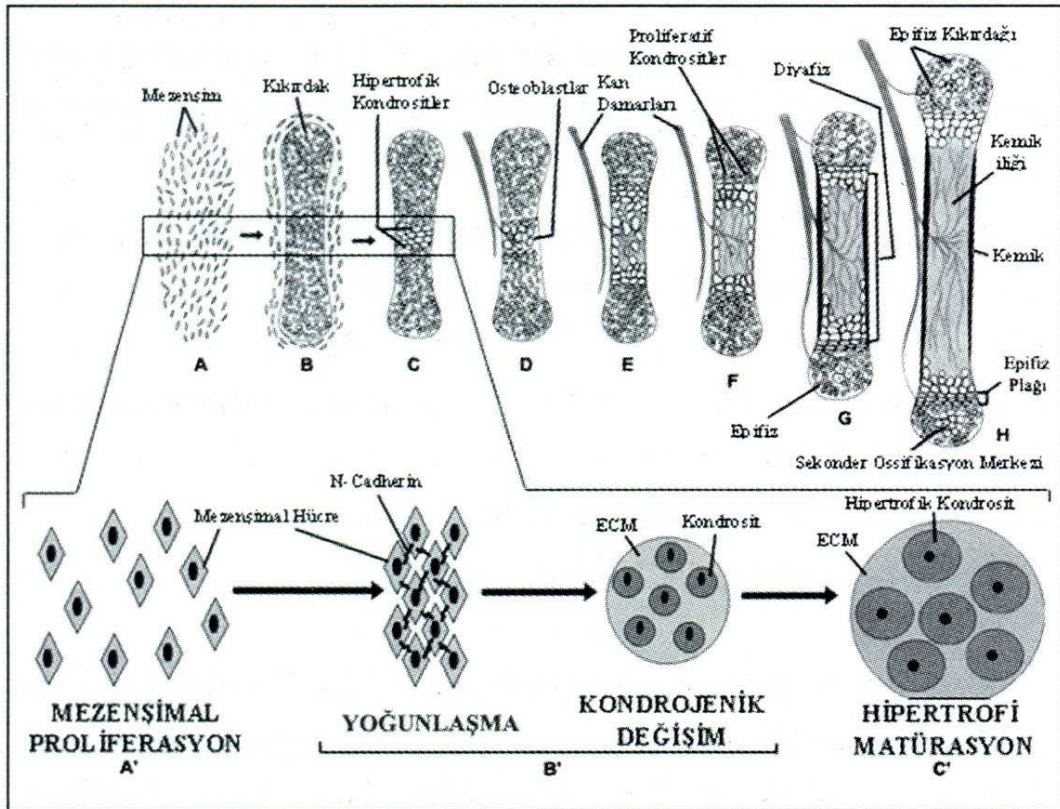
Yukarıda da özetle bahsedildiği gibi, kıkırdak dokuda proliferasyon ve hipertrofi mekanizmaları bir denge içinde çalışmak zorundadır. Bu dengenin sağlanmasında pek çok büyüme faktörü, hormon, sitokin ve hücre sinyal mekanizması rol almaktadır. Bunlar arasında “fibroblast growth faktor” (FGF)’ler (Deng vd. 1996, Webster vd. 1996), östrojen, tiroid hormonu ve triiyodotironin (T3) gibi hormonlar (Kaplan vd. 1990, Ballock vd. 1994), “transforming growth faktor- β 1” (TGF- β 1) (Rosier vd. 1989, O’Keefe vd. 1994), sinyal molekülleri “Indian Hedgehog” (Ihh) (Goodrich vd. 1996). ve “paratiroid hormon-related peptide” (PTHrP) (Iida-Klein vd. 1989, Abou-Samra vd. 1992), anti-apoptotik faktörlerden Bcl-2 (Vaux vd. 1988, Lee vd. 1995), ayrıca “Tumor Necrosis Factor” (TNF) (Wallen-Ohman vd. 1993) ve p53-tümör baskılayıcı genler grubundan p63 (Yang vd. 1999) başlıcalarıdır. Epifiz plağı bölgesinde (Şekil-5) FGF’lerin etkisi ile kıkırdak hücrelerinin proliferasyonlarında azalma ve değişime uğrayarak matüre ve hipertrofiye olma hızlarında artış görüldüğü tesbit edilmiştir (Gilbert 2001). İnsanlarda FGF reseptörlerinde (FGFR) görülen mutasyonların yol açtığı en ciddi klinik tabloyu “dwarfizm ” olguları oluşturur.

Örneğin, FGFR3'ün transmembran bölgesine özel olan ve glycin'in arginin'e dönüşümünü sağlayan, 380 numaralı amino asit'te meydana gelen mutasyon "Achondroplasia" olgularının % 95'lik bir çoğunluğuna yol açar (Deng vd. 1996, Webster vd. 1996, Gilbert 2001). Diğer taraftan, FGFR1'de görülen mutasyonların ekstremitte defektleri ve kranial sütürlerin erken kapanması (Craniosynostosis) ile karakterize "Pfeiffer" sendromuna yol açtığı gösterilmiştir (Gilbert 2001).

Diğer bir önemli faktör östrojen hormonudur. Başta östrojen olmak üzere sex hormonları da proliferere olan kondrositlerin matüre ve hipertrofiye olmalarını hızlandırır (Kaplan vd. 1990). Yapılan çalışmalar T3 hormonunun da gelişen kemiklerin epifiz plaklarında hipertrofiye kondrositlerin kolumnar organizasyonlarında önemli rol oynadığını göstermiştir (Ballock vd. 1994).

Ayrıca, T3 hormon eksikliği görülen hipotiroidizm olgularında, kemiklerin epifiz plağı bölgelerinde mekanik dış etkilere karşı dayanıksızlık geliştiği gözlemlenmiştir (Loder vd. 1995). Diğer taraftan TGF- β 1'in ise kondrosit proliferasyonunu indükleyici olduğu saptanmıştır (Rosier vd. 1989, O'Keefe vd. 1994). Dolayısı ile 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 (Vortkamp vd. 1996). 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'in 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 moleküllerinin de apoptotik yolda önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Vaux vd. 1988, Yang vd. 1999).



Şekil-5: Uzun kemiklerde endokondral kemikleşme. (A-H) Uzun kemiklerde endokondral kemikleşme. **(A'-H')** Endokondral kemikleşme sürecinde önemli yeri olan kondrojeniz mekanizmalarının şematik gösterimi.

Özetle, yukarıda bahsi geçen mekanizmalar yolu ile ekstremitelerin kemiklerinde epifiz plakası adı verilen ve proliferasyon yapan kondrositleri, matür kondrositleri ve hipertrofiye kondrositleri içeren, diyafiz-epifiz birleşim noktalarında uzunlaşma gelişim sağlanır. Perikondrium ossifiye olarak yerini periost'a bırakır. Kondrositler diyafize doğru hipertrofiye olarak ilerler ve matür kondrositleri ve matür kondrositleri, bu hücrelerin yerlerini kemik dokuya bırakmaları ile sonlanır.

Epifiz plakaları da ossifiye olduklarında kemiklerde boy uzaması durur. Ekstremitelerde uzun kemiklerinin yanı sıra aksiyal ve pelvik kemikler de endokondral kemikleşme yolu ile gelişen iskelet yapılarıdır.

2.2.2.3. In Vitro Hücre Kültür Sistemlerinde Kondrojeniz Fazlarının Başlıca Belirleyicileri

Genel olarak özetlemiş olduğumuz bu endokondral kemikleşme mekanizması, canlı fare, sıçan ve tavuk embriyo sistemlerinde yapılmış pek çok çalışmanın yanı sıra, özellikle MKH'leri de içine alan pek çok *in vitro* kültür sisteminde de detaylı olarak moleküler düzeyde incelenmiştir (San Antonio vd.1986, Hall vd. 1995, Hickok vd. 1998, Mello vd.1999, Hall vd. 2000, Nöth vd. 2002, Tuli vd. 2003, Alan ve Tufan 2008). Bu *in vitro* model sistemlerin MKH'lerin kondrojenik değişimi süresince en sık kullanılanlarından birisi de çökelti hücre kültür sistemi (pellet culture system) olarak bilinmekte olup, bu çalışmada da kullanmış olduğumuz *in vitro* kondrojeniz hücre kültür modelidir. 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 kültürlerinde veya üç boyutlu koruyucu biyomateryaller üzerinde ve genellikle transforme edici büyüme faktörlerinden (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 veya kemik morfogenetik proteinleri, BMP'ler) birisinin uyarıcı etkisi altında gerçekleştirilebilir. Bu *in vitro* çalışmalarda, sıralamış olduğumuz:

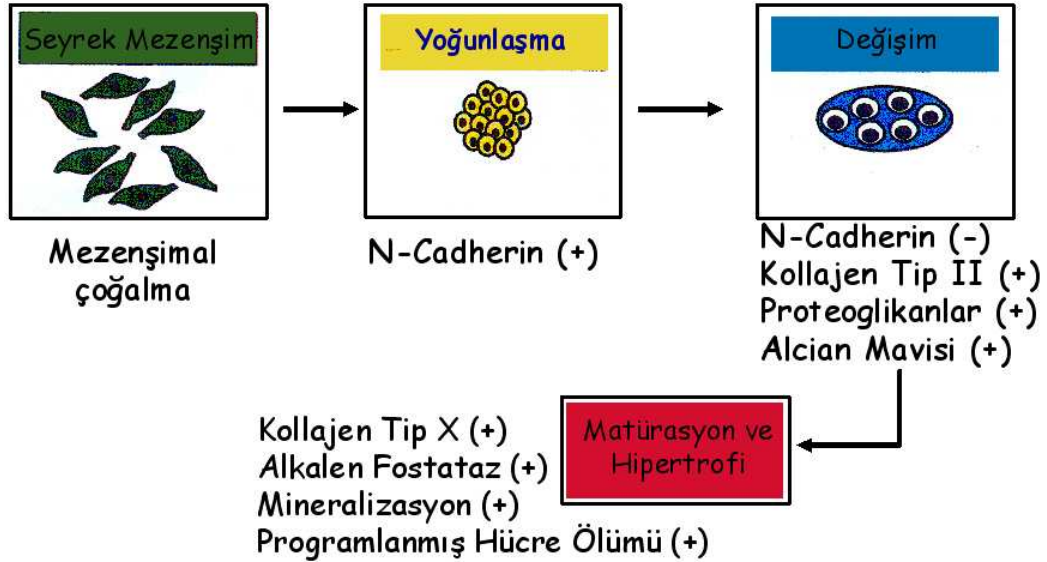
- 1- Mezenkimal proliferasyon,
- 2- Mezenkimal yoğunlaşma,
- 3- Kondrojenik değişim,
- 4- Kondrosit matürasyon ve hipertrofisi,
- 5- Programlanmış hücre ölümü (apoptoz), basamaklar zinciri mekanizmalarını

çeşitli moleküler belirleyiciler ile birbirlerinden ayırt etmek ve incelemek mümkündür (Şekil-6). Bu moleküler belirleyicilerden başlıcaları şu şekilde özetlenebilir:

Kollajen Tip II: mRNA veya protein düzeyindeki tesbiti prematüre kıkırdak dokusunda kondrojenik değişimin gerçekleşmiş olduğunu gösterir (Tufan vd. 2001). Gerek proliferasyon gerekse yoğunlaşma dönemlerindeki değişim geçirmemiş mezenşim hücreleri ise kollajen tip II negatifirler.

Şekil-6:

İN VİTRO KONDROGENEZ (MİKRO-KÜTLE HÜCRE KÜLTÜRÜ VE KONDROGENEZ)



Alcian Mavisi Boyaması: Alcian mavisi boyası özel olarak kondrojenik değişime uğramış hücrelerin ECM içerisine salgılamakta oldukları proteoglikanları mavi renge boyar (Lev vd. 1964). Prekondrojenik doku bu boyayı tutmaz.

Kollajen Tip X: Sadece hipertrofiye uğramış olan kondrositler tarafından ECM'e salgılandığı için mRNA veya protein düzeyindeki tespiti matürasyon ve hipertrofi fazına özeldir (Hickok vd. 1998, Mello vd. 1999, Delise vd. 2000).

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

2.3. Kondrojeniz 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 growth faktörler grubundan olan TGF- β ve FGF grubu proteinler, bu growth faktörlerin etki mekanizmalarında rol alan catenin, small mothers against decapentaplegic (SMAD) ve mitogen activated protein kinase (MAPK) grubu proteinler, Hox, Sox, Engrailed (En) 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 ekspresyonlarıdır.

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)'dir. Önemli bir cücelik grubu olan akromezomelik displazi NPR-B reseptörünün fonksiyon kaybına yol açan mutasyonları sonucu ortaya çıkar. NPR-B ile ilgili bu bilgi oldukça yeni olup (Bartels vd. 2004), 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 (linkage 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 (Kant vd., 1998, Ianakiev vd., 2000, Bartels vd. 2004).

AMDM (Maroteaux vd. 1971) 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 vertebralarda şekil bozuklukları, özellikle ekstremite orta ve distal uzun ve tubüler kemiklerinde kısalık ve epifiz büyüme plaklarında abnormaliteler ile karakterize bir patolojik durumdur (Kant vd. 1998; Haliloğlu vd. 1999; Ianakiev vd. 2000, Bartels vd. 2004). İlginçtir ki AMDM tanısı konmuş kişilerde bugüne kadar tutulum görülmüş olan tek sistem iskelet sistemidir.

2.3.1. Genel Olarak Natriüretik Peptitler ve Reseptörleri

2.3.1.1. Natriüretik Peptid Ailesi

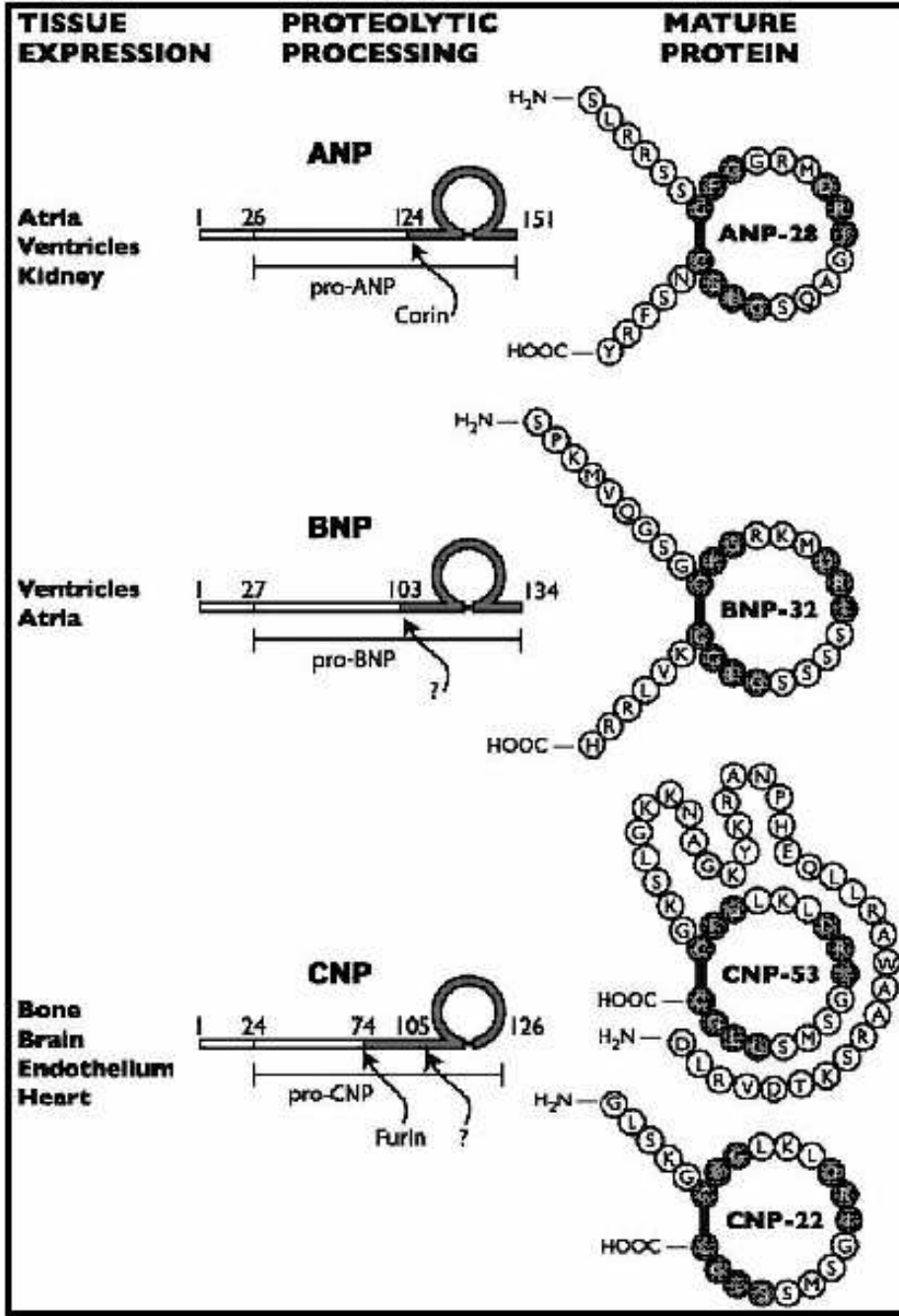
Natriüretik peptidler birbirleri ile yapısal benzerlik gösteren ancak genetik olarak farklı hormonlardır. Bir kısmı parakrin faktörler olarak da bilinen bu peptidiler: kan hacmi, kan basıncı, ventrikül duvar kalınlığı, pulmoner tansiyon, yağ metabolizması, ve uzun kemiklerde büyüme üzerine etkilidirler (Potter vd. 2006).

Bilinen 3 klasik tipi vardır (Şekil-4):

- 1- Atrial 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 De Bold ve arkadaşları (2005) tarafından sıçanlarda atriumlara intra venöz olarak enjekte edilen bir homojenatın renal sodyum ve su boşaltımını artırarak, kan basıncını hızla düşürdüğü gösterilmiştir. Bu gelişme sonrasında atrial dokudan, hem natriüretik etkisi hem düz kas gevşetme aktivitesi olan peptidler pürifiye edilmiş ve değişik çalışmalarda bu peptit atrial natriüretik faktör, kardionatrin, kardiodilatin, atriopeptin, ve atrial natriüretik peptit (ANP) olarak isimlendirilmiştir (De Bold 2005). Bu son tanımlama bugün en sık kullanılandır. İlerleyen yıllarda natriüretik peptit ailesinin diğer üyeleri olan beyin natriüretik peptit (BNP; B tip natriüretik peptit) ve C tipi natriüretik peptit (CNP) de sırası ile domuz beyin ekstratlarından ve onların gevşetebildiği düz kaslardan pürifiye edilmişlerdir (Olney 2006).

Bütün natriüretik peptidiler prehormon olarak sentezlenir (Şekil-7). İnsan preproANP'si 151 aminoasit uzunluğundadır. Aminoterminal bölümü ayrılması sonucu oluşan 126 aminoasitli proANP atrial granüllerde depolanan predominant formdur.



Şekil-7: Natriüretik peptidiler birbirleri ile yapısal benzerlik gösteren ancak genetik olarak farklı hormonlardır. Bilinen 3 tipi vardır: 1) Atriyal natriüretik peptid (ANP), 2) B-tipi natriüretik peptid (BNP), 3) C-tipi natriüretik peptid (CNP). (Potter et al., 2006).

ANP primer olarak atrial granüllerde depolanır ve eksprese edilir, fakat düşük konsantrasyonda ventrikül ve böbrek gibi dokularda da bulunur. ANP salınımı için birincil uyarıcı intravasküler volüm artması sonucu atrium duvarının gerilmesidir. Sekrete edilen ANP önce koroner sinüse perfüze olur, gerçek endokrin davranışla çeşitli hedef organlara ulaşır. Ayrıca endotelin, angiotensin, arginin-vazopressin, ANP salınımını uyaran faktörlerdir. İnsan ANP geni 1. kromozomun 1p36.2 lokusunda bulunur ve üç exon içerir.

B-tip natriüretik peptid esas olarak domuz beyin ekstratlarından pürifiye edilmiştir. Sonradan insanlarda veya hayvanlarda konjestif kalp yetersizliği veya miyokardial enfarktüs gibi kardiyak stres altında iken çok yüksek konsantrasyonda kalp ventriküllerinde bulunmuştur. BNP bir kardiyak hormondur ve normal yetişkin kalbinde ventriküllerden sekrete edilmektedir (Cameron VA, Ellmers I.J.). BNP 134 aminoasitli peprohormon olarak sentezlenir. Sonra bir parça ayrılır ve 108 aminoasitli prohormon haline gelir. Ardından, bilinmeyen bir proteazla kesilmesi sonucu 76 amino asitlik amino-terminal inaktif fragman ve 32 amino asitlik karboksil-terminal, biyolojik aktif peptid'e ayrılır.

BNP, atrial granüllerde ANP ile birlikte depolanır; ama ventriküler granüllerde depolanmaz. BNP yapımı aşırı volüm yüklenmesi sonucu kardiyak duvar gerilmesi ile regüle edilir. Nükleer transkripsiyon faktör, GATA4 bu olgunun düzenlenmesinde dominant rol oynar. Sağlıklı bireylerde plazma konsantrasyonu yaklaşık olarak 3.5 pg/ml veya ANP'nin onda biridir. Buna karşın, konjestif kalp yetersizliği olan hastalarda plazma BNP konsantrasyonu 200-300 kat yükselir, böylece BNP plazma konsantrasyonu kardiyak stresin ideal indikatörüdür. Birçok çalışma BNP seviyesinin yükselmesi ile kötü prognozunu korele olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak gerek ANP gerekse BNP esas olarak natriüreti ve kan basıncını regüle eden kardiyak hormonlar olarak ayırt edilmişlerdir.

Diğer taraftan sunduğumuz çalışmamızın da önemli bir bölümünü oluşturan CNP pek çok farklı dokuda eksprese edilir. Bunlar arasında başlıcaları kıkırdak, kemik, beyin, endotel, düz kas ve kalp olarak sıralanabilir (Potter vd. 2006).

Tipik olarak sentezi sonrası paketlenildiği hücre içi sekresyon granüllerinde depolanmaz, hemen sekrete edilir. Endotel hücre kültürlerinde sekresyonu TNF- α , TNF- β , IL-1 ve stres tarafından uyarılır, insülin tarafından da suprese edilir.

İnsan proCNP'si 103 aminoasit içerir ve intracellüler endoproteaz furin'le in vitro işleme tabi tutularak olgun 53 aminoasitli 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 majör form iken; CNP-22 insan plazması ve cerebral-spinal sıvıda predominanttır.

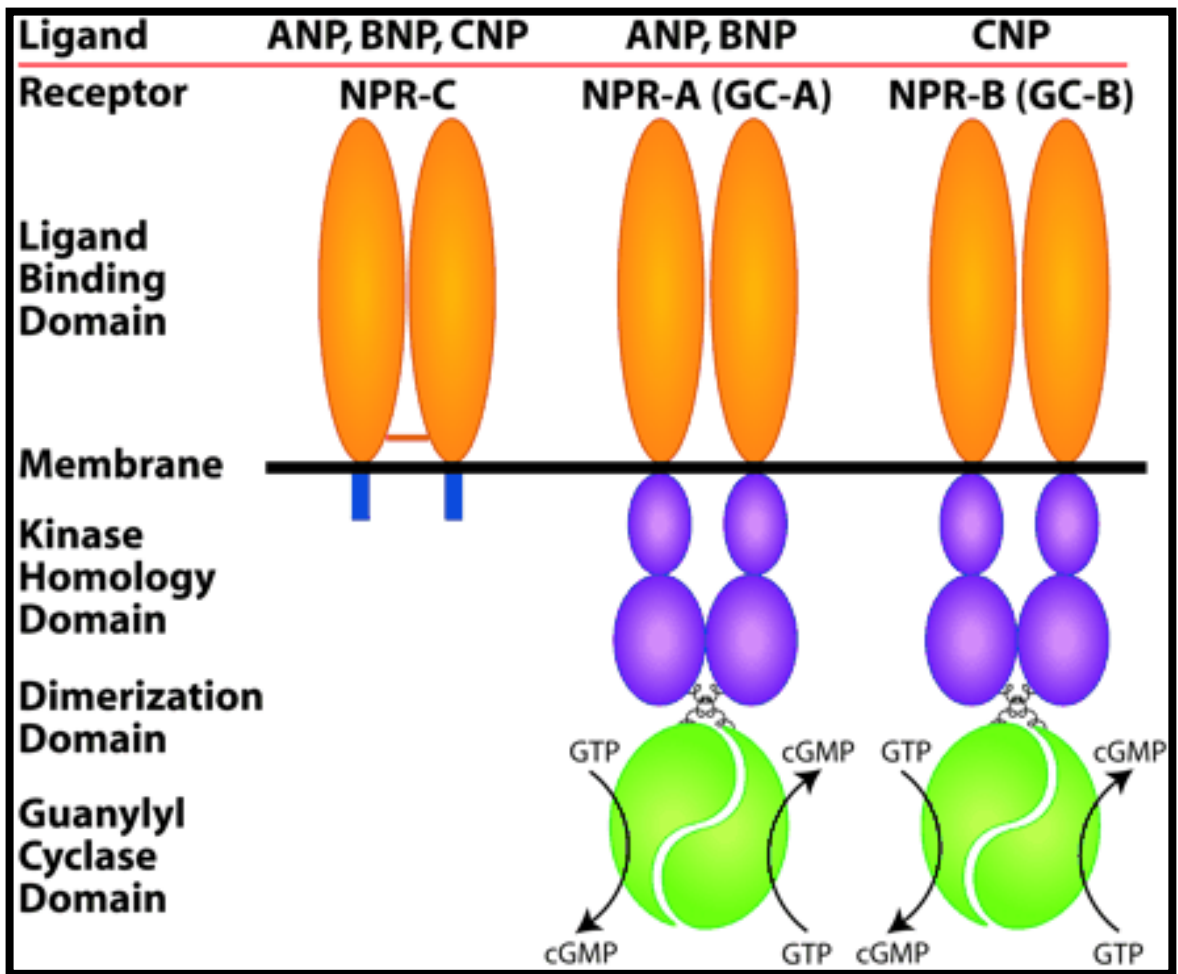
Fare ve insanda natriüretik peptid genlerinin mutasyonlar ile inaktivasyonu sonucu görülen başlıca fenotipler şunlardır (Olney vd. 2006):

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

Son dönemde natriüretik peptidlere benzerliği ile dikkat çeken iki farklı sinyal peptidi daha tanımlanmıştır. Bunlardan ilki ilk olarak kemikte bulunmuş ve osteocrin olarak adlandırılmıştır (Olney vd. 2006). Diğer peptid ise ilk olarak kas dokusunda bulunmuş ve musclin olarak adlandırılmıştır (Olney vd. 2006). Ancak bu iki peptid ile ilgili çalışmalar oldukça yenidir.

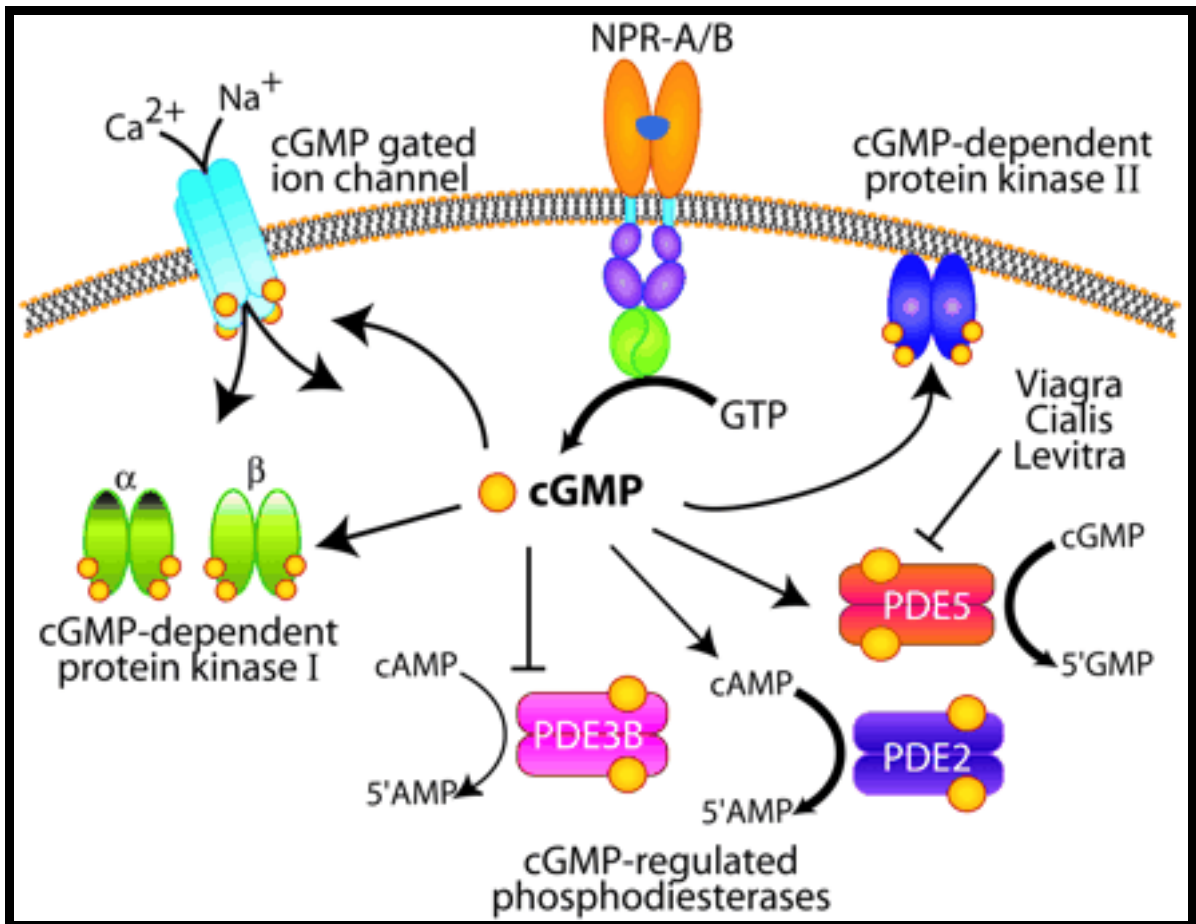
2.3.1.2. Natriüretik Peptid Reseptörleri

Natriüretik peptidlerin bilinen üç farklı reseptörü vardır (Şekil-8). 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 katalizlerler. Üçüncü reseptör (NPR-C, NPR3) ise hücre içi enzimatik aktiviteden yoksun olup, her üç NP'in lokal konsantrasyonunu ayarlayan bir rol üstlenir.



Şekil-8: Natriüretik peptidlerin bilinen üç farklı reseptörü vardır: 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 katalizlerler. Üçüncü reseptör (NPR-C, NPR3) ise hücre içi enzimatik aktiviteden yoksun olup, her üç NP'in lokal konsantrasyonunu ayarlayan bir rol üstlenir. (Potter vd. 2006).

Natriüretik Peptidlerin bu reseptörlere bağlanmaları ile hücre içi fizyolojik etkileri üç farklı cGMP bağlayan protein grubu tarafından yönlendirilir. Bunlar: cGMP-bağımlı protein kinazlar, cGMP ile yönlendirilen fosfodiesterazlar, ve cGMP bağımlı iyon kanallarıdır (Şekil-9).



Şekil-9: Natriüretik Peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri. Natriüretik Peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri üç farklı cGMP bağlayan protein grubu tarafından yönlendirilir. Bunlar: cGMP-bağımlı protein kinazlar, cGMP ile yönlendirilen fosfodiesterazlar, ve cGMP bağımlı iyon kanallarıdır. (Potter vd. 2006).

2.3.1.2.1. Natriüretik peptid reseptör A

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

2.3.1.2.2. Natriüretik peptid reseptör C (Natriüretik peptid clearance reseptör)

NPR-C mRNA'sı başlıca atrium, mezenter, plasenta, akciğer, böbrek, venöz doku, aort düz kası, aortik endotelial hücrelerde ve kıkırdak ve kemikte bulunur. Hücre içi guanil siklaz enzimatik aktivitesinden yoksun olup, her üç natriüretik peptid'in lokal konsantrasyonunu ayarlayan bir rol üstlenir. NPR-C'nin natriüretik peptidlere afinitesi, insan ve sıçanlarda sırası ile: ANP \geq CNP>BNP şeklindedir.

2.3.1.2.3. Natriüretik peptid reseptör B

NPR-B'nin beyin, adrenal gland, uterus gibi birbirinden farklı pek çok dokuda varlığı gösterilmiştir (Tamura ve Garbers, 2003). Ancak mevcut literatür bilgileri bu proteinin ana görevinin iskelet sistemi gelişimi ile ilgili olduğunu düşündürmektedir (Bartels vd. 2004). AMDM'li hastalarda da iskelet sistemi bulgularına eşlik eden nörolojik defektler ve bozukluklar veya anormal kan basıncı düzeyleri gibi problemlerin görülmemiş olması bu düşünceyi desteklemektedir.

NPR-B'nin natriüretik peptidlere afinitesi sırası ile: CNP \gg ANP \geq BNP şeklindedir. 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 peptid'i (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. Fare modelinde yapılmış çalışmalar CNP'den yoksun farelerde dwarfizm (Chusho vd. 2001), genomlarına CNP transferi yapılmış ve bu proteini normalden daha fazla üreten farelerde ise uzun kemiklerde boy uzaması gerçekleştiğini (Chusho vd. 2001, Yasoda vd. 2004) göstermiştir.

Fare ve sıçan tibiaları kullanılarak yapılmış organ kültürlerinde ise CNP'nin kondrosit proliferasyonunu ve hipertrofisini arttırdığı gösterilmiştir (Yasoda vd. 1998; Mericq vd. 2000). Yine son dönemde yayınlanan bir çalışmada CNP'nin matriks sentezini arttırarak FGFR-3 mutasyonlu akondroplazik farelerde dwarfizmi engellediği gösterilmiştir (Yasoda vd. 2004). 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 eksprese edilmektedir (Bartels vd. 2004).

Diğer taraftan Linkoln ve Cornwell (1993) NPR-B'nin CNP ile aktivasyonu sonrası cGMP ile etkileştiğini ve cGMP bağımlı protein kinazları aktive ettiğini göstermişlerdir. Bu bağlamda farklı amaçla hazırlanmış bir cGKII (insanlarda *PRKG2* genine karşılık gelmektedir) defektli fare modelinde dwarfizm gözlenmiş olması da anlamlı bir bilgidir (Pfeifer vd. 1996). cGKII knock-out farelerde epifiz plağı terminal hipertrofi bölgesinde henüz değişimlerini tamamlayamamış kondrositlerin bir yığılım oluşturdukları gösterilmiştir (Pfeifer vd. 1996). 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 regüle ettiğini düşündürmektedir (Miyazawa vd. 2002).

Son olarak, NPR-B proteini fonksiyonel haployetersizliği (haploinsufficiency), ki bu durum AMDM gözlenen hastaların taşıyıcı anne ya da babalarında görülmektedir, normale göre dwarfizm düzeyinde olmayan boy kısalığı ile karakterizedir (Bartels vd. 2004).

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 açtığı belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu araştırmadan elde edilecek yeni bilgiler oldukça kompleks bir regülasyonu olan endokondral büyüme biyolojisinde yeni yaklaşımların yapılabilmesini sağlayacak niteliktedir.

2.4. Hipotez ve Çalışmanın Amacı

Trabeküler kemik, uygun mikro çevre koşulları oluştuğunda osteoblast, kondrosit, adiposit, veya miyosit gibi çeşitli mezankimal 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- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 veya kemik morfogenetik proteinleri, BMP'ler) 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- β 1 uyarısına cevap olarak aktive olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, Maroteaux tip Akromezomelik Displazi (AMDM; OMIM no. 602875) olarak bilinen otozomal ressesif geçişli bir osteokondrodizplazi türü, CNP'nin hücre yüzeyindeki reseptörü olarak işlev gören natriüretik peptid reseptör-B'nin (NPR-B) fonksiyon kaybına yol açan mutasyonları sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak tamamladığımız geçmiş çalışmalarımızın sonuçları, CNP/NPR-B'nin pre-kondrojenik mezankimal yoğunlaşma, glikozaminoglikan sentezi, ve kondrositlerin matürasyon ve hipertrofilerini kapsayan geç dönem değişim süreçlerinde etkin rol oynayan ve bahsi geçen kırıkta gelişimi evrelerinde yeni tanımlanan bir sinyal yolu olduğunu göstermiştir (Alan ve Tufan 2008). Ayrıca, yine aynı projemizde tavuk fetal kemik iliği kökenli MKH'leri ile yapılan deneylerde CNP mRNA düzeyinin TGF- β 1 uyarısı altında arttığı gösterilmiştir.

Bu çalışmadaki amacımız, tavuk cinsi ile elde ettiğimiz ön verilerden yola çıkarak, erişkin insan trabeküler kemik dokusu kökenli MKH'lerin kondrojenik değişimleri sürecinde, CNP/NPR-B sinyal yolunun TGF- β 1'in hedef yolaklarından biri olduğu sonucundan hareketle CNP'nin bu süreçlerdeki olası doza bağımlı etkilerini ortaya koymaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kemik İliği Kökenli Mezankimal Kök Hücrelerin İzolasyonu Ve Kültüre Edilmesi

Bu araştırmada kullanılan bütün kimyasallar Sigma Kimyasallarından (St. Lois.MO, US) temin edilmiştir. Eksplante edilen kültürler Tuli ve arkadaşları (2003) tarafından hazırlanan protokol baz alınarak hazırlanmıştır.

Trabeküler kemik parçaları toplam 6 hastanın (3 kadın ve 3 erkek; yaş aralığı 25-68; ortalama yaş \pm SEM = 48.67 ± 7.13) iliak kemik, femur başı ve vertebra kısımlarından elde edilmiştir. 1,5-2 cm³ lük trabeküler kemik parçaları antibiyotik (50 µg/ml penisilin streptomisin) ve DMEM (yüksek glukoz, L-glutamin pozitif) içerisine koyularak hızla laboratuvar şartlarına taşınmıştır. 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 yıkanmıştır. Bu kemik fragmentleri, yüzeylerinde bulunan hücresel materyalden arındırılmak için 2mM 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 aktarılmış ve 20 µm çapında filtrelerden (Falcon, Franklin NJ, A.B.D.) geçirilerek dilüe edilmiştir. Kemik yüzeyi hücresel materyalden temizleninceye kadar 37 C^o’de, %5 CO₂’li ve nemli inkübatörde 3-4 saat süre ile bekletilmiştir.

Kemik parçaları %0.9’luk sodyum klorür ile 4-5 kez yıkanmıştır. %10 fetal bovine serum (FBS) (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA, A.B.D.), ile enzimatik yıkım durdurulmuş, 2mM L-glutamin, 2mM esansiyel amino asit, 50 µg/ml penisilin-streptomisin ile DMEM içeren 100 mm’lik kültür plakalarına aktarılmış ve 37 C^o’de, %5 CO₂’li , nemli inkübatöre yerleştirilmiştir. Kemik parçalarında tam besiyeri içeren kültür plakalarına ekilmiştir. Hücrelerin trabeküler kemik fragmentlerinden migrasyonları ve ardından çoğalmaları takip edilmiştir. Bu süreçte her 3-4 günde bir besiyeri tazesi ile değiştirilmiştir.

Kültür plakalarında hücreler %80’lik bir yoğunluğa eriştiğinde (yaklaşık olarak 3-4 hafta), hücrelerin bir kısmı ekilmiş bir kısımda daha sonra kullanılmak üzere -80 °C’de donmaya bırakılmıştır.

İstenilen yoğunluğa erişen hücreler %0.25'lik tripsin (Type II-S, Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) içeren EDTA solüsyonu kullanılarak kültür plakların tabanına yapışmış olan hücrelerin kalkması sağlanmıştır.

Tablo-3: Trabeküler kemik kökenli mezankimal kök hücre izolasyonu gerçekleştirilen hastaların özellikleri.				
HASTA NO	CİNSİYET	YAŞ	ÖRNEK ALINAN YER	PRİMER 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	+

3.2. Osteojenik Ve Adipojenik Tek Tabaka Kültürlerin Farklılaşması

Bilindiği gibi MKH'lerin temel özelliklerinden birisi de adipojenik, osteojenik ve kondrojenik yönde değişim gösterebilme yetenekleridir (Nöth et al., 2002; Tuli et al., 2003).

Bu amaçla ticari olarak elde edilen STEMPRO Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco) adipojenik değişimin uyarılmasında ve STEMPRO Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco) osteojenik değişimin uyarılmasında, üretici firmanın verdiği protokole uyularak kullanılmıştır.

Osteojenik ve adipojenik farklılaşma için 1.5×10^6 hücre/ml yoğunlukta hücreler her bir kuyucuk için 5×10^3 hücre/cm² olacak şekilde bazal medium ve penisilin streptomisin içeren besiyeri uygulanarak 6 ve 12 kuyucuktan oluşan plakalara ekilmişlerdir. Yoğun monolayer kültürlerin osteojenik farklılaşması osteojenik uyarıcı ile uyarılırken, adipojenik farklılaşma adipojenik uyarıcı kullanılarak aktive edilmiştir. Osteojenik ve adipojenik uyarıcılar ilave edilmeyerek kontrol grupları oluşturulmuştur. Osteojenik ve adipojenik uyarı sırasıyla 3 ve 2 hafta uygulanmıştır. Kültürler %95 hava ve %5'lik karbondioksit basıncında, 37°C de inkübasyona bırakılmışlardır. Her 3 günde bir mediumlar değiştirilmiştir.

3.2.1. Adipojenik değişimin Oil Red O boyaması ile hücre analizi

Reaktif hazırlanması

Oil Red O boyama solüsyonu: 100 ml izopropanol içine 0.5 gr Oil Red O boyası (Zymed) eklenmiştir. 4 saat cam şişede karıştırılmıştır. Kurutma kağıdı kullanılarak boyanın filtre edilmesi sağlanmıştır.

Hazırlanan Oil Red O çalışma solüsyonundan 6 ml alınarak içerisine 4 ml distile su eklenmiştir.

Fiksatif solüsyonu hazırlama: %37'lik formaldehitden 11 ml, PBS'den ise 29 ml alınarak yaklaşık %10'luk fiksatif solüsyonu hazırlanmıştır.

- 1) Midyumu tamamen kaldırdıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır.
- 2) Hücre yüzeyinin kurduğundan emin olduktan sonra %10'luk formaldehit kullanarak hücreler fikse edilmiştir. 30 dakika beklenmiştir.
- 3) Fikse edilmiş hücreler 1-2 kez PBS ile yıkanmıştır.
- 4) Tamamen hücrelerin kuru olması hücre yüzeyinde partikül oluşmaması için gerekli görülmüştür.
- 5) Hazırlanan Oil Red O boyama solüsyonu ile hücreler 1 saat inkübe edilmiştir.
- 6) Boyama solüsyonu hücrelerin üzerinden alınıp PBS ile 1-2 kez yıkama yapılmıştır.
- 7) Hematoksilen eosin ile hücreler zıt boyanmış ve distile su ile boyanın yıkanması gerçekleştirilmiştir.
- 8) Adipojenik hücreler mikroskop altında görüntülenmiştir.
- 9) Adipojenik kültür PBS içinde saklanmıştır.

3.2.2. Osteojenik değişimin Alizarin Red S boyaması ile hücre analizi

- 1) Midyum plakalardan kaldırıldıktan sonra PBS ile 1 kez yıkanmıştır.
- 2) Hücreler 4% 'lük formaldehit solüsyonu ile 30 dakika fikse edilmiştir.

- 3) Fiksasyondan sonra 2 kez distile suyla yıkama yapıldıktan sonra 2% Alizarin Red S (Zymed) boyama solüsyonuna (pH 4.2) 2-3 dakika maruz bırakılmıştır.
- 4) Alizarin Red S boyası 3 kez distile su ile yıkanmıştır.
- 5) Hematoksilen eozin ile zıt boyama yapılmış ve distile su ile boyanın yıkanması gerçekleştirilmiştir.
- 6) Osteojenik hücreler ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir.
- 7) Osteojenik kültür PBS içinde saklanmıştır.

3.3. Yüksek Yoğunlukta Pellet Kültürlerin kondrojenik farklılaşması

Kondrojenik farklılaşma için kondrojenik farklılaşma besiyeri hazırlanmıştır. Alikuatlanan hücreler 0.5 ml mediumda 15 ml polyprolen tüplerde 5 dakika 500 q'de santrifüjlenerek pellet kültürler oluşturulmuştur. Kondrojenik farklılaşma 10 ng/ml transforming growth factor- β . (TGF- β) ilavesi ile uyarılmıştır. C-Tipi Natriüretik Peptid (CNP) 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M konsantrasyonda hazırlanarak, TGF- β ilavesi ile uyarılmış gruplara ilave edilmiştir. Kültürler %95 hava ve %5'lik karbondioksit basıncında, 37°C de inkübasyona bırakılmışlardır. Her 3 günde bir mediumlar değiştirilmiştir.

3.3.1. Kondrojenik değişimin Alcian mavisi boyanması ile hücre analizi

Tek tabaka kültürlerin idamesi sürecinde, 5-10-15 ve 20. günlerde seçilen kültürler besi yerinden arındırılıp, PBS ile yıkanmıştır. Ardından 30 dakika oda sıcaklığında % 10'luk paraformaldehid ile fikse edilen kültürler tekrar PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyonları tamamlanan kültürler bir gece boyunca, oda sıcaklığında, pH'ı 1.0 olan (Lev and Spicer, 1964) Alcian mavisi (Sigma) boyası ile boyanmış, kültürler PBS ile yıkama sonrası rutin histolojik takip; alkolden geçirme (sırasıyla, %70, %80, %95, %100), ksilen, parafine gömme ve bloklama işlemlerine tabi tutulmuşlardır. Boyama için 10 μ m'lik kesitler alınmıştır. Dokular bir gece etüvde bekletildikten sonra yarım saat ksilene maruz bırakılmıştır. Ardından sırasıyla 10 dakika deparafinizasyon(%100, %95, %80 %70'lik alkol)- 5 dakika distile su ile yıkama-en az 1 gün alcian mavisi boyama- yıkama- kurutma ve kanadı balzamu ile kapatma işlemleri dokulara uygulanmıştır.

3.4. İmmunohistokimyasal boyama

% 10'luk methanol ile fiksasyonu tamamlanan kültürler PBS ile yıkanmıştır. Ardından uygulanan protokol sırası ile aşağıdaki gibidir: (Reaktifler için Zymed Histostain-Plus kit kullanılmıştır).

- 1- Kültürdeki endojen peroksidaz aktivitesi hazırlanan % 30'luk H₂O₂:Metanol (1:9) karışımı ile 1 saat uygulama ile ortadan kaldırılmıştır.
- 2- PBS ile yıkanan hücreler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile en az 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir (Zymed, San Francisco, CA, A.B.D.).
- 3- Hücreler üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece over night yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları dilüsyonlar şu şekildedir: STRO1, Endoglin, CD73, CD45, CD34, L-Kaderin. Bütün primer antikorlar PBS ile 1:50 dilüe edilmişlerdir.
- 4- PBS ile hücreler yıkandıktan sonra primer antikorlara spesifik olan FITC ile işaretlenmiş sekonder antikorlar ile 3-5 saat sekonder antikorlar muamele edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan FITC konjuge sekonder antikorlar ve kullanıldıkları dilüsyon oranları şu şekildedir; goat-anti-mouse-IgG₁, goat-anti-mouse-IgG₃ ve goat-anti-mouse-IgM, bütün sekonder antikorlar 1/100 oranında dilüe edilmiştir.
- 5- Sekonder antikorlar PBS ile yıkandıktan sonra etidyum bromür ile 10 dakika boyama gerçekleştirilmiştir. Etidyum bromür distile su ile 1/1000 dilüe edilmiştir.
- 6- Etidyum bromür PBS ile yıkanıp kapama gerçekleştirilmiştir.

3.5. RNA izolasyonu ve Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) analizi

Deneylerde kullanılan total RNA tek tabaka kültürlerden Tri-Reagent (Sigma) kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyonu takiben elde edilen total RNA konsantrasyonu A₂₆₀ dalga boyunda spektrofotometrik olarak hesaplanmıştır. Diğer taraftan elde edilen RNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyaması ile test edilmiştir. Her bir reverse transkripsiyon reaksiyonu için 1 mikrogram RNA örneği kullanılmış ve Qiagen OneStep RT-PCR with Q-solution kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Bu kit ile kullanılan protokol kısaca şu şekilde özetlenebilir:

a) Sırası ile:

- 1- 10 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR tampon çözeltisi (12.5mM MgCl₂ içerir),
- 2- Her dNTP'den 10mM içeren 2 µl dNTP karışımı,
- 3- 10 µl 5x Q-solüsyonu,
- 4- Her bir analiz edilen gen için spesifik olarak dizayn edilmiş forward ve revers primerlerin her birisinden 10 µM konsantrasyonda içeren primer karışımından toplam 3 µl (Bu çalışmada kullanılan primerler için Tablo-4'e bakınız. Primerlerin sentezi Metabion International AG, Martinsried, Almanya'da gerçekleştirilmiştir),
- 5- 2 µl of Qiagen OneStep RT-PCR enzim karışımı,
- 6- 22 µl RNase-free distile H₂O, toplam 50 µl volüm içerisinde, buz üzerinde örnek RNA ile karıştırılmıştır.

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

- 1- 50 C^o, 30 dakika, 1 döngü (reverse transkripsiyon),
- 2- 95 C^o, 15 dakika, 1 döngü (PCR aktivasyon basamağı),
- 3- 94 C^o, 1 dakika (denatürasyon). 57 C^o, 1 dakika (primerlerin örnek cDNA'ya tutulumu) Col II; Col IX, Col X, aggrecan için, 51 C^o bütün diğer genler için kullanılmıştır. 72 C^o, 1 dakika (sentez ve uzama); bu üç basamak sırası ile 32 döngü tekrarlanmıştır.
- 4- 72 C^o, 10 dakika, 1 döngü (son sentez ve uzama),
- 5- Reaksiyonlar 4 C^o'de sonlandırılmışlardır ve -20 C^o'de saklanmışlardır.

c) PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ve etidyum bromür boyaması ile gözlemlenmiştir.

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

3.6. 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 edilmiştir.

Tablo-4: Gen ekspresyonlarının analizinde kullanılan RT-PCR Primerleri

Gen	Primer dizisi Sense(F)/Antisense(R)	Ürün (bp)	Referans
İnsan			
CNP	F: GTCAGAAGAAGGGCGACAAG R: TGTTGGCTCCTTTGTATTTGC	162	This study (GenBank: NM_024409)
NPR-B	F: AGCGCTGAAGATCCATGTCT R: GGAGTCCAGGAGGTCCTTTC	155	This study (GenBank: NM_003995)
<u>Yağa-özgü genler</u>			
LPL	F: GAGATTTCTCTGTATGGCACC R: CTGCAAATGAGACACTTTCTC	276	Nöth et al., 2002 Tuli et al., 2003
<u>Kemiğe-özgü genler</u>			
Col I α 2	F: GGACACAATGGATTGCAAGG R: TAACCACTGCTCCACTCTGG	461	Nöth et al., 2002 Tuli et al., 2003
OC	F: ATGAGAGCCCTCACACTCCTC R: GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	294	Nöth et al., 2002 Tuli et al., 2003
BSP	F: AATGAAAACGAAGAAAGCGAAG R: ATCATAGCCATCGTAGCCTTGT	450	Tuli et al., 2003
ALP	F: TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA R: ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC	454	Nöth et al., 2002 Tuli et al., 2003
<u>Kıkırdağa-özgü genler</u>			
Col II	F: TTTCCCAGGTCAAGATGGTC R: CTTCAGCACCTGTCTCACCA	377	Nöth et al., 2002
Col X	F: GCCCAAGAGGTGCCCTGGAATAC R: CCTGAGAAAGAGGAGTGGACATAC	703	Nöth et al., 2002
Aggrecan	F: TGAAGGAGGGCTGGAACAAGTACC R: GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA	350	Nöth et al., 2002 Tuli et al., 2003
Sox 9	F: ATCTGAAGAAGGAGAGCGAG R: TCAGAAGTCTCCAGAGCTTG	264	Tuli et al., 2003
<u>Ev sahibi gen</u>			
GAPDH	F: GGGCTGCTTTTAACTCTGGT R: GCAGGTTTTTCTAGACGG	702	Nöth et al., 2002 Tuli et al., 2003
F = İleri primer; R = Geri primer.			

4. BULGULAR

4.1. Kollajenaz ile muamele edilen yetişkin insan trabeküler kemik parçalarından izole edilen MKH'lerin morfolojik olarak gözlemlenmesi

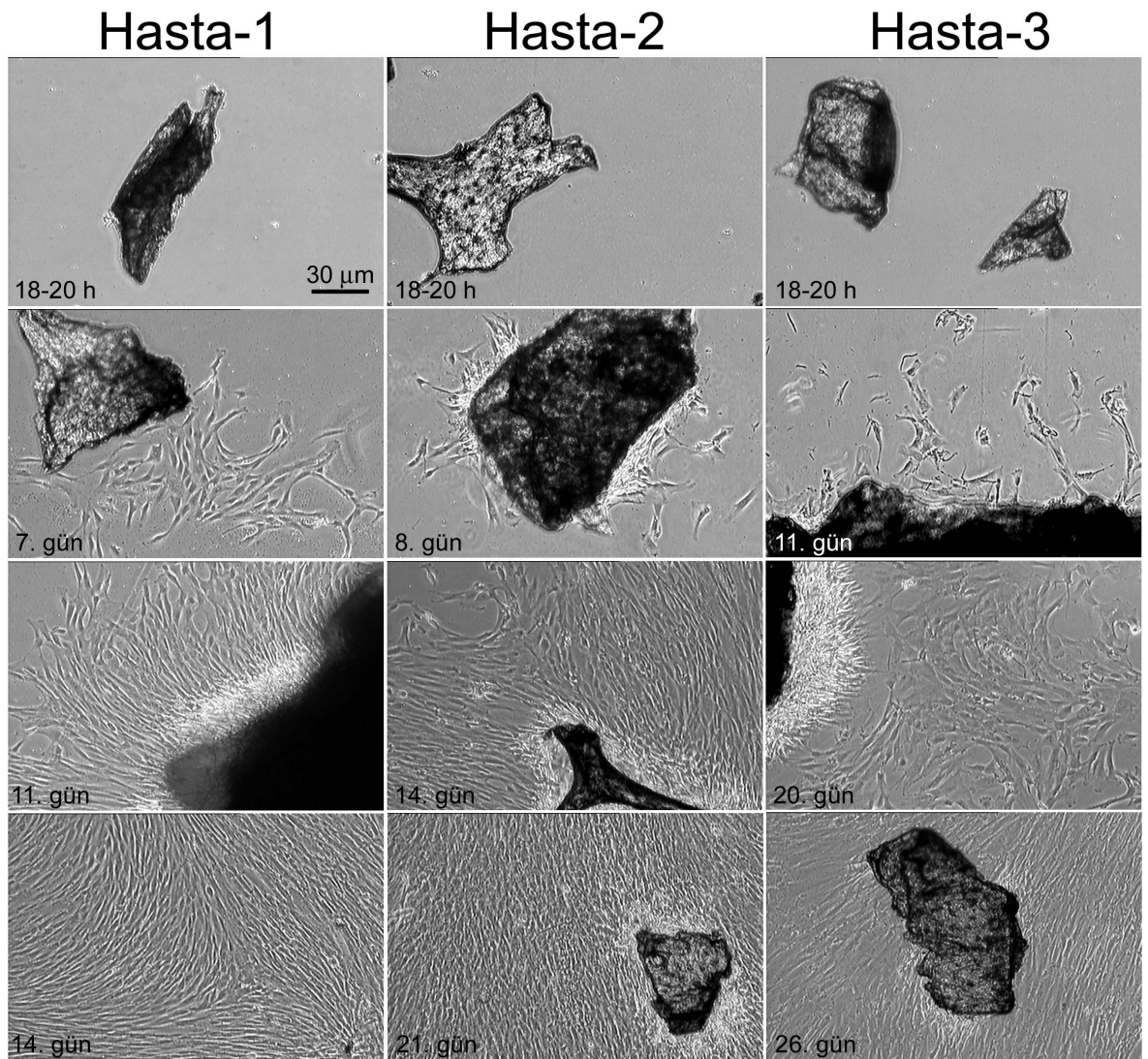
Altı hastadan elde edilen trabeküler kemik materyallerinden, Tuli ve arkadaşları (2003) tarafından tarif edilen yöntem uygulanarak başarı ile mezenkimal morfoloji gösteren ve kültür plakalarına yapışma karakterinde olan hücreler elde edilmiştir (Şekil-10).

Elde edilen sonuçlar hastaya, yaşa, cinsiyete, kemik materyalinin alındığı donör bölgeye ve benzeri pek çok faktöre bağımlı olabilecek farklılıklar göstermiştir (Şekil-10).

Hücrelerin kemik fragmentlerinden ilk migrasyonları 7-11. günlerde, hücrelerin kemik fragmentleri çevresinde doymuş bir düzeye ulaşmaları 11-20. günlerde ve hücrelerin tüm kültür ortamında, odaklar arası bölgelerde de doymuş seviyeye ulaşmaları 14-26. günlerde gözlenmiştir (Şekil-10).

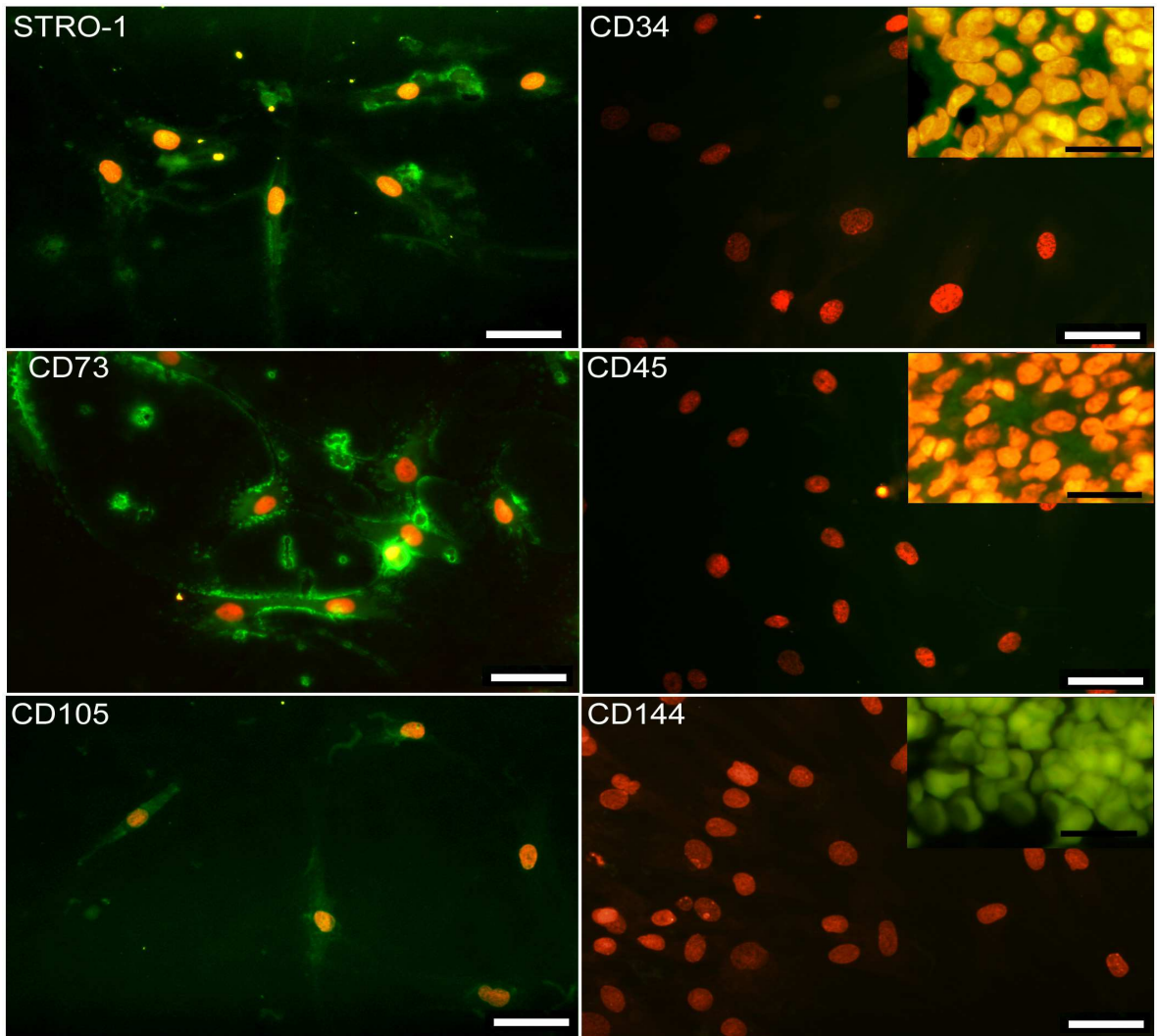
4.2. İnsan trabeküler kemik parçalarından elde edilen MKH'lerin immünofloresan boyama ile karakterizasyonunun yapılması

İmmünofloresan boyama için daha önceden mezenkimal kök hücre ile ilişkili olduğu bilinen hücre yüzey belirteçleri kullanılmıştır (STRO-1, CD73, CD 105, CD34, CD 45, CD 144). Hücre nükleusları hematoksilin eozin zıt boyama ile gösterilmiştir. Projemiz kapsamında elde edilen MKH'ler STRO-1, CD73, CD 105 yüzey belirteçleri için pozitif boyanırken CD34, CD 45, CD 144 yüzey belirteçleri için negatif sonuç vermiştir. Tonsil dokusu pozitif kontrol amaçlı olarak kullanılmıştır (CD34, CD 45, CD 144, Şekil-11).



Şekil 10. Kollajenaz ile muamele edilen yetişkin insan trabeküler kemik parçalarından izole edilen MKH'lerin morfolojik olarak gözlemlenmesi.

Bu panelde 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 11. İnsan trabeküler kemik parçalarından elde edilen MSC'lerin immüno Floresan boyama ile karakterizasyonunun yapılması

Analiz edile hücreler STRO-1, CD73 ve CD105 için (+) (yeşil renkli boyanma); CD34, CD45 ve CD144 için (-) reaksiyon vermişlerdir. Tüm gruplar hücre çekirdeklerinin görselleştirilebilmesi amacıyla, bir nükleik asit boyası olan etidyum bromür ile zıt boyamaya tabi tutulmuştur. Beyaz bar = 50 µm.

4.3. İnsan trabeküler kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin RT-PCR ile gen ekspresyonu analizinin yapılması ve değişim potansiyelinin histolojik olarak gösterilmesi

Adipogenez, kültürlerin 14. gününde histolojik olarak Oil Red O boyaması (Şekil-12A) ve kültüre edilen hücrelerde mRNA düzeyinde lipoprotein lipaz (LPL) ekspresyonunun varlığı (Şekil-12B) ile gösterilmiştir.

Osteogenez, kültürlerin 21. gününde histolojik olarak Alizarin Red boyaması (Şekil-12C) ve kültüre edilen hücrelerde mRNA düzeyinde osteokalsin (OC), kemik sialoprotein (BSP), alkalen fosfataz (ALP) ekspresyonlarındaki artış ve tip I kollajen (Col Ia2) ekspresyonunun varlığı (Şekil-12D) ile gösterilmiştir.

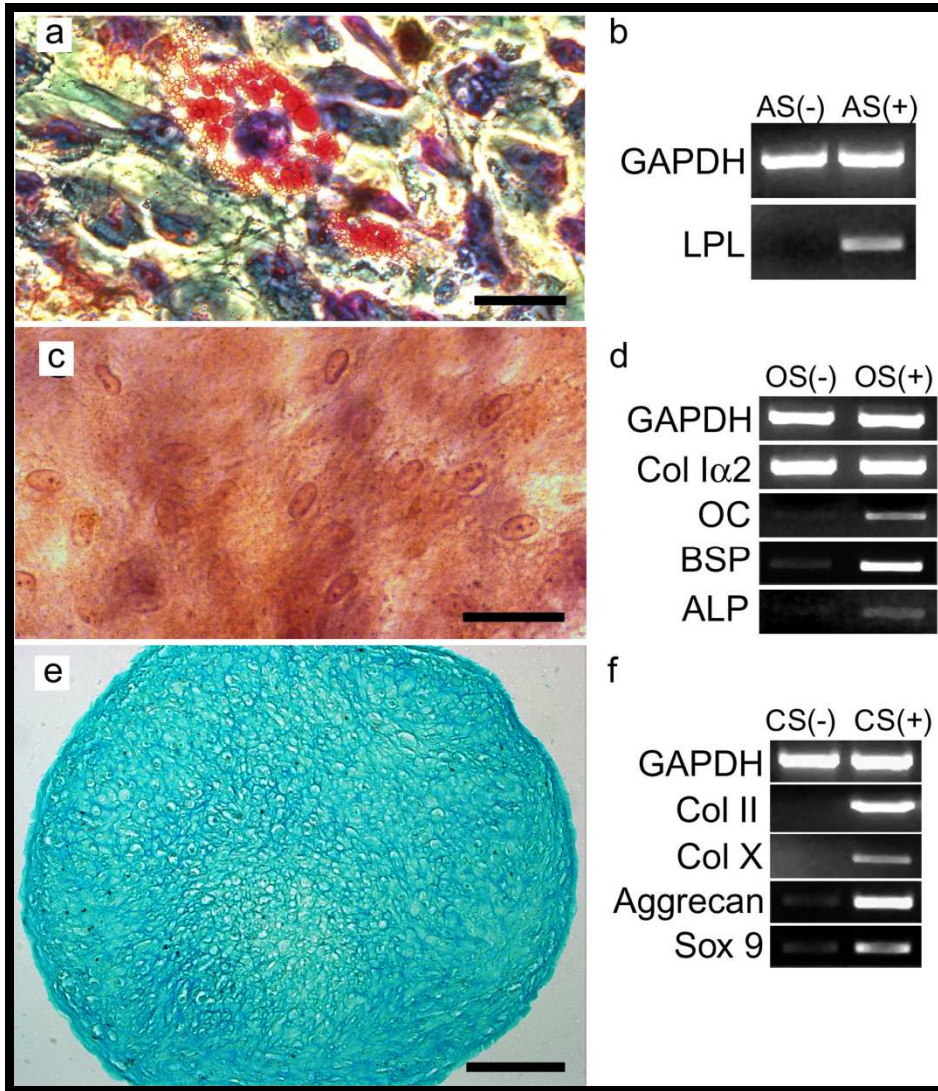
Kondrojenik değişim için, projemiz sürecinde rutin olarak uygulanan TGF- β 1 uyarısı altında gerçekleştirdiğimiz kondrojenik değişim tercih edilmiştir (Şekil-12E).

Bu aşamada kondrogenez, histolojik olarak kondrositlerden sentezlenen ekstrasellüler matriks'in glikoprotein içeriğinin Alcian mavisi ile boyanması ve elde edilen kondrojenik kültürlerde mRNA düzeyinde tip X kollajen (Col X), aggrecan ve Sox 9 ekspresyonlarındaki artış (Şekil-12F) ile gösterilmiştir.

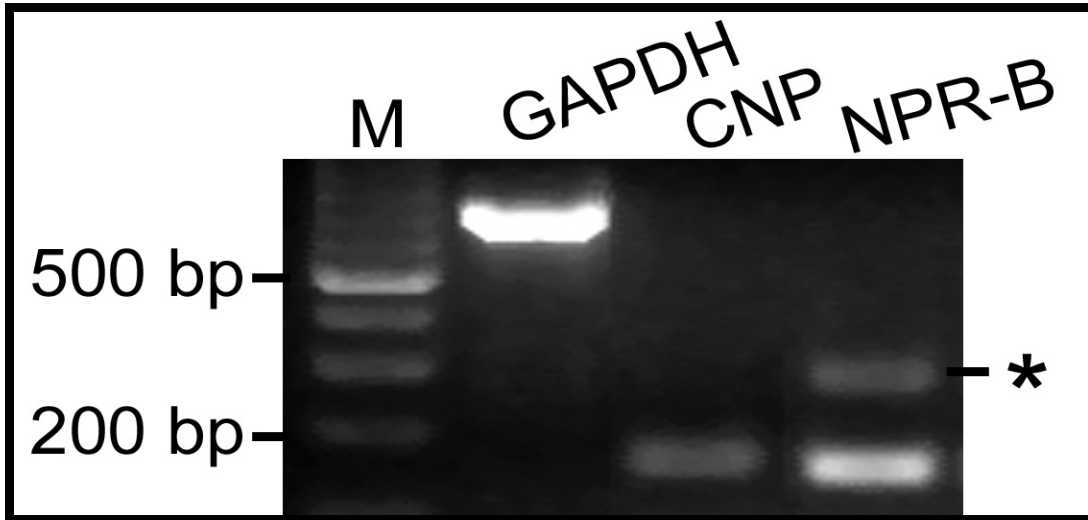
4.4. CNP ve NPR-B'nin *in vivo* koşullarda RT-PCR gen ekspresyon profilleri

CNP ve NPR-B mRNA'larının insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde ekspresyon profili RT-PCR ile incelenmiştir.

Sonuçlar gerek ligand olan CNP'nin, gerekse bu ligandın reseptörü olan NPR-B'nin bu çalışmada kontrol olarak kullanılan GAPDH (Gliseraldehid-3-Fosfat Dehidrogenaz) ekspresyonları ile normalize edildiğinde insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde NPR-B'nin CNP'den daha fazla miktarda ekspre edildiğini göstermiştir (Şekil-13B).



Şekil 12. P5 insan trabeküler kemik iliği kaynaklı mezankimal kök hücrelerin RT-PCR ile gen ekspresyonu analizinin yapılması ve değişim potansiyelinin histolojik olarak gösterilmesi (A-B) Adipojenik değişimin gösterilmesi. Oil Red O boyası (A), ve LPL mRNA artışının (B) gösterilmesi. A paneli için bar = 30 μ m; AS(-), adipojenik stimülatör yok; AS(+), adipojenik stimülatör var. (C-D) Osteojenik değişimin gösterilmesi. Alizarin Red boyası (C), ve Col I α 2 ekspresyonu ile OC, BSP ve ALP mRNA artışının (D) gösterilmesi. C paneli için bar = 50 μ m; OS(-), osteojenik stimülatör yok; OS(+), osteojenik stimülatör var. (E-F) Kondrojenik değişimin gösterilmesi. Alcian mavisi boyası (E), ve Col X, Aggrecan ve Sox 9 mRNA artışının (D) gösterilmesi. E paneli için bar = 250 μ m ; CS(-), kondrojenik stimülatör yok; CS(+), kondrojenik stimülatör var.



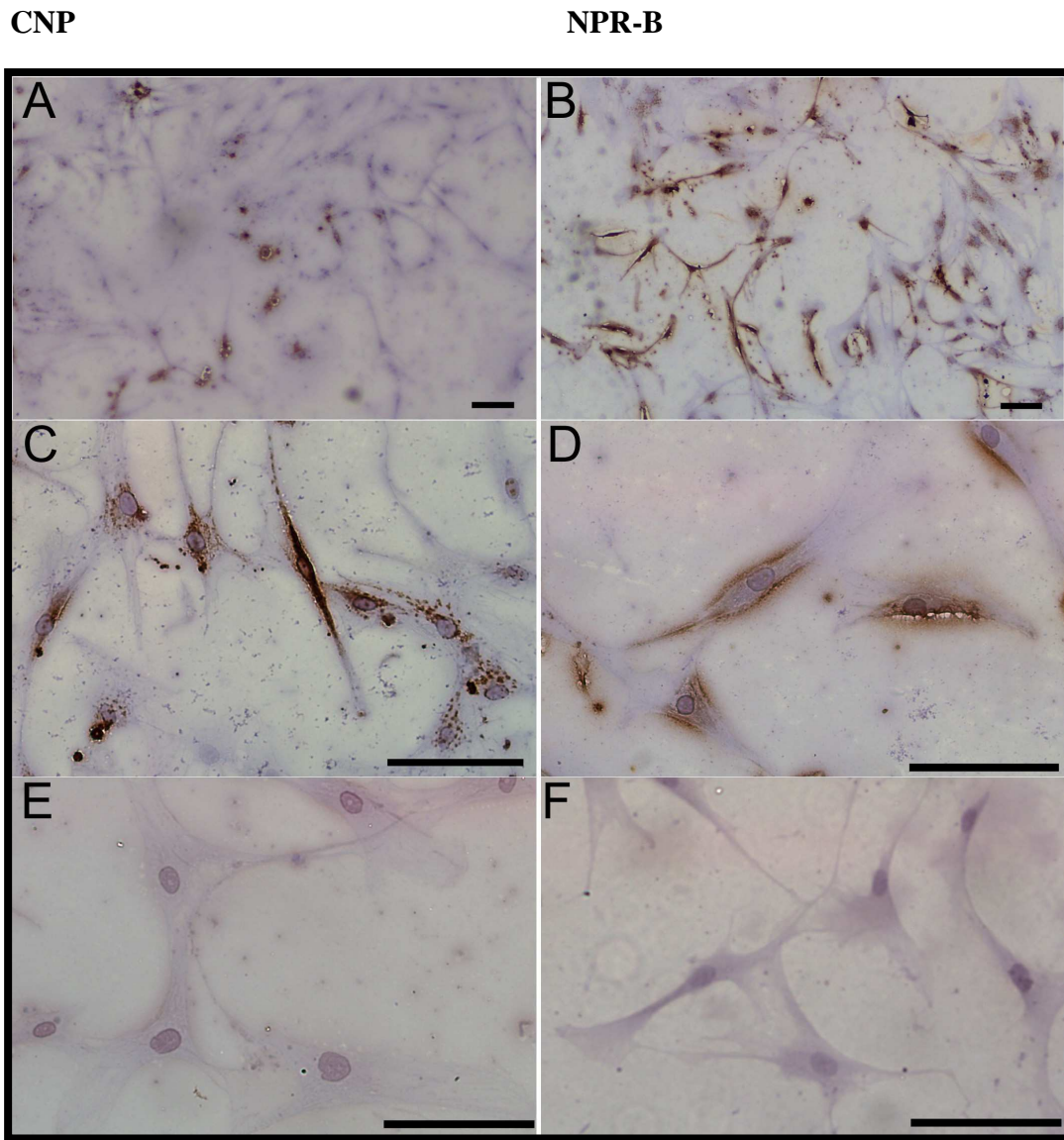
Şekil 13. CNP ve NPR-B'nin *in vivo* koşullarda RT-PCR gen ekspresyon profilleri

4.5. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde CNP ve NPR-B ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi

İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde CNP ve NPR-B ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak incelenmiştir.

NPR-B reseptörü olduğu CNP proteini ile kıyaslanığında yüzde olarak daha fazla hücrede pozitif ifade edildiği sonuçlarda gösterilmiştir (Şekil-14B). CNP ise yüzde olarak daha az hücrede pozitif sonuç vermiştir (Şekil-14A).

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-14C), diğer taraftan NPR-B'nin ise bu ligantın reseptörü olarak hücre zarında lokalize olduğunu göstermektedir (Şekil-14D).



Şekil 14. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde CNP ve NPR-B ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Kontrol grupları (E-F) (-) boyamalarını, CNP gruplarından (A-C) (+) boyanmaları, NPR-B gruplarından (B-D) (+) boyanmaları göstermektedir. Siyah bar = 100 μm.

4.6. Trabeküler kemik kökenli insan mezenkimal kök hücrelerinin TGF- β ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid'in doza bağımlı etkisinin gösterilmesi

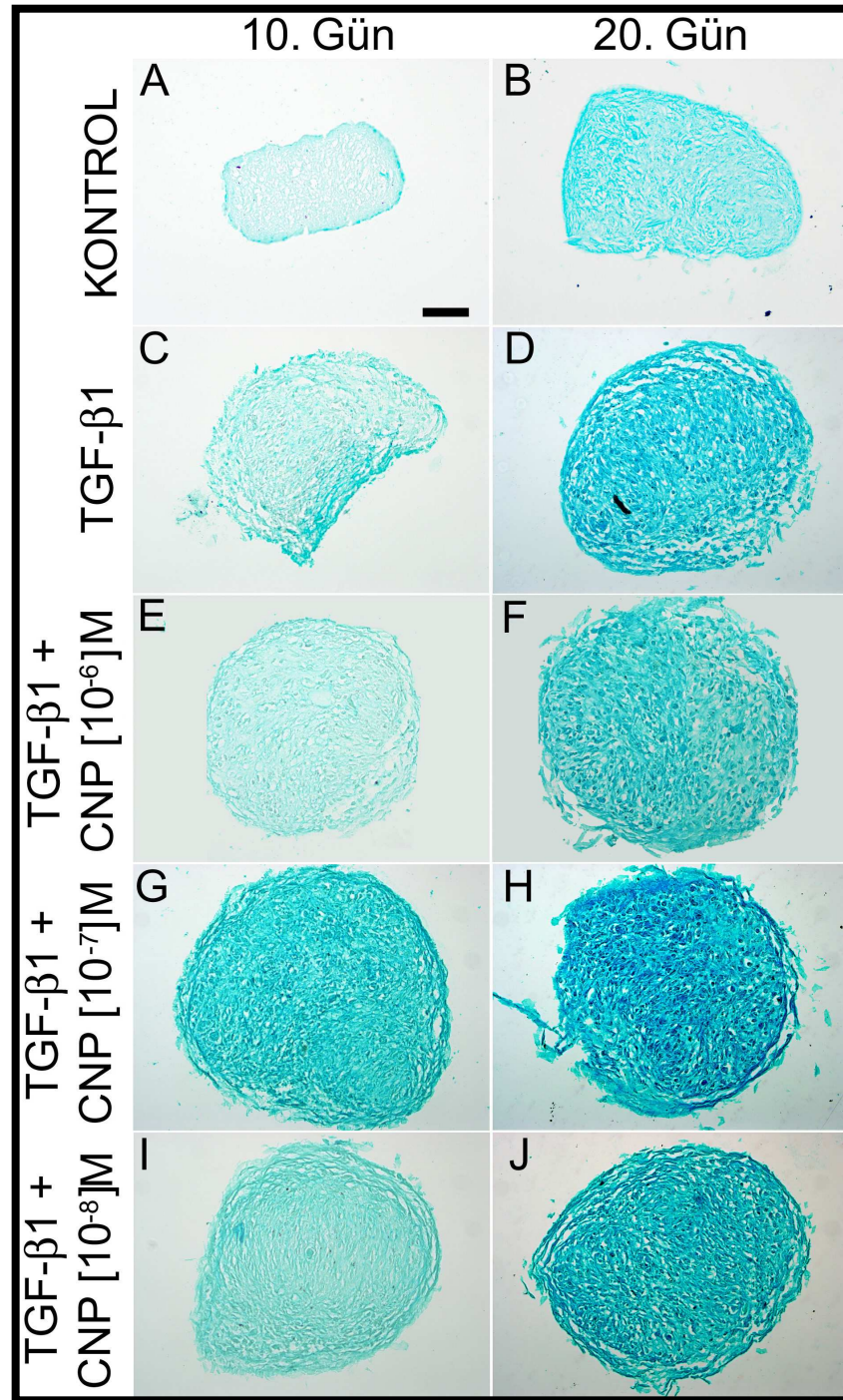
Tek tabaka kültürlerinin 10. ve 20. kültür günlerinde kondrojenik olarak hazırlanan besi yerine C-Tipi Natriüretik Peptid (CNP) 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M konsantrasyonda hazırlanarak, eşit miktarda TGF- β ilavesi ile uyarılmış gruplara ilave edilmiştir. TGF- β ve CNP ilave edilmeyen grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir (Şekil-15, Kontrol).

Tüm grublarda; 20. günler ile 10. günler Alcian mavisi boyaması yapılarak kıyaslandığında 20. günlerde Alcian mavisi boya tutma kapasitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil-15, 10.Günler ve 20. günler).

TGF- β 1 ilavesi ile uyarılan grublarda 10^{-6} M CNP proteini ilavesi ile elde edilen deney grubunda diğer gruplar ile kıyaslandığında diskoid yapı daha fazla gözlemlenirken Alcian mavisi tutma kapasitesinin daha az olduğu saptanmıştır (Şekil-15, Grup TGF- β 1/ CNP 10^{-6} M).

TGF- β 1 ilavesi ile uyarılan grublarda 10^{-8} M CNP proteini eklenerek hazırlanan deney grubunda Alcian mavisi boyamasına paralel olarak ekstraselüler matriksde glikozaminoglikan sentezinin sadece TGF- β 1 ilave edilen grupla kıyaslandığında bu gruba göre daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır (Şekil-15, Grup TGF- β 1/ CNP 10^{-8} M).

Kültürlerin tuttuğu Alcian mavisi boya yoğunluğu, kültürlerde görülen ekstraselüler matriksde glikozaminoglikan sentezine bağlı olarak en fazla TGF- β 1 ilavesi ile uyarılan grublardan 10^{-7} M CNP ilave edilen grupta gözlemlenmiştir (Şekil-15, Grup TGF- β 1/ CNP 10^{-7} M).



Şekil 15. Trabeküler kemik kökenli insan mezenkimal kök hücrelerinin TGF- β ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid'in doza bağımlı etkisinin gösterilmesi. Bar=250 μ m

5. TARTIŞMA

CNP/NPR-B sinyal yolu ve onun iskelet gelişimi boyunca varsayılan rolleri geçen on yıllık sürede dikkate değer bir çalışma konusu haline gelmiştir. Yapılan çalışmalarda CNP/NPR-B sinyal yolunun kondrogenezisdeki rolünü içeren *in vitro* çalışmaların çoğunda, primer kondrositler ve kondrojenik hücre tabakaları kullanılmıştır. Bu çalışmaların en önemli noktalarından biri; *in vitro* kondrogenezis boyunca ön-kondrojenik mezenkimal yoğunlaşma ve glikozaminoglikan sentezi sırasında CNP/NPR-B sinyal yolunun rolünün ortaya çıkmasıydı (Woods et al. 2007; Alan and Tufan, 2008). Bu gelişmelerinin paralelinde, kök hücre biyolojisi ortopedik araştırmalar ve doku mühendisliği gibi alanlar için ilgi çekici bir araştırma konusu haline gelmiştir. Örnek olarak; kemik iliği yerel mikroçevrede bazı kondrosit, osteoblast, adiposit ya da miyosit gibi bazı mezenkimal hücelere farklılaşabilen hematopoetik olmayan heterojen bir öncül hücre popülasyonunu içermektedir (Tuli et al. 2003). Ancak bu mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmaları sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolunun varsayılan yada ortaya çıkarılan rollerinden çok az kısmı bilinmektedir. Bu yüzden bu çalışmanın temel konusu; trabeküler kemik iliği kaynaklı insan mezenkimal kök hücreleri kullanılarak elde edilen primer hücre kültür ortamlarında, insan trabeküler kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, karakterizasyonları, farklılaşma potansiyelleri (adipojenik, osteojenik ve kondrojenik) ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C-tipi natriüretik peptit (CNP)'in Transforming growth factor-beta (TGFB) ile uyarılmış kondrojenik farklılaşma sürecinde etkilerinin incelenmesi olarak belirlenmiştir.

CNP, gen kodu ikinci kromozom üzerinde yer alan ve öncül formu Npcc geni tarafından kodlanan özel bir gen ürünüdür. Npcc ilerletici geni etiketlenerek , erken zamanlarda TGF- β ile stimüle edilen TSC22 klonu için zengin bir bağlanma bölgesi oluşturduğu gösterilmiştir (Olney 2006). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar, iskelet gelişiminde ve kondrogenezisde TGF- β süper ailesi üyelerinin morfolojik olarak düzenleyici fonksiyonlar gösterdiği ve anahtar bir sinyal rolü olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir. Sonuç olarak hipotezimiz; kondrogenezis boyunca CNP/NPR-B sinyal yolunun TGF- β uyarıcısı tarafından düzenlenmiş olabileceği doğrultusunda çalışılmıştır. TGF- β ile uyarılan

kondrosit kültürlerinde, CNP sekresyonu ve CNP mRNA seviyelerinin artması bu düşünceyi desteklemiştir.

Bu bilgiler yanında, MSC'nin TGF- β ile uyarılan kondrojenik farklılaşması sırasında CNP/NPR-B sinyal yolunun önemli rolleri, insan kemik iliği kaynaklı MSC'ler kullanılarak saptanmıştır. Bu MSC'lerde CNP ifadesinin immünohistokimyasal analizleri sonucunda, CNP'nin bu hücrelerde sekrete olan bir protein olması ile uyumlu olduğu gösterilmiştir (Şekil-14a ve c). Diğer taraftan bu hücelere NPR-B ifadesinin analizleri sonucunda ise, NPR-B'nin CNP'nin reseptörü olması ile uyumlu olarak bu hücrelerin plazma membranlarında ifade edildiği gösterilmiştir (Şekil-14b ve d). Ligand ve reseptörünün birlikte mRNA ifadelerine bakılmıştır (Şekil-13). Daha önce Alan ve Tufan tarafından yapılan çalışmalarda, bu insan MSC'lerinden pellet kültürler oluşturulduğunda ve kondrojenik farklılaşmaları TGF- β ile uyarıldığında, CNP ve öncül NPR-B'nin mRNA ifadelerinin, RT-PCR gen ekspresyonu analizleri sonucunda kayda değer bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu artış, erken basamaklarda, inkübasyonun 4. gününde ya da kondrojenik farklılaşmanın geç basamaklarında, inkübasyonun 21. gününde yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Ancak moleküllerin birlikte oluşturdukları ekspresyon seviyeleri inkübasyonun 10. gününde, kontrol ve TGF- β grupları birlikte kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, insan MSC'lerinin TGF- β ile uyarılan kondrojenik farklılaşma sürecinde, erken basamaklarda glikozaminoglikan sentezinin başlaması sonraki basamaklarda ise hipertrofi ve olgunlaşma fazlarında CNP/NPR-B sinyal yolunun önemli rolleri olduğunu ortaya koymaktadır. İnsan MSC'lerinde CNP/NPR-B sinyal yolunun önerilen bu fonksiyonu daha önce primer tavuk uzuvlarından köken alan mezenkimal kök hücreleri ile hazırlanan mikromas kültürlerinde, bu hücrelerin kondrojenik farklılaşma sürecinde aynı sinyal yolunun fonksiyonel gelişmesi ile uyumlu olduğunu gösteren sonuçlar vermiştir (Alan ve Tufan, 2008).

Kondrogenezde rol alan düzenleyici moleküllerin ve sinyal yollarının belirlenmesinde bugüne kadar sıklıkla ve başarı ile kullanılmış in vitro modellerin arasında tavuk embriyosu ekstremite tomurcuğundan elde edilen primer mezankimal hücrelerin mikrokütle kondrojenik hücre kültürleri sayılabilir (Tufan vd. 2001). Geçmişte yayınlanmış pekçok makalede (DeLise vd. 2000, Daumer vd. 2004) kültür ortamlarında in vivo kondrojenik fazların tümünün taklit edilebildiği başarı ile gösterilmiştir. Bu kültür

sisteminin sağladığı avantajlardan en önemlisi kondrogenezin evrelerinin, bu evrelere spesifik moleküller temel alınarak ayrı ayrı, ancak bir sıra dahilinde birbirleri ile olan ilişkileri de gözönüne alınarak analiz edilebilmeleridir. Bu bağlamda en sıklıkla kullanılan başlıca belirleyici moleküller ve spesifik oldukları kondrogenez evreleri şu şekilde sıralanabilir:

- 1- N-cadherin: Hücre zarlarında eksprese edilen bu hücre adezyon molekülü mezankimal hücrelerin yoğunlaşması evresine spesifiktir,
- 2- Kollajen tip II: ESM komponenti olan bu molekül ekstremite mezankimal hücrelerinin kondrojenik değişimi evresine spesifiktir,
- 3- Alcian mavisi boyaması: ESM içerisine sentezlenen glikozaminoglikanları tutan bir boyadır.
- 4- Kollajen tip X: ESM komponenti olan bu molekül kondrositlerin matürasyon ve hipertrofi evresine spesifiktir.

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada mezenkimal mikro-kütle kültürlerinde CNP-3 ve NPR-B'nin mRNA ekspresyon profilleri ile yukarıda sıralanan moleküllerin mRNA ekspresyon profilleri arasındaki olası korelasyon RT-PCR yöntemi temel alınarak incelenmiştir. Bunun yanı sıra, benzer kültürlerin besi yerinde çözünür CNP sinyal peptidi ile uyarılmaları sonrası yine bahsi geçen belirleyici moleküllerdeki olası mRNA ve protein ekspresyon değişiklikleri de araştırılmıştır.

Literatürden edinilen bilgiler ışığında CNP-3/NPR-B sinyal yolunun uyarılması hücre içerisinde şu olası değişikliklere yol açar (Olney 2006; Potter vd. 2006):

- 1- Bu sinyal yolunun ikincil habercisi olarak çalışan cGMP'nin hücre içi sentezi artar.
- 2- cGMP hücre içerisinde cGMP bağımlı protein kinaz I ve II'yi (cGK-I ve cGK-II), cGMP bağımlı iyon kanallarını ve cGMP bağımlı fosfodiesterazları aktive eder.

Bu sinyal yolunun herhangi bir aşamada kesintiye uğramasını sonuçları deneysel ve klinik pek çok çalışmada gösterilmiş olduğu üzere dwarfizm ve osteokondrodizplazilerdir (Olney 2006; Potter vd. 2006). NPR-B mutasyonlarının ortaya çıkarttığı osteokondrodizplazi AMDM adı ile bilinir. Tüm bu gelişmelere rağmen literatürde bu

sinyal yolunun bahsi geçen etkilerinin mekanizmasının belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmalar paralelinde, uzmanlar MSC'lerin TGF- β ile uyarılan kondrojenik farklılaşmasında CNP uygulamanın etkilerini test etmişlerdir. Bu süreçte ortaya çıkarılan sonuçlar, CNP'nin doza bağımlı etkilerine işaret etmektedir (Şekil-15). 10^{-8} M CNP uygulanan kültürlerde, alcian mavisi boya tutma yoğunluğunda artış gösterirken (Şekil-15i ve j), bu etki 10^{-7} M CNP uygulanan grupta en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Şekil-15g ve h). Her 2 grupta sadece TGF- β uygulanan grupla kıyaslanmıştır (Şekil-15c ve f). Diğer taraftan 10^{-6} M CNP uygulanan grupta alcian mavisi boya tutma yoğunluğu negatif bir etki göstermiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçları , *in vivo* kollajenaz ile muamele edilen insan trabeküler kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma fazların tümünün bu model sistemde *in vitro* olarak taklit edilebildiğini, ve her bir farklılaşma fazına spesifik belirleyici özellikte moleküllerin (adipojenik farklılaşma fazına spesifik lipoprotein lipaz, kondrojenik farklılaşma fazına spesifik kollajen tip II, ve osteojenik farklılaşma fazına spesifik bonesiala proteini) mRNA düzeyinde ekspresyonlarını göstermiştir. Bir sonraki aşamada, önce insan CNP proteininin bu sinyal proteininin reseptörü olan NPR-B'nin *in vivo* mRNA ekspresyon profili incelenmiştir. Sonuçlar, CNP ve NPR-B'nin trabeküler kemik iliği kaynaklı insan mezenkimal kök hücrelerinde ifade edildiğini, NPR-B'nin bir reseptör oluşu ile uyumlu olarak hücre zarında CNP'nin ise salgılanan bir protein olarak sitoplazma içinde ekspre edildiğini göstermiştir. Aynı inceleme RT-PCR metodu ile yapıldığında NPR-B'nin m-RNA ekspresyon düzeyinin CNP'den daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar, CNP/NPR-B sinyali yolunun TGF- β ile uyarılan MSC'lerin kondrojenik farklılaşma sürecinde glikozaminoglikan sentezini güçlü bir şekilde uyardığı, etkisinin de doza bağlı olarak göstermiş olabileceğini destekler niteliktedir. Bu sonuçlar daha öncede çalışılan primer kondrositler ve MSC'lerde CNP/NPR-B sinyali yolunun fonksiyonunu göstermek açısından önemlidir. Kök hücre ve doku mühendisliği alanlarında, bu sinyal yolunu daha iyi anlaşılmasını sağlamak için bu ve benzeri çalışmaların çoğaltılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma gelecekte gerçekleştirilebilecek olan, CNP-3/NPR-B sinyal yolunun endokondral kemik gelişimi ve özellikle mezenkimal kondrogenез ve ilgili mekanizmalar üzerindeki etkileri konulu pek çok yeni çalışmaya temel oluşturacağı bir gerçektir. Sonuçlarımız CNP-3'ün kondrojenik mezenşimde eksprese edilen NPR-B reseptörü üzerinden etki eden bir parakrin faktör olarak, erken prekondrojenik mezenkimal yoğunlaşmayı, takip eden dönemde glikozaminoglikan sentezini ve son olarak da geç dönem değişim mekanizmalarından kondrojenik matürasyon ve hipertrofiyi tetiklediğini düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR

- Hücrelerin kemik parçalarından ilk göçleri 7-11. günlerde, hücrelerin kemik parçaları çevresinde doygun bir düzeye ulaşmaları 11-20. günlerde ve hücrelerin tüm kültür ortamında, odaklar arası bölgelerde de doygun seviyeye ulaşmaları 14-26. günlerde gözlenmiştir.
- P3 hücrelerin immünflüoresan analizi sonucunda STRO-1, CD73 ve CD105 için (+); CD34, CD45 ve CD144 için (-) oldukları gösterilmiştir.
- Bu MKH'lerin uygun mikro çevre koşullarında osteojenik, kondrojenik ve adipojenik değişimleri ve bu dokulara özgü molekülleri mRNA düzeyinde ifade ettikleri gösterilmiştir.
- TGF- β 1 ile uyarılmış kondrojenik değişim sürecinde elde edilen kondrojenik dokularda 10^{-8} M ve 10^{-7} M CNP'nin Alcian mavisi boyanma koyuluğunu doza bağımlı olarak arttırdığı, 10^{-6} M CNP'nin ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında boyanma koyuluğunu azalttığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF (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 U S A.**, 89:2732-6.
- Ahrens PB, Solursh M, Reiter RS. (1977) Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. **Dev Biol.**, 60:69-82.
- Alan T, Tufan AC. (2008) C-type natriuretic peptide regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin and collagen type X-related functions. **J Cell Biochem**, 105(1):227-35.
- Ballock RT, Reddi AH. (1994) Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. **J Cell Biol.**, 126:1311-8.
- Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih LY, Al-Gazali LI, Kant S, Cole T, Morton J, Cormier-Daire V, Faivre L, Lees M, Kirk J, Mortier GR, Leroy J, Zabel B, Kim CA, Crow Y, Braverman NE, van den Akker F, Warman ML. (2004) Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. **Am J Hum Genet.**, 75(1):27-34.
- Cameron, Gren, GB., White, CN., Laterza, OF., Clarke, W., Kim, H., Sokoll, LJ. (2006) Assessment of BNP and NT-proBNP in emergency department patients presenting with suspected acute coronary syndromes. **Clin Biochem.**, 39:11-8.
- Can, A. (2008) Haematopoietic stem cells niches: Interrelations between structure and function. **Trans Apheresis Sci.** 8; 2 1–2 8.
- Can, A.(2009) Kök Hücre Biyolojisi Ve Klinik Uygulamalar, **TÜBA**, Ankara, 113s.
- Caplan, A.I., Dennis, J.E. (200) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J. Cell Biochem.** 1; 98 (5): 10 -84.
- 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 U S A.**, 98(7):4016-21.
- Cserjesi P.(1995) A basic helix-loop- helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. **Development.**, 121: 1099-110.

- Çetinkaya, D. U. (2009) Kök Hücre Biyolojisi Ve Klinik Uygulamalar, **TÜBA**, Ankara, 113s.
- Daumer KM, Tufan AC, Tuan RS. (2004) Long-term In Vitro Analysis of Limb Cartilage Development: Involvement of Wnt Signaling. **J Cell Biochem.**, 93:526-41.
- De Bari C, Pringle S, Pitzalis C, Dell'Accio F. (2006) Kök hücre nişi: tıpta yeni hedef. **Cur. Opin. Orthop.**, 17:398-404
- De Bold. AJ., De Bold, ML. (2005) Determinants of natriuretic peptide production by the heart: basic and clinical implications. **J. Investig Med.**, 53:371-7.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS.(2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. **J Osteoarthritis Cartilage**, 8:309-34
- 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: 911-21.
- Ellmers, LJ., Scott, NJ., Piuholaj, Maeda, N., Simithies, O., Frampton, CM., Richards, AM., Cameron, VA. (2007) Npr1-regulated gene pathways contributing to cardiac hypertrophy and fibrosis. **J Mol Endocrinol.**, 38: 245-57.
- Gilbert SF, Sunderland, MA, Sinauer. (2001) **Developmental Biology.**,35:346-47.
- Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP.(1996) Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. **Genes Dev.**, 10:301-12.
- Haliloglu M, Ozen H, Kocak N, Unsal M. (1999) Acromesomelic dysplasia associated with mild lumbar spine stenosis. **Eur Radiol.**, 1999;9(1):103-4.
- Hall BK, Miyake T.(2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. **Bioessays**, 22:138-47.
- Hall BK, Miyake T.(1995) Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. **Int J Dev Biol.**, 39:881-93..
- Hickok NJ, Haas AR, Tuan RS.(1998) Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. **Microsc Res Tech.**, 43:174-90.
- Ianakiev P, Kilpatrick MW, Daly MJ, Zolindaki A, Bagley D, Beighton G, Beighton P, Tsipouras P. (2000) Localization of an acromesomelic dysplasia on chromosome 9 by homozygosity mapping. **Clin Genet.**, 57(4):278-83.
- Iida-Klein A, Varlotta V, Hahn TJ.(1989) Protein kinase C activity in UMR-106-01 cells: effects of parathyroid hormone and insulin. **J Bone Miner Res.**, 4:767-74.

- Kant SG, Polinkovsky A, Mundlos S, Zabel B, Thomeer RT, Zonderland HM, Shih L, van Haeringen A, Warman ML. (1998) Acromesomelic dysplasia Maroteaux type maps to human chromosome 9. **Am J Hum Genet.**, 63(1):155-62.
- Kaplan SL, Grunbach MM.(1990) Pathophysiology and treatment of sexual precocity. **J Clin Endocrinol Metab.**, 71: 785-9.
- Lev R, Spicer S.(1964) Specific staining of sulfated groups with Alcian blue at low pH. **J Histochem. Cytochem.**, 12: 309.
- Lincoln TM, Cornwell TL. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. **FASEB J.**, 7(2):328-38.
- Linsenmayer, TF., Hendrix, MJ. (1980) Monoclonal antibodies to connective tissue macromolecules:type II collagen. **Biochem Biophys Res Commun.**, 92:440-6
- Loder RT, Wittenberg B, Silva G.(1995) Slipped capital femoral epiphysis associated with endocrine disorders. **J Pediatr Orthop.**, 15:349-56.
- Mello MA, Tuan RS.(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.**, 35:262-9.
- Mericq V, Uyeda JA, Barnes KM, De Luca F, Baron J.(2000) Regulation of fetal rat bone growth by C-type natriuretic peptide and cGMP. **Pediatr Res.**, 47(2):189-93.
- 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(9):3604-10.
- Moore KL, Persaud TVN: The Developing Human. (1993) **Clinically Oriented Embryology**, 5th ed. Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company
- Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NR, Tuan RS. (2002) **J Orthop Res.**, 20:1060-1069.
- Oberlender SA, Tuan RS. (1994) Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. **Development**, 120:177-87.
- Oberlender SA, Tuan RS. (1994) Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. **Cell Adhes Commun.**, 2:521-37.
- O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Rosier RN.(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.

- Olney RC.(2006). C-type natriuretik peptide in growth : a new paradigm. **Growth Horm. IGF Res.**, 22:6-14.
- Owen, M.E. (1 8) The marrow stromal system. In Marrow Stromal Cell Culture. (Eds. Beresford, J.N. Owen, M.E.) 1-10, **Cambridge Univ. Press.**
- 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(5295):2082-6.
- Potter, LR., Abbey-Hosch, S., Dickey, DM. (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. **Endocrine Reviews**, 27:47-72.
- Rosier RN, O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE. (1989) Transforming growth factor beta: an autocrine regulator of chondrocytes. **Connect Tissue Res.**, 20:295-301.
- Sato, N., Sanjuan, I.M., Heke, M., Uchida, M., Naef, F., Brivanlou, A.H. (200) Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. **Dev. Biol.** 2 0: 404–1 .
- Tamura N, Garbers DL. (2003) Regulation of the guanylyl cyclase-B receptor by alternative splicing. **J Biol Chem.**, 2003 Dec 5;278(49):48880-9.
- Tavella S, Raffo P, Tacchetti C, Cancedda R, Castagnola P.(1994) N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. **Exp Cell Res.**, 215:354-62.
- Tufan AC, Tuan RS. (2001) Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. **FASEB J.**, 15(8):1436-8.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML. (2003) Characterization of Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Human Trabecular Bone. **Stem Cells**, 21:681-693.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM.(1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature**, 335:440-2.
- Vortkamp A, Lee K, Lanske K, Segre G, Kronenberg HM.(1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTS-related protein. **Science**, 273:613-22.
- Wallen-Ohman M, Lonnbro P, Schon A, Borrebaeck CA.(1993) Antibody-induced apoptosis in a human leukemia cell line is energy dependent: thermochemical analysis of cellular metabolism. **Cancer Lett.**, 75:103-9.

- Webster MK, Donoghue DJ.(1996) Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. **EMBO J.**, 15:520-7.
- Woods, A., Khan, S., Beier, F. (2007) C-type natriuretic peptide regulates cellular condensation and glycosaminoglycan synthesis during chondrogenesis. **Endocrinology**, 148: 30-41.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N.(1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. **Nature**, 398:714-8.
- 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/guanylyl cyclase-B pathway. **J Biol Chem**, 273(19):11695-700.
- 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. **Nat Med**, 10(1):80-6.
- WEB_1. (2010). A closer look at stem cell treatments. www.closerlookatstemcells.org (09.06.2010).
- WEB_2. (2010). International Society for Cellular Therapy. www.celltherapysociety.org (09.04.2010).
- WEB_3. (2010). Cluster of Differentiation. www.sciencegateway.org (10.10.2009).

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Denizli'de doğdu. İlköğrenimini Denizli Sümer İlkokulunda, lise öğrenimini Denizli Anafartalar Lisesinde tamamladı.

2003 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2007 yılında mezun oldu.

2007 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi Merkez Labaratuvarında staj gördü (1,5 ay).

2008 yılında Aydın Lisan Dil Kurslarından İngilizce sertifikası aldı.

2008 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji/Embriyoloji Bölümünde yüksek lisansa başladı.

Katıldığı kongreler ve bildirileri

Serter S.¹, Tezcan B.², Kıter E.³, Tufan A.Ç.¹ (2010). Trabeküler kemik kökenli insan mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) izolasyonu, karakterizasyonları ve değişim potansiyellerinin gösterilmesi. X. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, sözlü sunu (bildiri).

Tezcan B.¹Serter S.², Kıter E.³, Tufan A.Ç.² (2010). Regulation of C Type natriüretic peptide signaling during TGF- β 1 induced chondrogenic differentiation of human trabecular bone-derived mesenchymal stem cells. ISSCR 8th Annual Meeting, poster sunumu (bildiri).