

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HISTOLOJİ VE EMBRYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**SERUM/PLAZMA CNP DÜZEYİNDEKİ ARTI İN BÜYÜME
SKELET GELİŞİMİ VE SKELET DİSPLAZİLERİ
ÜZERİNDEKİ OLASI ETKİLERİN SİÇAN MODELİNDE
İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. MURAT SERKANT ÜNAL**

**DANIŞMAN
PROF.DR. AHMET ÇEVİK TUFAN**

DENİZLİ -2014

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HISTOLOJİ VE EMBRYOLOJİ
ANABİLİM DALI

SERUM/PLAZMA CNP DÜZEYİNDEKİ ARTI IN BÜYÜME
SKELET GELİŞİMİ VE SKELET DİSPLAZİLERİ
ÜZERİNDEKİ OLASI ETKİLERİNİN SIÇAN MODELİNDE
İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. MURAT SERKANT ÜNAL

DANIŞMAN
PROF.DR. AHMET ÇEVİK TUFAN

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 05.10.2011 tarih ve 2011TPF037 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ -2014

Prof.Dr. Ahmet Çevik TUFAN danışmanlığında Dr. Murat Serkant ÜNAL tarafından yapılan “Serum/Plazma CNP düzeyindeki artışın büyüme, iskelet gelişimi ve iskelet displazileri üzerindeki olası etkilerinin sıçan modelinde incelenmesi” başlıklı tez çalışması 08.01.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

: Prof.Dr. Recep KUTLUBAY



ÜYE

: Prof.Dr. Ahmet Çevik TUFAN



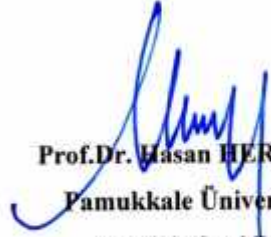
ÜYE

: Doç.Dr. Emin Oğuzhan OĞUZ



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

08/03/2014


Prof.Dr. Hasan BERKEN
Famukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TE EKKÜR

Ba ta uzmanlık e itimim süresince ve tez çalı malarımnda bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, manevi olarak her zaman deste ini hissettiren, tez danı manım Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ö retim üyesi Sayın Prof.Dr. Ahmet Çevik Tufan'a sonsuz saygı ve te ekkürlerimi sunarım.

E itimime katkıları bulunan de erli hocalarım Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Ba kanı Sayın Prof.Dr. Recep Kutlubay'a, Sayın Prof.Dr. Kenan Çoyan'a, Sayın Prof.Dr. Gülçin Abban Mete'ye, Sayın Prof.Dr. Erdal Karaöz'e Sayın Doç.Dr. Emin O uzhan O uz'a, Sayın Doç.Dr. Erdo an Kocamaz'a, Sayın Yard.Doç.Dr. Nazan Keskin'e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ö retim üyesi Sayın Yard.Doç.Dr. Yavuz Dodurga'ya, ya amım boyunca yanımda olup maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anne ve babama, karde lerime ve e im Feyza Pınar Ünal'a, bana mutluluk veren o ullarım Görkem ve Ya ız'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki asistan arkadaş larıma, Deneysel Ara tırma Biriminde görevli Veteriner Hekim Barboros ahin'e, çalı malarımnda tecrübelerini benden esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında görev yapan sa lık teknikeri Erdinç Karata 'a te ekkürlerimi sunarım.

Ç NDEK LER

Sayfa no

ONAY SAYFASI.....	III
TE EKKÜR	IV
Ç NDEK LER	V
S MGELER VE KISALTMALAR	VII
EK LLER D Z N	IX
TABLolar D Z N	X
ÖZET.....	XI
NG L ZCE ÖZET	XIV
G R	1
GENEL B LG LER.....	3
1. KÖK HÜCRELER	3
1.1. Kök hücre Tanımı Ve Kök Hücre Çe itleri	3
1.2. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri.....	4
1.2.1. Farklanma (Plastisite).....	4
1.2.2. Kendini Yenileme, Bölünme Biçimleri ve Kök Hücre Ni i	6
1.2.3. Kök Hücre Belirteçleri ve Köklülük.....	8
2. MEZENK MAL KÖK HÜCRELER.....	9
2.1. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları	10
2.2. Fiziksel Özellikler ve In Vitro Ço altılma	10
2.3. In Vitro Kültür artları.....	10
2.4. İmmünojenotipik Özellikler	11
2.5. Sekretuar Özellikler ve İmmünomodulatuar Etki.....	12
2.6. Farklılaşma Potansiyeli	12
2.7. Dokularda Takibi	13
3. SKELET S STEM GEL İ M	13
3.1. İntermembranöz Kemik Geli İmi.....	13
3.2. Endokondral Kemik Geli İmi	14
3.3. Endokondral Kemik Geli İminin A amaları.....	14
3.4. Endokondral Kemik Geli İmini Etkileyen Ba lıca Faktörler	16
4. IN V TRO HÜCRE KÜLTÜR S STEMLER NDE KONDROGENEZ FAZLARININ BA LICA BEL RLEY C LER	19
5. KONDROGENEZ VE NATR ÜRET K PEPT T S NYAL YOLLARI	21
5.1. Genel Olarak Natriüretik Peptitler ve Reseptörleri	22
5.1.1. Natriüretik Peptid Ailesi	22
5.1.2. Natriüretik Peptid Reseptörleri	26
5.1.2.1. Natriüretik Peptid Reseptör A.....	26
5.1.2.2. Natriüretik Peptid Reseptör C.....	29
5.1.2.3. Natriüretik Peptid Reseptör B.....	29
H POTEZ VE ÇALI MANIN AMACI.....	31
GEREÇ VE YÖNTEM	33

1. TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ SIÇAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ZOLASYONU VE KÜLTÜRE EDİLMESİ	33
1.1. Deneysel Uygulama	33
1.2. Trabeküler Kemik Kökenli Siçan Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	34
1.2.1. Osteojenik ve Adipojenik Tek Tabaka Kültürlerin Farklılaşması	34
1.2.1.2. Oil Red O Boyama Solüsyonu	34
1.2.1.3. Fiksatif Solüsyonu Hazırlama	34
1.2.1.4. Osteojenik Değişimin Alizarin Red S Boyanması ile Hücre Analizi	35
1.3. Yüksek Yoğunlukta Pellet Kültürlerin Kondrojenik Farklılaşması	35
1.3.1. Kondrojenik Değişimin Alcian Mavisi Boyanması ile Hücre Analizi.....	36
1.4. Akım sitometri Analizi.....	36
2. TEK TABAKA KÜLTÜRLERDE CNP VE NPR-B VARLIĞININ GÖSTERİLMESİ ...	37
3. SIÇANLARIN BÜYÜME PARAMETRELERİ VE KEMİK BOY UZUNLUKLARI ÖLÇÜMÜ.....	38
3.1. Histolojik inceleme Amacı	38
3.2. İmmünohistokimyasal Boyama	39
4. SERUM NT- PROCNP DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	40
5. SIÇAN TIBBA ORGAN KÜLTÜRÜ.....	40
BULGULAR	42
1. BÜYÜME PARAMETRELERİ	42
2. SIÇANLARIN GELİŞİM SÜRECİNDE FEMUR EPİFİZ BÜYÜME PLAKINDA GÖZLENEN HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER.....	42
3. SERUM NT-PROCNP DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	46
4. TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ SIÇAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ZOLASYONU	46
4.1. Trabeküler Kemik Kökenli Siçan Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	46
4.2. Akım Sitometri Analizi.....	49
5. SIÇAN TIBBA ORGAN KÜLTÜRÜ.....	49
6. TRABEKÜLER KEMİK KÖKENLİ SIÇAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE CNP/NPR-B FADELERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ	53
7. SIÇAN TIBBA KEMİKLERİNDE CNP'İNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA İLE FADELERİ	53
TARTIŞMA	62
SONUÇLAR	69
KAYNAKLAR	70
EKLER	
EK- 1 ETİK KURUL ONAY BELGES	
EK- 2 BİLİMSEL ARA TIRMA PROJELERİNE DESTEK YAZISI	

S MGE VE KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
AGM	: Aort-Gonad-Mezonefron
ALCAM	: Aktive Lökosit –Hücre Adezyon Molekülü
ALP	: Alkalen Fosfotaz
AMDM	: Moroteaux Tipi Akromezomelik Displazi
ANP	: Atrial Natriüretik Peptid
AS	: Adipojenik Uyarıcı
BMP	: Kemik Morfogenetik Protein
BNP	: Beyin(B-Tipi) Natriüretik Peptid
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
cm	: Santimetre
CNP	: Kardiak (C-Tipi) Natriüretik Peptid
CO₂	: Karbondioksit
COMP	: Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteini
Col	: Kollajen
CS	: Kondrojenik Uyarıcı
DEX	: Deksametazon
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
Dntp	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FBS	: Fetal Sı ır Serumu
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
GAG	: Glukozaminoglikan

GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat Dehidrogenaz
Gr	: Gram
HO₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorür
HLA	: nsan lökosit antijeni
HRP	: Horseradish Peroksidaz
Ig	: mmünoglobulin
Ihh	: ndian Hedgehog
IHK	: mmünohistokimya
ISCT	: Uluslararası Hücresel Tedavi Derne i
ITS	: nsülin-Transferin-Selenyum
LPL	: Lipoprotein Lipaz
M	: Molar
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
ml	: Mililitre
mRNA	: Haberci RNA
ng	: Nanogram
N-CAM	: N-Hücre Adezyon Molekülü
Nppc	: Natriüretik Peptid Proteini Kodlayan Gen
NPR	: Natriüretik Peptid Reseptör
OC	: Osteokalsin
OS	: Osteojenik Uyarıcı
PBS	: Fosfat Buffer Saline
PTHrP	: Paratroid Hormon lgili Peptid
RNA	: Ribonükleik Asit
T3	: Triiyodotironin
TGF-	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TSG	: TGF- ile Uyarılmı Klon

EK LER D Z N

Sayfa No

ekil 1.	Uzun kemiklerde endokondral kemikle me.....	18
ekil 2.	Mezenkimal kök hücrelerde n vitro Kondrogenz.....	20
ekil 3.	Natriüretik peptid tipleri.....	24
ekil 4.	Natriüretik peptidlerin reseptörleri.....	27
ekil 5.	Natriüretik Peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri.....	28
ekil 6.	Hipotezimiz için kabul edilen çalı ma modeli.....	32
ekil 7.	Sıçanların 3-14.hafta arasındaki vücut a ırlıkları ölçümü.....	43
ekil 8.	Sıçanların 3-14. haftalar arasındaki biparietal (BP), nazo-oksipital (NO) ve nazokuyruk (NK) uzunlukları.....	44
ekil 9.	Sıçanların 3-14. hafta arasındaki alt ve üst ekstremitte ölçümleri.....	45
ekil 10.	Sıçan femur epifiz plaklarının histolojik görüntüsü.....	47
ekil 11.	Sıçanların serum NT- proCNP düzeylerinin ölçümü.....	48
ekil 12.	Kollajenaz ile muamele edilen sıçan trabeküler kemik parçalarından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin morfolojik olarak gözlenmesi.....	50
ekil 13.	Mezenkimal kök hücrelerin karakteristik de i im potansiyelinin histolojik olarak gözlenmesi.....	51
ekil 14.	Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi.....	52
ekil 15.	7 günlük sıçan tibialarının izolasyonu.....	54
ekil 16.	21 günlük organ kültürü süreci.....	55
ekil 17.	Deney sonucunda gruplara ait tibia kemik görüntüleri.....	56
ekil 18.	Kontrol, CNP ve MKH gruplarında tibia epifiz plaklarının histolojik görünüşleri.....	57
ekil 19.	Kontrol grubundaki mezenkimal kök hücreler.....	58
ekil 20.	CNP grubundaki mezenkimal kök hücrelerin CNP ifadeleri.....	59
ekil 21.	Mezenkimal kök hücrelerde NPR-B ifadeleri.....	60
ekil 22.	CNP'nin epifiz plakları, matürasyon, hipertrofi, kemikle me bölgeleri ve kemik ili indeki ifadeleri immünohistokimya ile gösterilmesi.....	61

TABLULAR D Z N

	Sayfa No
Tablo 1. Kökenlerine, farklanma etkinliklerine veya farklanma yönlerine göre kök hücre türleri.....	5
Tablo 2. Kök hücrelerin farklanma yetkinli i (plastisite).....	7

ÖZET

Serum/Plazma CNP düzeyindeki artı n büyüme, iskelet sistemi geli imi ve iskelet displazileri üzerindeki olası etkilerinin sıçan modelinde incelenmesi

Dr. Murat Serkant ÜNAL

Axial ve appendiküler iskelet kemiklerinin epifiz büyüme plaklarında boyuna uzamayı sa layan endokondral kemikle me gözlenir. Bu olgu sürecinde kondrositler prolifer olurlar, de i ime u rarlar, matriks sentezlerler ve boyutlarında artı ile karakterize matürasyon ve hipertrofi evrelerinden geçerek kalsifiye olurlar ve son a amada da kalsifiye kıkırdak matrixinin osteoblastlar ile yer de i tirmelerini ve kemikle meyi sa layan apopitotik bir süreç geçirirler. Endokondral büyüme endokrin, parakrin ve otokrin pek çok faktör tarafından kontrol edilir ve bu faktörlerin ço u fiziksel olarak normal dı ı büyüme paternine sahip hastaların bulgularından yola çıkılarak yapılan ara tırmalar sonucunda bulunmu tur.

Maroteaux tipi akromezomelik displazi (AMDM, OMIM 602875) otozomal çekinik geçi gösteren bir dwarfizm türü olup, uzun kemiklerde ve vertebralarda ekil bozuklukları, özellikle ekstremite orta ve distal uzun ve tubüler kemiklerinde kısalık ve epifiz büyüme plaklarında abnormaliteler ile karakterize bir patolojik durumdur. AMDM'e yol açan patolojinin natriüretik peptit reseptör-B (NPR-B) proteininin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonları oldu u tespit edilmi tir. NPR-B proteini fonksiyonel haployetersizli i, ki bu durum AMDM gözlenen hastaların ta ıyıcı anne ya da babalarında görülmektedir, normale göre dwarfizm düzeyinde olmayan boy kısalı ı ile karakterizedir. NPR-B bir transmembran reseptör proteini olup, kıkırdak, kemik, beyin, adrenal gland, uterus gibi birbirinden farklı pek çok dokuda varlı ı gösterilmi tir. Ancak mevcut literatür bilgileri bu proteinin ana görevinin iskelet sistemi geli imi ile ilgili oldu unu dü ündürmektedir. AMDM'li hastalarda da iskelet sistemi bulgularına e lik eden nörolojik patolojiler veya anormal kan basıncı düzeyleri gibi problemlerin görülmemi olması bu dü ünceyi desteklemektedir. NPR-B'nin ligandı olan C-tipi natriüretik peptid (CNP)'i ve bu reseptörün ikincil habercilerinden birisi olarak i lev gördü ü dü ünülen cGMP-ba ımlı protein kinaz II (cGKII) sinyal yolunu hedef alan çalı malar bu sinyal

yolunun iskelet sistemi gelişimi üzerine olan etkileri konusunda ara tirmalara ıkt tutmaktadır.

Fare modelinde yapılmı çalı malar CNP'den yoksun farelerde dwarfizm görüldü ünü kanıtlamı tır. Fare ve sıçan tibiaları kullanılarak yapılmı organ kültürlerinde CNP'nin kondrosit proliferasyonunu ve hipertrofisini arttırdı ı gösterilmi tir. Grubumuz tarafından tamamlanan iki ayrı TÜB TAK projesinde (SBAG-104S261 ve SBAG-108S189) ise; 1) tavuk embriyosu primer mezenkimal hücrelerinin kondrojenik de i imleri sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolunun prekondrojenik mezenkimal yo unla ma, glikozaminoglikan sentezi, ve kondrositlerin matürasyon ve hipertrofilerini kapsayan geç dönem de i im süreçlerinde etkin rol oynadı ı, 2) insan MKH'lerinin TGF- 1 uyarısı altında kondrojenik de i imleri sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolunun uyarıldı ı, 3) bu uyarının özellikle erken kondrojenik de i im sürecinde glikozaminoglikan sentezi ve geç dönemde kondrojenik matürasyon ve hipertrofi üzerine etkileri oldu u, 4) etkilerin doza ba ımlı oldu u ve 10^{-7} M CNP konsantrasyonunun en etkin doz oldu u gösterilmi tir.

Mevcut literatür bilgisinden hareketle CNP'nin canlıya uygun bir formatta sistemik olarak uygulanabilirli i söz konusu olur ise büyüme ve iskelet sistemi gelişimi üzerine etkilerinin daha detaylı incelenebilmesi, dolayısı ile nedeni bilinen veya bilinmeyen iskelet sistemi displazilerinde olası bir tedavi yöntemi olarak test edilebilmesi önemli bir a amayı olu turmaktadır. Bugüne kadar gerçekleştirilen deneysel hayvan modelleri üzerindeki ara tirmalarda ya CNP'nin transkripsiyonunu sa layan genin ilgili hayvanın genomuna yüksek kopya sayısında aktarımı yöntemi, ya da deney hayvanına ba lanan bir infüzyon pompası ile sabit hız ve dozda sürekli sistemik CNP infüzyonu yöntemi denenmi tir. Sonuçlar CNP'nin sistemik dola ımdaki düzeyinin artı ı sonucu ba arıya ula ılabilece i do rultusunda heyecan verici olsa da, her iki yakla ımın da pratikte klini e uygulanabilmesi oldukça zordur. Buna kar ılıklı osteokondrogenez literatüründeki yeni bilgi ve geli melerin doku mühendisli i ve biyoteknoloji alanlarına ta ınması a amasında yeni bir yakla ım

olarak kök hücrelerin kullanılabilirli i her geçen gün artan sayıda ara tırmaya konu olmaktadır.

Grubumuz tarafından son dönemde tamamlanan çalı mada insan trabeküler kemik kökenli MKH'lerinin gerek CNP'yi gerekse bu ligantın reseptörü olan NPR-B'yi endojen olarak eksprese etti i gösterilmi tir. Bu çalı mada, MKH'lerin sitoplazmik sekresyon granüllerinde CNP, hücre membranında ise NPR-B'yi ifade ettikleri gösterilmi tir. Dolayısı ile MKH'lerin bu CNP sekresyon yetilerinde gerçekle tirilebilecek bir artı , bu hücreleri yukarıda bahsi geçen iskelet sistemi displazilerinde olası bir tedavi yöntemi olarak kullanabilme ansımızı gündeme getirecektir.

Bu projede özetle, deneysel sıçan modeli kullanılarak öncelikle sıçanların büyüme parametreleri ile serum NT-proCNP düzeyleri arasındaki ili ki de erlendirilmi tir. Ardından kemik ili i kökenli MKH'ler izole edilmi , karakterizasyon ve ço altılmaları sa lanmı tir. Son a amada ise bu hücrelerin CNP ve NPR-B ifadeleri ile salgıladıkları CNP'nin kemik geli imi üzerine olan etkileri tibia organ kültürlerinde analiz edilmi tir.

Anahtar Kelimeler: endokondral kemikle me, C-tipi natriüretik peptid, mezenkimal kök hücreler, osteokondrodisplaziler, iskelet sistemi geli imi.

ABSTRACT

Evaluation of the effects of serum/plasma CNP level elevation on growth, skeletal system development, and skeletal dysplasias in a rat model system

Dr. Murat Serkant ÜNAL

Bones of the axial and appendicular skeleton form and elongate through endochondral ossification, a process by which mesenchymal cells differentiate into chondrocytes, which proliferate, mature, and undergo hypertrophy and matrix calcification; the calcified cartilage is eventually replaced by bone. This process is under the regulation of endocrine, paracrin and otocrin factors identified through the study of individuals having abnormal growth patterns.

The condition known as Acromesomelic dysplasia, Maroteaux type (AMDM; OMIM no. 602875) is an autosomal recessive skeletal dysplasia caused by loss-of-function mutations in the NPR-B gene. It is characterized with severe dwarfism, i.e., disproportionate short stature with shortening of the middle and distal segments of the limbs. Functional haploinsufficiency of NPR-B protein, generally seen in carrier parents of patients, is characterized with a short stature phenotype, which is less severe than dwarfism. NPR-B is a transmembrane receptor detected in a variety of tissues including cartilage, bone, brain, adrenal gland, and uterus etc. However, based on the literature it is believed that NPR-B is mainly involved in development of skeletal system. Exclusion of neurological pathologies and/or abnormal blood pressure levels from the symptoms of AMDM patients supports this hypothesis. Studies analyzing the functional involvement of C-type natriuretic peptide (CNP), the ligand of NPR-B, or cGMP-dependent protein kinase II, one of the main intracellular effecters of CNP/NPR-B signaling pathway in skeletal development play essential role in this field.

Studies on natriuretic peptides utilizing genetically altered mice revealed that CNP knock-out mice were severely dwarfed in comparison to controls. Organ culture studies of mice and/or rat origin demonstrated involvement of CNP signaling in chondrocyte proliferation and hypertrophy. Two individual granted projects from TUBITAK (SBAG-104S261 and SBAG-108S189) completed by our group also

implicated that; 1) CNP/NPR-B signaling is involved in prechondrogenic mesenchymal condensation, glycosaminoglycan synthesis, and late differentiation, i.e., maturation and hypertrophy, of chondrocytes differentiated from primary mesenchymal cells of embryonic chick limb buds, 2) this pathway is activated during the process of TGF-beta1 induced chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (MSCs), 3) CNP/NPR-B signaling pathway may strongly be involved in GAG synthesis in TGF-beta1 induced chondrogenic differentiation of MSCs, 4) this effect is likely to be dose dependant, and reached its peak level at the dose of 10^{-7} M CNP.

Based on the literature it is important to test systemic administration of CNP and its effects on growth, skeletal development, and finally on skeletal dysplasias as a promising treatment strategy. In limited studies worked on this strategy in the literature investigators either over-expressed CNP in the genome of the mice or given CNP i.v. via an infusion pump using the mouse model. Results were promising in terms of systemic elevation of CNP levels will induce development; however, the strategy they used are not practically possible to use in clinical applications in humans. Relevant to musculoskeletal tissue engineering, investigations concerning the use of MSCs gained importance during the last decade. Functional analysis of signaling pathways involved in these cells may help improve our knowledge in this field.

Recent studies completed by our group showed that trabecular bone derived MSCs endogenously express both CNP and its receptor NPR-B. CNP expression in these MSCs was in agreement with CNP being a secreted protein produced in these cells. On the other hand, NPR-B expression in these MSCs was localized to the plasma membrane of these cells. Thus, a strategy that is going to increase the secretion of CNP from these MSCs may introduce these cells as a treatment option in skeletal dysplasias in the clinic.

In this project, the relationship between rat growth parameters and serum NT-proCNP levels was demonstrated by experimental rat model system. Subsequently isolation, progressive subculturing and characterization of bone marrow derived MSCs protocols were performed. At the last stage, MSCs' CNP, NPR-B expression and the effects of CNP secreting on bone development were analyzed in tibia organ cultures.

Keywords: endochondral bone formation, C-type natriuretic peptide, mesenchymal stem cells, osteochondrodysplasias, skeletal system development

G R

nsan genom projesi ile birlikte ya amın sırlarının gizli oldu u genlerin ifresi bugün için %99.99 oranında çözülmü tür. Genetik ifrenin çözümlenmesi ile birlikte, genlerin yapılarındaki bozukluklara ba lı hastalıkların kesin ve kalıcı çözümleri olabilecektir. Bunun yanı sıra genetik ifrede meydana gelen bozulmalarla ili kili olmayan birçok hastalık insan ya amını tehdit etmektedir. Bu tür hastalıkların ilaçla tedavisi mümkün olabilmekte ancak ço u zaman doku-organ yetmezlikleri olabilmektedir. Bu gibi durumlarda hücre-doku-organ nakilleri gündeme gelmektedir. Ancak, ba kalarından yapılan nakillerde doku reddi reaksiyonları gibi immünolojik sorunlar çıkmaktadır. Ayrıca, uygun verici bulmaktaki güçlükler halen sorun olmaya devam etmektedir. Bu durumda hasta bireyin genetik özelliklerini ta rıyan bir hücreden (kök hücre) elde edilebilecek doku ya da organın nakli, hem verici azlı ı sorununu ve hem de immünolojik sorunları ortadan kaldıracaktır. Bunun yanında, günümüzde tedavisi pek mümkün görünmeyen tip I diyabetten multiple skleroza, Duchenne'nin kas distrofisinden ciddi spinal medulla hasarlarına kadar pek çok hastalı ın hücre esaslı tedavi yöntemleri ile iyile tirilebilece i dü ünülmektedir (29, 30).

Hücre esaslı tedavinin (hücresel tedavinin) amacı, hasar gören bir hücre/doku veya organın biyolojik i levini yerine koymak, tamir etmek veya geni letmektir. Bir hedef organa, o organın i levlerini eski durumuna getirmeye yetecek sayıda ve kalitede izole edilmi ve özellikleri belirlenmi olan hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ula ılabilir. Yenileyici (rejeneratif) veya tamir edici (reparatif) tıp olarak da adlandırılan bu alanda kök hücreleri oldukça önemli kullanılma potansiyeli göstermektedir (29, 30).

Kök hücreler üzerinde yapılan biyolojik, moleküler, biyokimyasal ve immünolojik çalı malar, bu hücrelerin yeni ilaçların geli tirilmesinde, gen tedavilerinde, organizmayı olu turan hücrelerin hasarlanması ya da ölmeleri durumunda kullanılabilece ini öngörmektedir (25).

Uygulanan hücre esaslı tedavi yöntemlerinin ba arısı, aralarında hücre biyolojisinin, immünolojinin, doku mühendisli inin, moleküler biyolojinin, geli imsel biyolojinin, madde bilimi, nakil biyolojisinin ve tedavi edilmekte olan hastalı a ili kin klinik uzmanlı ının sahasının da bulundu u pek çok farklı disiplinlerin bir araya gelmesini gerektirmektedir (30).

Kök hücrelerin biyolojisinin anla ılması ve insanlarda kök hücre tedavisinde ortaya çıkan problemleri gidermek için çok daha fazla çalı ma yapılması gerekmektedir. uan tedavisi olmayan hastalıklar kök hücre çalı malarının hedefini olu turmaktadır (30).

GENEL B LG LER

1. KÖK HÜCRELER

1.1. Kök Hücre Tanımı ve Kök Hücre Özellikleri

Canlı vücudunda uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler kök hücreler olarak bilinmektedir (25).

Bilim çevrelerinde bir hücreyi kök hücre olarak tanımlamak için belirli kriterler kullanılmaktadır.

- 1) Kök hücreleri, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptir.
- 2) Kök hücreler özelleşmemişlerdir.
- 3) Kök hücrelerden elde edilen bir yavru hücre, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir.
- 4) Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrarlayabilen bir şekilde çoğaltabilmelidir.
- 5) Kök hücrelerin in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmaya katkı sağlayabilmelidir (30).

Blastokist zigotun belirli kez bölünmesiyle oluşur. İnsanlarda 4-6 günlük bir blastokistin iç hücre kitlesinde yer alan hücreler embriyon kök hücresi olarak isimlendirilir (Tablo 1). Bunlar embriyon gövdesine ait bütün hücre tabakalarını ve onlardan köken alacak olan organ sistemlerini oluşturma yeteneğine sahiptir (Totipotent) (7, 29).

Gelimekte olan organizmada belirli kemik iliği olmak üzere çeşitli organlarda ve bu organların belirli doku bölgelerinde gerektiğinde kendini çoğaltabilen, kararlanabilen ve farklılaşabilen hücreler varlığını sürdürür. Bunlara yetkin kök hücreler veya dokuya özgü kök hücreler adı verilmektedir (Tablo 1) (7, 29).

Üçüncü grup kök hücre ise primordiyal germ hücreleri olarak bilinen di ilerde ovositlerin öncüsü olan ovogonyumları erkekte spermatozoonların öncüsü olan spermatogonyumları olu turacak olan hücrelerdir.

Bir ba ka grup fetus kök hücresidir. Son yıllarda onarımsal tıptaki yerlerinin artmasıyla birlikte fetustan elde edilir ve saklanır hale gelmi tir. Amniyon sıvısındaki kök hücreler, plasenta kaynaklı kök hücreler, göbek kordonu stroması kaynaklı kök hücreler bu grupta sayılabilir. Çe itli yönleriyle embriyon ve yeti kin kaynaklı kök hücreler arasında ço galma ve farklanma yeteneklerine sahiptirler (7).

1.2. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

1.2.1. Farklanma (Plastisite)

Farklanma çok hücreli organizmaları olu turan hücrelerin olgunla ma ve uzmanla ma sürecinde geçirdikleri bir dizi de i imi tanımlamak için kullanılır. Farklanma a amasına giren hücre, bir yandan bölünmeyi durdururken di er yandan çevresinden gelen sinyallare yanıt vermeye hazırlanır. Bir hücre için ileri farklanma süreci genellikle o hücrenin ço alma sürecinin bitti i noktadan ba lar. Söz konusu hücre önce yeterli sayıya ula ır. Bu süreç genellikle hücre bölünme döngüsünden kalıcı veya geçici olarak çıkılması (G_0 fazı) anlamına gelir. Farklanmayı uyaran ve sürdüren etkenler ortadan kalkarsa, birçok hücre bölünme döngüsüne tekrar girer (G_1 fazı) (7, 30).

Laboratuvar ortamında kök hücrelerin belli bir çizgide farklanması belli kimyasal ve fiziksel ko ulların yerine getirilmesi veya do rudan hücrenin genetik programının de i tirilmesi ile ba arılır. Yeti kin bir kök hücresinin ya hücresine farklanması için kültür ortamına belli dozlarda deksametazon, indometazin, izobutil metilksantin ve insülin gibi do al hormonlar ve yapay kimyasal maddeler kullanılır. Bu maddelerin in vivo ortamda kök hücrelerin ya hücresine dönü ümünü uyarıp uyarmadı ı bilinmemektedir. n vitro ortamda birkaç haftada bu yolla elde edilen ya hücreleri in vivo kar ılıklarıyla kıyaslanacak düzeyde olgunla ır (7, 30).

Tablo-1. Kökenlerine, farklılaşma etkinliklerine veya farklılaşma yönlerine göre kök hücre türleri (7).

sim	Hücre tipi (yerleşim)	Farklılaşma etkinliği	Farklılaşma yönü
EKH*	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve embriyon dışı tabakalar
EKH	Blastokist aşamasındaki 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
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** : Yeti kin kök hücreler

Kendini yenilemekte olan bir hücrede çok sayıda gen aktif iken az sayıda gen ifadesi görülür. Buna karşın farklılaşmakta olan bir hücrede az sayıda gen aktif iken daha çok sayıda gen ifadesi görülür. Bununla birlikte bir hücrede bu esnada protein sentezi artmıştır. Hücre ilevsel olma yolunda ilerlerken gerek yapısal, gerekse ilevsel bütün özelliklerini kazanmak üzere özgün proteinle sentezler ve salgılar (7).

Kök hücrelerini diğer hücrelerden ayıran en önemli özellik, farklılaşma yetkinliklerinin yüksek olmasıdır. Bu özellikleri sayesinde organizmanın hücresel yapım ve onarımında eksilen hücreleri yenilemek üzere geni bir olarak sunarlar (Tablo 2) (7, 29).

1.2.2. Kendini Yenileme, Bölünme Biçimleri ve Kök Hücre Niteliği

Kendini yenileme özelliği, organizmanın yaşamı boyunca bir hücrenin kendi kopyasını alacak şekilde çoğalması ve gerektiğinde organ ve dokuya özgü hücrelere dönüşebilmesi anlamına gelir (7, 29).

Hücrelerin bölünme kapasitesini, belirleyen faktörlerden biri de kromozomların ucunda yer alan "telomer" denilen DNA zincirleridir. Telomerler de kromozom uçlarıdır ve binlerce kez tekrarlanan kısa tekrar dizileri (insanda TTAGGG) içerirler. Telomerler, kromozom uçlarının parçalanmasını ve dağılmasını ya da diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek, kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar. Her replikasyon sonucu kromozom kısalır. Bu kaybı karşılamak için telomerler bünyesinde tersine transkriptaz telomeraz proteinini (hTERT) ve telomeraz RNA (hTR) taşıyan bir ribonükleoprotein olan telomeraz tarafından uzatılır. Normal bir hücrenin her bölünümünde, telomer boyu yaklaşık olarak 100 baz çifti kadar kısalır. Somatik hücrelerde telomeraz etkin değildir ve kromozomların telomerleri kısalır. Öte yandan insan germ, tümör ve embriyonik kök hücre serilerinde telomeraz etkinliği bulunmuştur (8, 29).

Kök hücreleri öncü hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri, kök hücrelerin bölünmeler esnasında bir yandan öncü hücreye dönüşecek hücreyi üretirken bir yandan da kendine yedek almasıdır. Bu olay asimetrik hücre bölünmesi

Tablo 2. Kök hücrelerin farklılaşma yetkinliği (plastisite) (7)

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

sonucu olur. Böylece kök hücre havuzu ya da boyu sabit kalır. Hücre içindeki asimetri, bazı organelin, protein gruplarının ve RNA'nın yavru hücrelerden sadece birisine aktarılmasıyla başlanır. Bazı çalışmalar DNA'nın da asimetrik dağılımını göstermektedir. Bölünmenin sonunda orijinal DNA, yavru hücrelerden birisine giderken kararlanma geçirir ve öncü hücreye dönüşecek olan diğer hücrede yeni DNA sentezi meydana gelir (7).

Kök hücrelerin hücre dışı asimetrisi, hücrenin dışındaki mikroçevre (ni) tarafından yerine getirilir. Ni ise oluşturan hücre dışı matris bileşenleri, komu hücreler ve salgı proteinleri, kök hücre sayısını ve hücrenin bulunduğu durumu kontrol altında tutar. Hücre havuzunu sabit tutabilmek için asimetrik hücre bölünmesi homeostatik koşullarda gerçekleşir, embriyonun gelişim sürecinde ve doku onarımında gerekli olan yeni hücre gereksinimini karşılayabilmek için simetrik hücre bölünmesi de gerçekleşebilir. Özellikle doku seviyelerinin olumsuz etkilendiği akut harabiyet durumlarında bu mekanizmayla kök hücrelerin öncü hücrelere dönüşerek kısa zamanda doku restorasyonunu garanti altına alması amaçlanır ve sonunda kök hücre havuzu küçülür. Buna karşın kök hücreler simetrik olarak bölünerek yeni kök hücreleri oluştururlar ve kök hücre havuzu genişler. Kök hücrelerin kendini yenileme mekanizmasının hassas bir denge içinde ayarlanması, dokuda yenilenmesi gereken hücrelerin ortaya çıkışında kritik rol oynar, bir yanda farklılaşmakta olan yeni hücreler oluşurken öte yandan kök hücre havuzu sabit tutulmaya çalışılır (7).

1.2.3. Kök Hücre Belirteçleri ve Köklülük

Kök hücrelerini diğer hücrelerden ayırtan hücresel ve moleküler özellikleri tanımlamak için köklülük terimi kullanılır. Kök hücrelerin moleküler imzası olarak da bilinen bu özellikler, özgün gen ifadeleri veya transkripsiyon sonrası bir dizide işaretler olup bunlar sayesinde kök hücreler farklılaşmaksızın özgün yapılarını ve seviyelerini korurlar (7, 30).

Kök hücre belirteçlerini kullanarak kök hücre tipini belirlemek, en yaygın başvurulan yöntemlerden birisidir. Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal

yolakları üzerinde veya hücre yapma molekülleri olarak rol oynayan bu belirteçlerden birçoğu kısaca “CD” (Farklanma Kümeleri-Clusters of Differentiation) olarak bir başlıkta toplanmış olup, hücre türüne göre çok özgün veya çok yaygın olarak bulunurlar. Hematopoetik kök hücreler için en yaygın kabul gören CD belirteçleri CD33 ve CD45’tir. Mezenkimal kök hücrelerini ayırt etmek için CD29, CD79, CD105 gibi belirteçler kullanılır. Bunlar, yüzey özelliklerinin yanı sıra transkripsiyon faktörleri, enzimler veya büyüme faktörleri de olabilir (7, 18, 30).

2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Mezenkimal kök hücreler (MKH) stromal kökenli erken kök hücrelerdir. Bu hücreler bağ dokunun ana hücreleridir. Bunun yanında tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini oluşturmaktadır (11). Kemik iliğinde non-hematopoietik kök hücrelerin varlığı 130 yıl önce Alman patolog Cohnheim tarafından ileri sürülmüştür (67). 1976 yılında Frindenstein bu hücreleri ilk defa tanımlamıştır. Frindenstein, kemik iliği kültürlerinde bu hücrelerin morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma özelliği gösterdiğini ve kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği olduğunu göstermiştir (11, 46, 67). Fibroblastlardan en önemli farkları nükleus yerleşimlerinin bu hücrelerde asimetrik olmasına karşın MKH’lerde simetrik olmasıdır (67).

Mezenkimal kök hücreler elde edildikleri dokularda çok az sayıdadır. Bu nedenle in vitro hücre kültürü ortamında çoaltılmaları gerekir. Bunun için bu hücrelerin tanımlanmış özelliklerinin in vivo özelliklerini yansıtmaktan uzak olduğunu bilinmektedir. Bu durum klinik uygulamalar için dezavantaj oluşturmaktadır. Farklı dokulardan morfolojik ve biyolojik olarak benzer özelliklere sahip MKH’ler izole edilebilmektedir. Bu nedenle Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) gerekli kriterler önermiştir. MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; plastik yüzeye yapışabilme (plastik adherens), stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir (11, 67).

2.1. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

Kemik ili i MKH'ler için ana kaynak sayılmaktadır. Kemik ili i aspirasyonunda 1×10^6 hücreye kar ı ortalama 2 ile 100 arasında de i en sayıda MKH oldu u gösterilmi tir (11). Çocuklarda 29 CFU (coloni forming unit) /1 milyon tek çekirdekli hücre oranı varken ileri ya larda bu oran 3.2 CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranına kadar inmektedir (46). Ayrıca kemik, periosteum, kas dokusu, di pulpası ve maksillofasial dokular, karaci er, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovyal sıvı, periferik kandan da izole edilebilir (11, 46).

2.2. Fiziksel Özellikler ve In Vitro Ço altılma

Mezenkimal kök hücreler, dokularda çok az bulunmaktadır. Klinik uygulama ve temel bilim ara tırmalarında yeterli hücre sayısına ula abilmek için in vitro ortamda ço altılmaları gerekir (11). Mezenkimal kök hücrelerde telomerleri sabit bir uzunlukta tutmaya yetecek seviyelerde telomeraz üretimi olmaktadır. Bundan dolayı uzun bir süre bu hücreler pasajlanabilir (29, 30). Kültür ortamında ço altılan MKH'ler ı ık veya faz kontrast mikroskopisi ile incelendi inde hücrelerin i ekinde oldu u ve fibroblast benzeri hücre toplulu u olu turdukları görülür (11, 67).

2.3. In Vitro Kültür artları

Hücrelerin in vitro kültür ortamında ço alması için %10-15 FCS/FBS (fetal calf/bovine serum) içeren kültür ortamında plastik flask tabanına yapı ma özelli i göstermi olan hücreler ço alabilmektedirler. Kemik ili inden izolasyon için dansite gradient yöntemi ile mononükleer hücre süspansiyonu hazırlanırken di er dokulara genellikle enzimatik ayrı ma uygulanmaktadır. Enzim olarak kollajenaz tip-1 ve dispaz kar ımı kullanılmaktadır. Süspansiyon haline getirilen hücreler kültür vasatı içinde, kültür kaplarına konularak %5CO₂ içeren ve %95 nemli inkübatörde inkübasyona bırakılır. Kültür vasatı olarak sıklıkla DMEM-LG veya alfa- MEM kullanılmaktadır. Ayrıca buza ı serumu olan FBS (fetal bovine serum) %10-15 oranında eklenmektedir (11, 46).

Mezenkimal kök hücreler, standart kültür ko ulları altında plastik kaplarına yapı maktadır. 24-48 saat sonra yapı mayan hücrelerin uzakla tırılmasını takiben ve ço almaya ba layan hücreler yeterli yo unlu a ula tıklarında %0.25 tripsin-EDTA ile yapı an hücreler kaldırılarak dü ük konsantrasyonlarda yeni kültür kaplarına ekim yapılarak ço altılır. Hücreler 7-10 günde bir pasajlanarak istenen sayıya ula mak için ço altılır. Kültürler 3 günde bir taze vasat eklenerek optimal kültür artları temin edilmeye çalı ılır. Hücreler ileri çalı malar veya klinik uygulamalarda kullanılmak amacıyla dondurularak saklanabilir. Dondurma vasatı olarak da sıklıkla DMEM-LG, %20 FBS (veya alternatifi) ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) karı ımı kullanılır. Hücreler önce -80 °C'de 1 gün bekletilir sonra da sıvı nitrojene konularak saklanır. Mezenkimal kök hücrelerde istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasını önlemek amacıyla P3-P5 gibi erken pasajlar kullanılmaktadır (11).

Hücrelerin tek tek dü ürülerek olu turulan klonal hücre analizlerinde ço alma özellikleri yönünden heterojen hücre populasyonları dikkat çekmektedir. Hücrelerin büyük bir ço unlu u hücre siklusunun G₀/G₁ fazında iken, yaklaşık %10 olan bir kısmı ço almayı beklemektedir (11).

2.4. mmünofenotipik Özellikler

Sadece MKH'leri tanımlayan spesifik bir antijen tanımlanmamı tır. Kemik ili inden elde edilmi ve kültürde ço altılmı MKH populasyonunda CD45, CD34, CD14 veya CD11b, HL sınıf II, CD79 Veya CD19 gibi hematopoetik antijenlerdeki pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekmektedir. Buna kar ın, MKH'ler stroma ile ilgili antijenlerden tipik kabul edilenlerden SH2 (CD105), SH3-SH4 (CD73), CD90, CD29, CD44 pozitifdir (11, 67).

ISCT kriterlerine göre bir MKH populasyonunun %95 veya daha fazlasının CD105 (endoglin olarak bilinir ve Mab SH2 ekinde tanımlanmı tır), CD73 (ekto-5 nükleotidaz olarak bilinir ve MAb SH3 ve SH4 ekinde tanımlanmı tır), CD90 (Thy-1 olarak da bilinir) antijenleri için pozitif olması gerekir. Son zamanlarda yapılan çalı malarda yeni CD200, CD146 gibi bazı antijenlerden bahsedilmektedir (11, 67).

2.5. Sekretuar Özellikler ve İmmünmodulator Etki

Mezenkimal kök hücreler çok sayıda biyoaktif molekül, sitokin, kemokin, enzim ve ekstrasellüler matriks proteinleri sentezler. Mezenkimal kök hücrelerin immünbaskılayıcı olması ve immünojenitesinin düşük olması in vivo uygulamalar açısından avantajdır. Bu hücreler immün rejeksiyondan kaçabildikleri için in vivo kullanımında doku grubu uyumu artıdır. Bunların yanında antiinflamatuvar etkileri de gösterilmiştir. Akut inflamatuvar bir tablo oluşturan steroid dirençli akut greft versus hastalığında (aGVHD) istenilen immünsupresif, antiinflamatuvar etki çoğunlukla gözlenir.

MKH'lerin in vivo perivasküler yerleşiminde olduğu için vasküler ve immün sistem arasında bağlantı sağladıkları, damarsal yapıları stabilize etmek yanında doku ve immün sistem homeostazında rol oynadıkları ve focal doku hasarı tamirinde aktif rol sahibi olduklarını düşündürmektedir. Ayrıca antiapoptotik, anjiyojenik, antifibrotik özellikleri bu hücrelerin hasar onarımında rollerini açıklamaktadır (11, 67).

2.6. Farklılaşma Potansiyeli

Mezenkimal kök hücreler farklı konnektif dokular olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir. In vitro koşullarda uygun stimulanlarla osteojenik, adipojenik, kondrojenik, myojenik hücrelere farklılaşma potansiyelleri vardır. Mezenkimal kök hücrelerin adiposit, osteosit, gibi kendi kökeninden de farklı bir doku hücresine (hepatosit, pankreas beta hücresi gibi) transdiferensiyasyon oranının in vivo koşullarda düşük olduğu o nedenle bu mekanizmanın hasar tamirinde ancak sınırlı bir etkisi olabileceği düşünülmektedir. Buna karşılık farklı doku kökenli dokuların onarımında MKH'lerin farklılaşma özelliğinin daha aktif rolü olabileceği öngörülmektedir (11).

Mezenkimal kök hücreler, in vitro ortamda farklılaşma gösterebilmektedirler. Adipojenik, osteojenik, kondrojenik farklılaşma özelliklerinin gösterilmesinin MKH tanımlanması için katkı sağladığı bildirilmiştir (11, 67).

2.7. Dokularda Takibi

MKH'in in vivo olarak uygulandıktan sonraki durumu hasarlı dokuya göç, yerleşim özellikleri, orada çoğalmaları, farklılaşma özellikleri, yeterince incelenmemiştir. Hücrelerin yeşil floresan protein (GFP) ile transfekte edilmesi ve floresan hücrelerin dokularda takibi ise en çok uygulanan yöntemdir. MKH'lerin lusiferaz ile üretilen biyoluminesans cihazı ile in vivo takibi veya süpermanyetik demiroksit nanopartikülleri ile üretilen manyetik rezonans (MR) altında in vivo görüntülenmesi de giderek artan yöntemlerdir. Demiroksit ile üretilen demir oksit partikülleri, insanda MR çekimi esnasında da kullanıldığından in vivo hücre takibi için ilgi çekmektedir (11).

3. SKELET SİSTEMİ GELİŞİMİ

Vertebralılarda iskelet sistemi mezoderm ve crista neuralis hücrelerinden orijin alır (2, 40). Primitif kemik yapıların oluşumunda ilk aşama mezenkim hücrelerinin yoğunlaşması ile ortaya çıkan model yapılarıdır (20, 22, 40). Bu aşamadan itibaren kafatası kemiklerinde olduğu gibi bazı kemikler bu mezenkim doku içerisinde intramembranöz yolla, diğerleri ise extremitelerin uzun kemiklerinde olduğu gibi endokondral yolla gelişimlerini tamamlarlar (40).

3.1. Intramembranöz kemik gelişimi

Bu tip kemik gelişimi, yoğunlaşarak membranöz bir tabaka oluşturur mezenkim doku hücrelerinden, vaskülarizasyonu takip eden dönemde doğrudan osteoblastik hücre gelişimi yolu ile olur (40). Bu doğrudan gelişim mekanizması tam olarak anlaşılmasınıyla birlikte, Bone Morphogenetik Protein (BMP) grubu faktörlerin bu gelişimde önemli rol oynadıkları bilinmektedir (16).

Osteoblastik gelişim üreten hücreler osteoid doku veya prekemik adı verilen bir matriks salgılayarak, hücreler arası alanı doldururlar. Erleyen dönemde prekemik dokunun kalsifikasyonu ve osteoblastlardan osteositlerin gelişimi, gelişen kemik dokusunun organizasyonunu sağlar. Bu tip kemikle meydana gelen güzel örnek yassı kafatası kemiklerinin gelişimidir. Kafatasının frontal ve parietal kemikleri yanı sıra oksipital, temporal, mandibula ve maksilla kemiklerinin bazı kısımları

intramembranöz kemikle meyle olur. Bu yöntemin, kısa kemiklerin büyümesine ve kemik kalınlamasına da katkısı vardır (26).

3.2. Endokondral kemik gelişimi

Bu tip kemik gelişimi, yonunla mezenkimal hücrelerinin oluşturduğu primitif kemik modellerinin önce kıkırdak dokuya değişimleri, ardından da bu kıkırdak dokunun yerini kemik dokuya bırakması yoluyla olur (20, 22, 40). Dolayısıyla endokondrojeniz bu mekanizmanın önemli bir morfogenetik parçasıdır.

Geçmiş moleküler ve hücre düzeyindeki çalışmalar, endokondral kemik gelişiminde endokondrojeniz ve osteogenezin çok erken embriyonik dönemde planlandığını ve bu iki mekanizmanın birbirini takip eden fakat birbirinden bağımsız iki ayrı gelişim mekanizması olduklarını ortaya koymuştur (13, 22). Gerek endokondrojeniz süresince, gerekse takip eden osteogenez mekanizmaları esnasında meydana gelebilecek genetik ve/veya moleküler aksaklıklar ileri dönemde karımıza birbirlerinden ayırt edilmeleri morfolojik yönden çok zor olan, ortak bir kemik ve/veya ekstremiteler defektli fenotipi ile çıkacaklardır.

3.3. Endokondral Kemik Gelişiminin Aşamaları

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

1. Lateral plate mezoderminden orijin alan mezenkimal hücrelerinin, primitif ekstremiteler tomurcu bölgelerine migrasyonları ve mitoz yoluyla proliferasyonları.
2. Prolifere olan bu mezenkimal hücrelerinin ekstremiteler tomurcuklarının merkez orta bölgelerinde, hücreler arası teması artırarak birbirlerine yaklaşmaları ve hücre kümeleri oluşturmak suretiyle yonunlamaları.

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 (43, 54). Bu dönemde ekstra hücreler matrisi (ECM) mezenkimal hücrelerinin birbirleriyle yakın temaslarına izin veren bir yapıda olup

Kollajen Tip-I, hyaluronan, tenascin, fibronektin gibi faktörlerden zengindir (20, 21, 22). Ayrıca, prekondrojenik mezankimal hücrelerde spesifik olarak eksprese edilen ve bir transkripsiyon faktörü olan Scleraxis'in kırıkta a özel genlerin transkripsiyonlarını tetikledi i gösterilmiştir (10). Bu protein kırıkta doku yerini kemik dokuya bırakıncaya kadar aktif kalır. Yine önemli bir transkripsiyon faktörü olan Sox9 geninin de spesifik olarak prekondrojenik yo unla ma bölgelerinde eksprese edildi i ve bir sonraki a ama olan mezankimal-kondrojenik de i imi tetikledi i bilinmektedir (62).

nsanlarda Sox9 geninde görülen mutasyonlar "Campomelic Dysplasia" adı verilen ve uzun kemiklerin deformite ve açılanması ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıkmasına yol açmaktadır (13).

3.Yo unla mı mezenkim hücrelerinin birbirleri ile olan hücreler arası ba lantıları kaybederek kondrositlere de i imleri. Bu dönemde kondrositlerdeki N-cadherin ve N-CAM ekspresyonlarında belirgin bir azalma gözlenir (42, 43, 56). Ayrıca kondrositlerden kırıkta dokuya özgü bir ECM depozisyonu ba lar.

Bu ECM'in en önemli bile enleri 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 (ba lantı) proteini salgılanmaya ba larlar (20, 21, 22).

4. Kondrositlerin matürasyonları ve hipertrofiye u ramaları. Bu dönemde tipik olarak ECM'deki Kollajen Tip-II, -IX, ve -XI yo unluklarını Kollajen Tip X'a bırakırlar ve ECM daha fazla fibronektin ve daha az proteaz inhibitörü içerir (20, 21, 22). Kondrosit matürasyonu ve hipertrofisi, kırıkta dokuda uygun kalsifikasyon ve ilerleyen dönemde kemik doku ile yer de i im açısından çok önemlidir. Bu mekanizma embriyonik kemik geli imi sırasında çalı tı ı gibi, postnatal dönemde ekstremitelerde kemiklerinde boyuna uzama ve ki inin postürünün geli imi boyunca ve kırık kemiklerin iyile mesi sürecinde de büyük önem ta ır.

Uzun kemiklerde primer ossifikasyon merkezleri diyafiz denilen bölgelerde yer alırlar (ekil-1). Bu bölgelerdeki kırıkta hücreleri hipertrofiye u rarlarken

Kollajen Tip-X bakımından zenginle en ECM kalsifiye olmaya ba lar. Bunu öncelikli olarak diyafizial bölgede vasküler dokunun perikondriumdan kıkırdak dokusuna infiltrasyonu ve osteoprogenitör hücrelerin kıkırdak dokuya ta nması izler. Bu yolla aynı zamanda ileride kemik ili ini olu turacak hücreler de kıkırdak dokuya ta nmaya ba lanır. E zamanlı olarak hipertrofiye kondrositlerde planlanmı hücre ölümü (apoptoz) gözlemlenirken, osteoprogenitör hücreler de osteoblastik hücrelere de i im göstermeye ba larlar. Ortaya çıkan apoptotik hücre yapıları kemik matriksinin mineralizasyonunda önemli rol oynarlar.

3.4. Endokondral Kemik Geli imini Etkileyen Ba lıca Faktörler

Yukarıda da özetle bahsedildi i gibi, kıkırdak dokuda proliferasyon ve hipertrofi mekanizmaları bir denge içinde çalı mak zorundadır. Bu dengenin sa lanmasında pek çok büyüme faktörü, hormon, sitokin ve hücre sinyal mekanizması rol almaktadır. Bunlar arasında “fibroblast growth faktor” (FGF)’ler (14, 61), östrojen, tiroid hormonu ve triiyodotironin (T3) gibi hormonlar (4, 28), “transforming growth faktor- 1” (TGF- 1) (44, 50), sinyal molekülleri “Indian Hedgehog” (Ihh) (17) ve “paratiroid hormon-related peptide” (PTHrP) (1, 24), anti-apoptotik faktörlerden Bcl-2 (36, 57), ayrıca “Tumor Necrosis Factor” (TNF) (60) ve p53-tümör baskılayıcı genler grubundan p63 (63) ba lıcalarıdır. Epifiz pla ı bölgesinde (ekil-5) FGF’lerin etkisi ile kıkırdak hücrelerinin proliferasyonlarında azalma ve de i ime u rayarak matüre ve hipertrofiye olma hızlarında artı görüldü ü tesbit edilmi tir (16). nşanlarda FGF reseptörlerinde (FGFR) görülen mutasyonların yol açtı ı en ciddi klinik tabloyu “dwarfizm ” olguları olu turur.

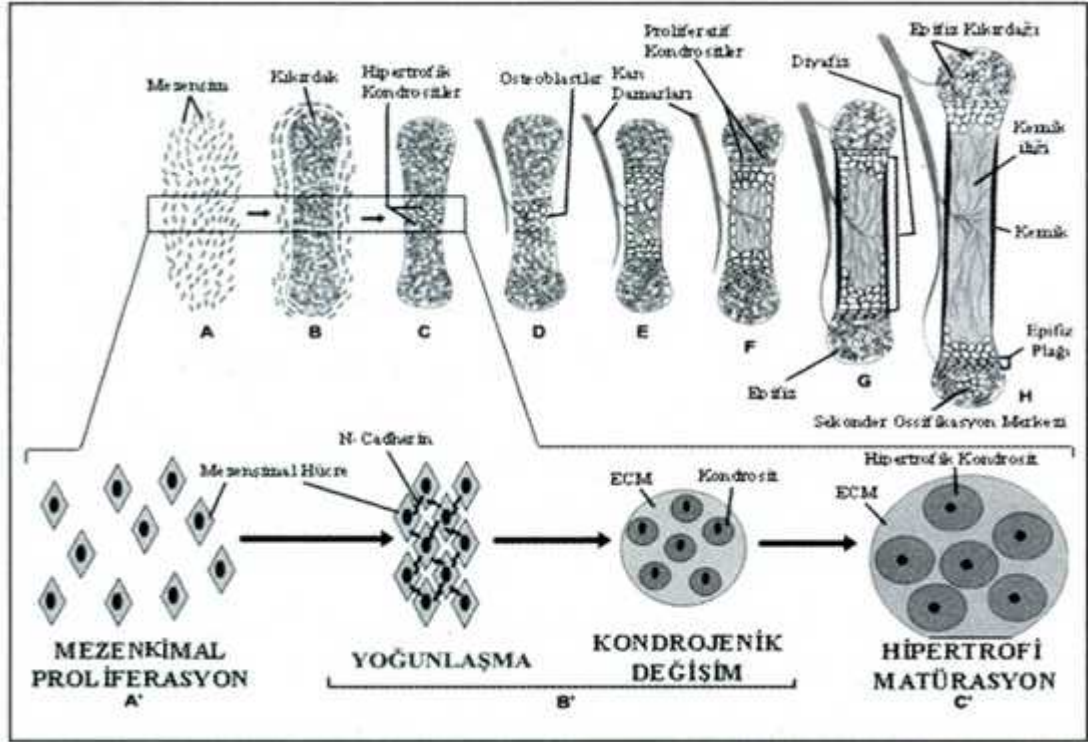
Örne in, FGFR3’ün transmembran bölgesine özel olan ve glycin’in arginin’e dönü ümünü sa layan, 380 numaralı amino asit’te meydana gelen mutasyon “Achondroplasia” olgularının %95’lik bir ço unlu una yol açar (14, 61, 16). Di er taraftan, FGFR1’de görülen mutasyonların ekstremitte defektleri ve kranial sütürlerin erken kapanması (Craniosynostosis) ile karakterize “Pfeiffer” sendromuna yol açtı ı gösterilmi tir (16).

Di er bir önemli faktör östrojen hormonudur. Ba ta östrojen olmak üzere sex hormonları da prolifere olan kondrositlerin matüre ve hipertrofiye olmalarını hızlandırır (28). Yapılan çalı malar T3 hormonunun da geli en kemiklerin epifiz plaklarında hipertrofiye kondrositlerin kolumnar organizasyonlarında önemli rol oynadı mını göstermi tir (4).

Ayrıca, T3 hormon eksikli i görülen hipotiroidizm olgularında, kemiklerin epifiz pla ı bölgelerinde mekanik dı etkilere kar ı dayanıksızlık geli ti i gözlemlenmi tir (35). Di er taraftan TGF- 1'in ise kondrosit proliferasyonunu indükleyici oldu u saptanmı tır (44, 50). Dolayısı ile bu iki faktörün denge içinde çalı an mekanizmalardan biri oldu u olasılı ı son dönemde taraftar toplayan bir hipotezdir.

Di er bir denge mekanizması Ihh ve PTHrP arasındaki negatif geri besleme yolu ile ortaya konmu tur (59). Post- mitotik ve pre-hipertrofik kondrositler özel olarak Ihh salgılayan hücrelerdir. Ihh ise proliferatif bölgeden hipertrofik bölgeye geçi gösteren kondrosit sayısını kontrol eden PTHrP salgılanmasını uyarır. Mekanizma doyuma ula tı ında PTHrP'in Ihh salgılanması üzerindeki inhibe edici negatif geri besleme etkisi, ilave kondrositlerin hipertrofik bölgeye giri lerini ve takip eden apoptozlarını önleyecektir. Di er sayılan TNF, Bcl-2 ve p63 moleküllerinin de apoptotik yolda önemli rol oynadıkları gösterilmi tir (58, 63).

Özetle, yukarıda bahsi geçen mekanizmalar yolu ile ekstremite kemiklerinde epifiz pla ı adı verilen ve prolifere olan kondrositleri, matüre kondrositleri ve hipertrofiye kondrositleri içeren, diyafiz-epifiz birle im noktalarında uzunlamasına geli im sa lanır. Perikondrium ossifiye olarak yerini periost'a bırakır. Kondrositler diyafize do ru hipertrofiye olarak ilerler ve matriks kalsifikasyonu ve mineralizasyonu, bu hücrelerin yerlerini kemik dokuya bırakmaları ile sonlanır. Epifiz plakları da ossifiye olduklarında kemiklerde boy uzaması durur. Ekstremitte uzun kemiklerinin yanı sıra aksiyal ve pelvik kemikler de endokondral kemikle me yolu ile geli en iskelet yapılarıdır.



ekil-1: Uzun kemiklerde endokondral kemikle me.

Uzun kemiklerde endokondral kemikle me. (A'-H') Endokondral kemikle me sürecinde önemli yeri olan kondrogenez mekanizmalarının tematik gösterimi (16).

4. IN VITRO HÜCRE KÜLTÜR SİSTEMLERİNDE KONROGENEZ FAZLARININ BAĞLICALIKLARI

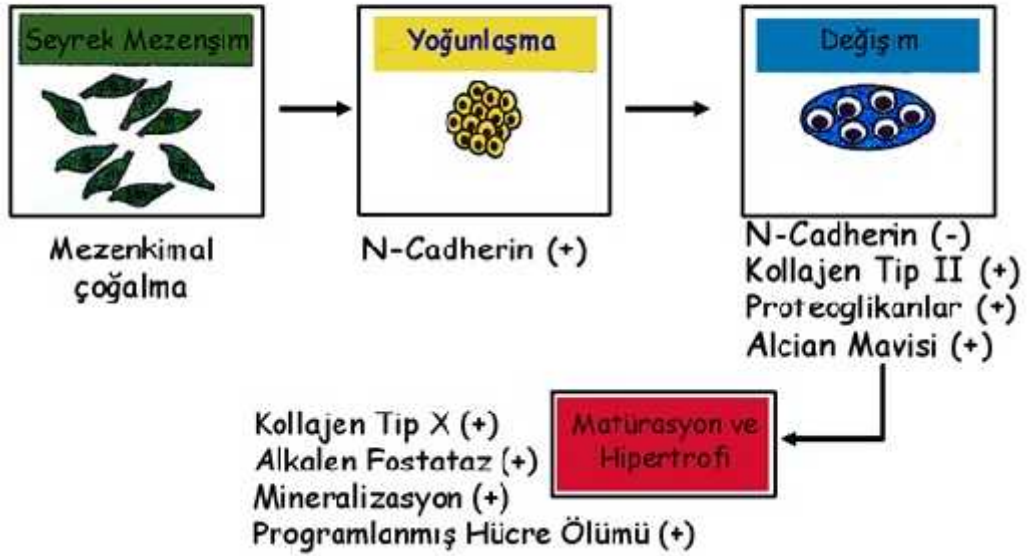
Genel olarak özetlemi olduğumuz bu endokondral kemikleme mekanizması, canlı fare, sıçan ve tavuk embriyo sistemlerinde yapılmış pek çok çalışmanın yanı sıra, özellikle MKH'leri de içine alan pek çok *in vitro* kültür sisteminde de detaylı olarak moleküler düzeyde incelenmiştir (3, 20, 21, 22, 37, 41, 51, 57). Bu *in vitro* model sistemlerin MKH'lerin kondrojenik gelişimi süresince en sık kullanılanlarından birisi de çökelti hücre kültür sistemi (pellet culture system) olarak bilinmekte olup, bu çalışmada da kullanılmış olduğumuz *in vitro* kondrojenizasyon hücre kültür modelidir. Trabeküler kemik, uygun mikro çevre koşulları altında 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 gelişimleri, hücre çökelti kültürlerinde veya üç boyutlu koruyucu biyomateryaller üzerinde ve genellikle transforme edici büyüme faktörlerinden (TGF-1, TGF-2, TGF-3 veya kemik morfogenetik proteinleri, BMP'ler) birisinin uyarıcı etkisi altında gerçekleştirilebilir. Bu *in vitro* çalışmalarda, sıralamamız şöyledir:

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

basamaklar zinciri mekanizmalarını çeşitli moleküler belirleyiciler ile birbirlerinden ayırt etmek ve incelemek mümkündür (Şekil-2). Bu moleküler belirleyicilerden bazıları şu şekilde özetlenebilir:

Kollajen Tip II: mRNA veya protein düzeyindeki tespiti prematüre kıkırdak dokusunda kondrojenik gelişimin gerçekleştiğini gösterir (56). Gerek proliferasyon gerekse yoğunlaşma dönemlerindeki gelişim geçirmemiş mezenkimal hücreleri ise kollajen tip II negatiftirler.

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



ekil 2: Mezenkimal kök hücrelerde in vitro kondrojenез

Alcian Mavisi Boyaması: Alcian mavisi boyası özel olarak kondrojenik de i imine u ramı hücrelerin ECM içerisine salgılamakta oldukları proteoglikanları mavi renge boyar (33). Prekondrojenik doku bu boyayı tutmaz.

Kollajen Tip X: Sadece hipertrofiye u ramı olan kondrositler tarafından ECM'e salgılandı ı için mRNA veya protein düzeyindeki tespiti matürasyon ve hipertrofi fazına özeldir (22, 37, 13).

Endokondral kemik geli iminde rol oynayan kontrol mekanizmalarının gerek *in vivo* gerekse *in vitro* model sistemler kullanılarak hangi a amada fonksiyon gösterdiklerinin tespitinde, yukarıda saydı ımız moleküler belirleyicilerdeki kantitatif de i iklikler temel kriterler olarak alınmalıdır.

5. KONDRONEZ VE NATR ÜRET K PEPT D S NYAL YOLLARI

Yukarıda detaylı olarak olu um sırası verilen embriyonik kıkırdak geli imi ve takip eden endokondral kemikle me basamaklar zinciri, pek çok genetik ve moleküler faktörün kontrolü altındadır.

Bunlar arasında growth faktörler grubundan olan TGF- 1ve 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 ba ta gelen kontrol mekanizmalarını olu tururlar. Kıkırdak dokunun ileride kemik dokuya yerini bırakaca ı uygun form ve yapısını sa layan, tüm bu moleküllerin bir uyum içerisinde çalı arak yönlendirdikleri özel hücreler arası ili kiler, hücre-matriks ili kileri ve özel gen ekspresyonlarıdır.

Son dönemde tanımlanmı ve endokondral kemik geli imi sürecinde etkili oldu u dü ünülen önemli bir di er 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 (5),

bulunu u akromezomelik displazi'nin bir alt grubu olan akromezomelik displazi maroteaux tip'li (AMDM, OMIM no. 602875) hastaların kendilerinden ve sa lıklı aile bireylerinden elde edilen DNA örneklerinin ba lantı analizi (linkage analizi) ve bu analiz sonrası elde edilen bilgiler do rultusunda insan 9. kromozomu üzerindeki ilgili lokus (9p13-q12) bölgesinde yer alan aday genlerin sekanslarının taranması sonucunda elde edilmi tir (5, 23, 27).

AMDM (36) otozomal çekinik geçi gösteren bir dwarfizm türü olup, genellikle do um boy ve a ırlıkları normal sınırlarda olan ki iler do umu takip eden 1. yıl sonunda ya ıtlarına göre kısa kalma e ilimi gösterdi i ve 2. yıl sonunda ise tipik radyolojik bulguları ile kesin tanı koyulabilecek hale geldi i, uzun kemiklerde ve vertebralarda ekil bozuklukları, özellikle ekstremite orta ve distal uzun ve tubüler kemiklerinde kısalık ve epifiz büyüme plaklarında abnormaliteler ile karakterize bir patolojik durumdur (5, 19, 23, 27). İginçtir ki AMDM tanısı konmu ki ilerde bugüne kadar tutulum görülümü olan tek sistem iskelet sistemidir.

5.1. Genel Olarak Natriüretik Peptitler ve Reseptörleri

5.1.1. 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 kalınlı 1, pulmoner tansiyon, ya metabolizması, ve uzun kemiklerde büyüme üzerine etkilidirler (49).

Bilinen 3 klasik tipi vardır (ekil-3):

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

Fizyolojik ara tırmalar insanda kalp ve böbrek arasındaki ba lantıyı uzun zaman önce ortaya koymu tur. İlk olarak De Bold ve arkadaşları (12) tarafından sıçanlarda atriümlara intravenöz olarak enjekte edilen bir homojenatın renal sodyum ve su bo altımını arttırarak, kan basıncını hızla dü ürdü ü gösterilmi tir. Bu geli me

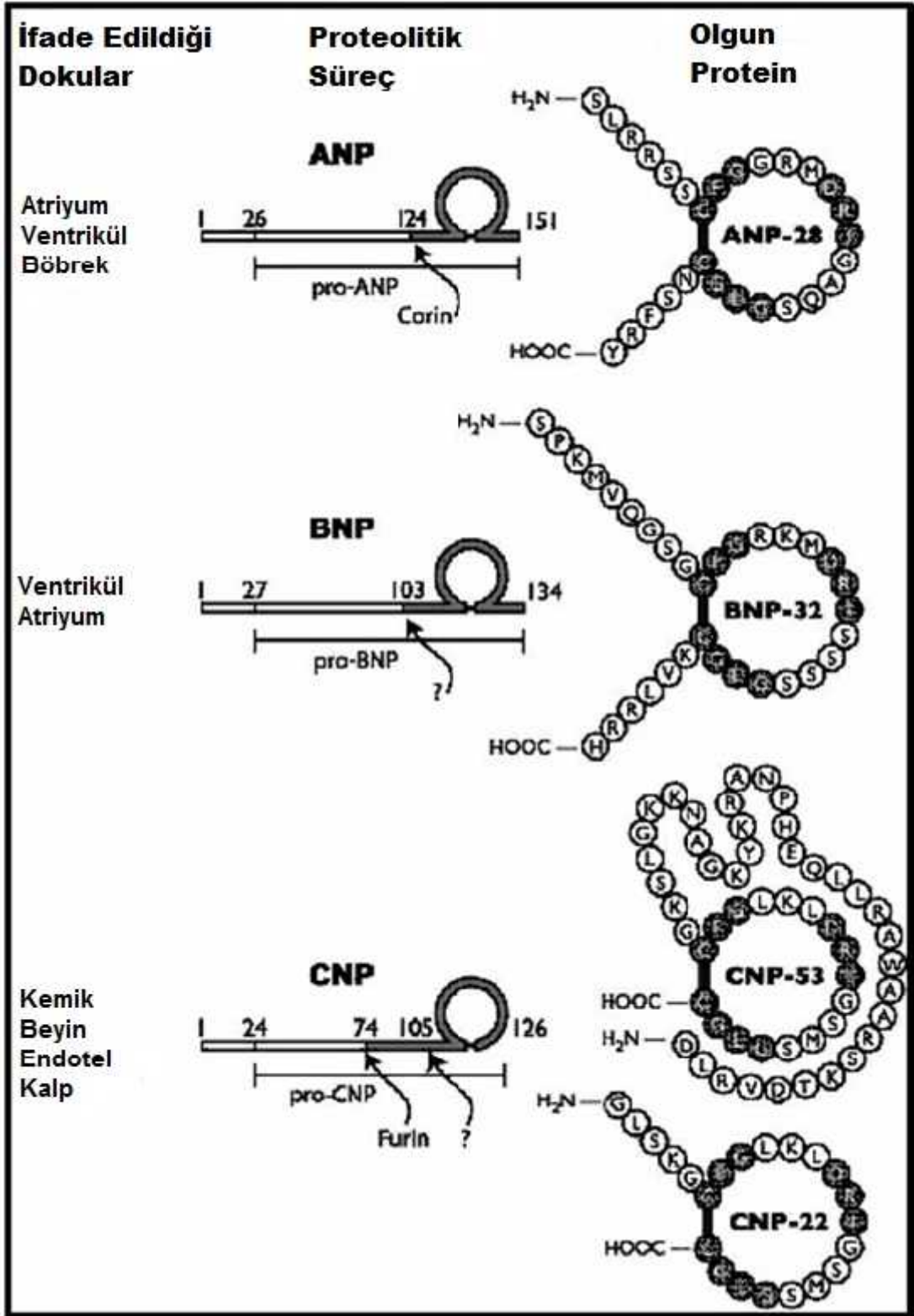
sonrasında atrial dokudan, hem natriüretik etkisi hem düz kas gev etme aktivitesi olan peptidler pürifiye edilmi ve de i ik çalı malarda bu peptit atrial natriüretik faktör, kardionatrin, kardiodilatin, atriopeptin ve atrial natriüretik peptit (ANP) olarak isimlendirilmi tir (12). Bu son tanımlama bugün en sık kullanılandır. lerleyen yıllarda natriüretik peptit ailesinin di er üyeleri olan beyin natriüretik peptit (BNP; B tipi natriüretik peptit) ve C tipi natriüretik peptit (CNP) de sırası ile domuz beyin ekstratlarından ve onların gev etebildi i düz kaslardan pürifiye edilmi lerdir (45).

Bütün natriüretik peptidiler prehormon olarak sentezlenir (ekil-7). nsan preproANP'si 151 aminoasit uzunlu undadır. Aminoterminal bölümü ayrılması sonucu olu an 126 aminoasitli proANP atrial granüllerde depolanan predominant formdur.

Natriüretik peptidler 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) (49).

ANP primer olarak atrial granüllerde depolanır ve eksprese edilir, fakat dü ük 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 davranı la çe itli hedef organlara ula ır. Ayrıca endotelin, angiotensin, arginin-vazopressin, ANP salınımını uyanan faktörlerdir. nsan ANP geni 1. kromozomun 1p36.2 lokusunda bulunur ve üç exon içerir.

B-tipi natriüretik peptid esas olarak domuz beyin ekstratlarından pürifiye edilmi tir. Sonradan insanlarda veya hayvanlarda konjestif kalp yetersizli i veya miyokardial enfarktüs gibi kardiyak stres altında iken çok yüksek konsantrasyonda kalp ventriküllerinde bulunmu tur. BNP bir kardiyak hormondur ve normal yeti kin kalbinde ventriküllerden sekrete edilmektedir (6, 15). BNP 134 aminoasitli preprohormon olarak sentezlenir. Sonra bir parça ayrılır ve 108 aminoasitli prohormon haline gelir. Ardından, bilinmeyen bir proteazla kesilmesi sonucu 76



ekil-3: Natriüretik peptid tipleri (49)

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 a ırı 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 çalışmada BNP seviyesinin yükselmesi ile kötü prognozun korele olduğunu göstermektedir.

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

Diğer taraftan sunduumuz çalışmamızın da önemli bir bölümünü oluşturan CNP pek çok farklı dokuda eksprese edilir. Bunlar arasında bağıncaları kıkırdak, kemik, beyin, endotel, düz kas ve kalp olarak sıralanabilir (49).

Tipik olarak sentezi sonrası paketlenmiş 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 i leme tabi tutularak olgun 53 aminoasitli peptide dönüşümü gösterilmiştir.

Bazı dokularda CNP-53 bugün için bilinmeyen bir enzim tarafından bölünerek aktif peptid olan CNP-22'ye dönüşür. 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 bazı fenotipler bunlardır (45):

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

Son dönemde natriüretik peptidlere benzerlik ile dikkat çeken iki farklı sinyal peptidi daha tanımlanmıştır. Bunlardan ilki ilk olarak kemikte bulunmuş ve osteocrin olarak adlandırılmıştır. Diğer peptid ise ilk olarak kas dokusunda bulunmuş ve musclin olarak adlandırılmıştır. Ancak bu iki peptid ile ilgili çalışmalar oldukça yenidir (45).

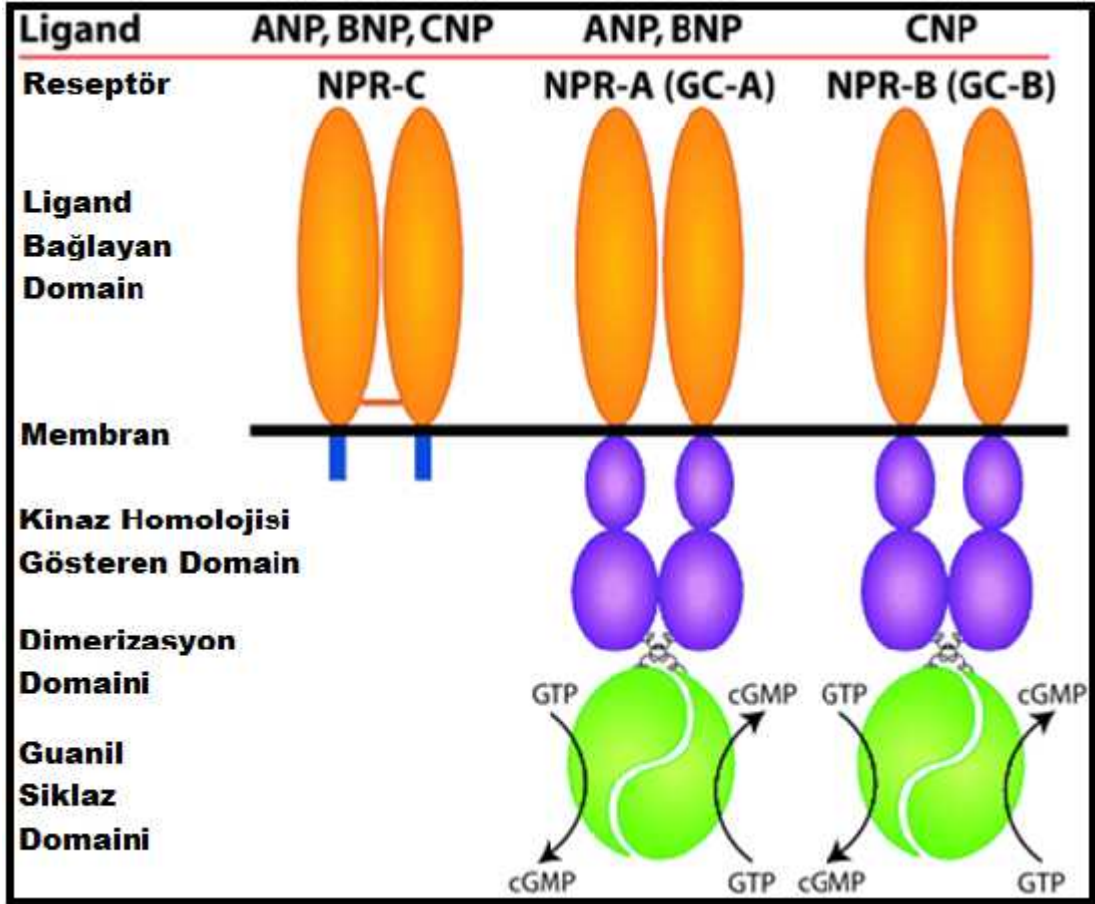
5.1.2. Natriüretik Peptid Reseptörleri

Natriüretik peptidlerin bilinen üç farklı reseptörü vardır (ekil-4). 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.

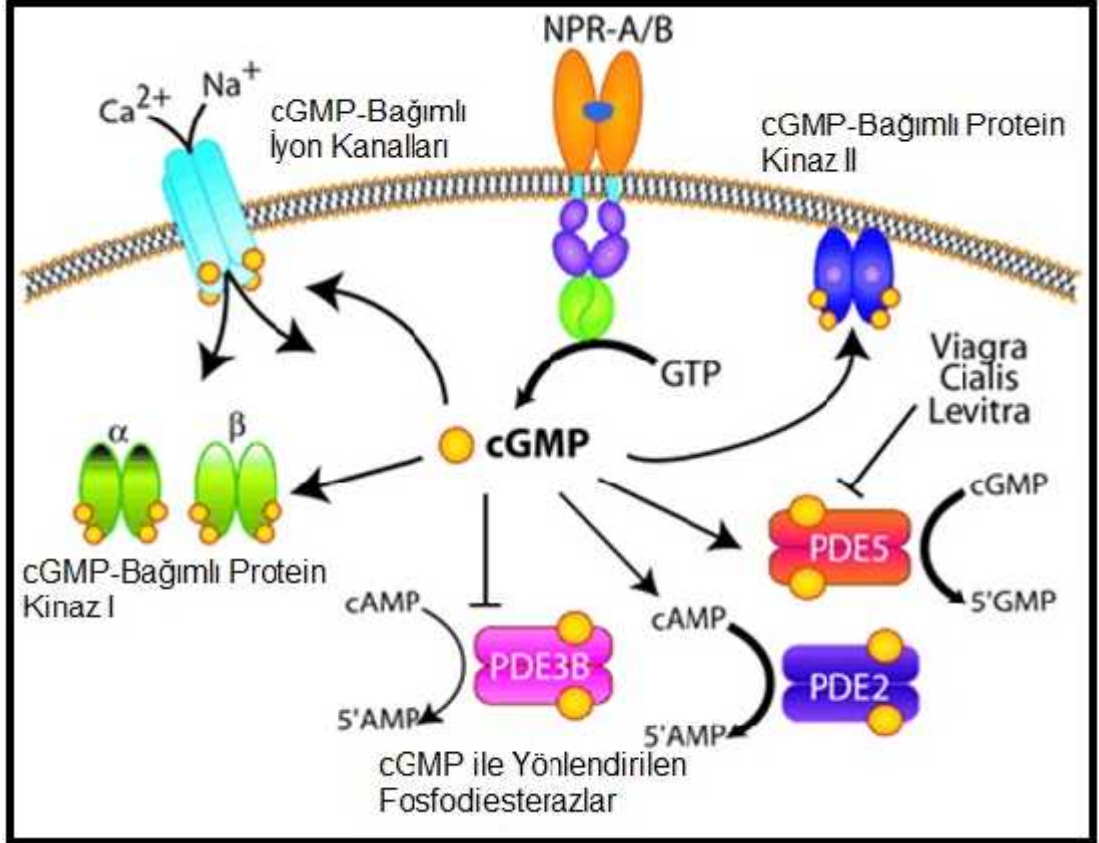
Natriüretik peptidlerin bilinen üç farklı reseptörü vardır. İlk ikisi [Natriüretik Peptid Reseptör-A (NPR-A, GC-A, NPR1) ve NPR-B (GC-B, NPR2)] transmembran guanil siklazlar olarak işlev görür ve uyarıldıklarında cGMP sentezini katalizlerler. Üçüncü reseptör (NPR-C, NPR3) ise hücre içi enzimatik aktiviteden yoksun olup, her üç NP'in lokal konsantrasyonunu ayarlayan bir rol üstlenir (49). 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 (ekil-5).

5.1.2.1 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



ekil-4: Natriüretik peptidlerin reseptörleri (49).



ekil-5: Natriüretik Peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri (49).

Natriüretik Peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri üç farklı cGMP ba layan protein grubu tarafından yönlendirilir. Bunlar: cGMP-ba ımlı protein kinazlar, cGMP ile yönlendirilen fosfodiesterazlar ve cGMP ba ımlı iyon kanallarıdır (49).

afinitesi sırası ile: ANP BNP>CNP eklindedir.

5.1.2.2. 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 CNP>BNP eklindedir.

5.1.2.3. Natriüretik peptid reseptör B

NPR-B'nin beyin, adrenal gland, uterus gibi birbirinden farklı pek çok dokuda varlığı gösterilmiştir (53). Ancak mevcut literatür bilgileri bu proteinin ana görevinin iskelet sistemi gelişimi ile ilgili olduğunu düşündürmektedir (5). AMDM'li hastalarda da iskelet sistemi bulgularına eşlik eden nörolojik defektler ve bozukluklar veya anormal kan basıncı düzeyleri gibi problemlerin görülmemesi olması bu düşünceyi desteklemektedir.

NPR-B'nin natriüretik peptidlere afinitesi sırası ile: CNP>> ANP BNP eklindedir. 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 çalışmalar bize bu konuda fikir tutmaktadır. Fare modelinde yapılmış çalışmalar CNP'den yoksun farelerde dwarfizm (9), genomlarına CNP transferi yapılmış ve bu proteini normalden daha fazla üreten farelerde ise uzun kemiklerde boy uzaması gerçekleştirilmiştir (9, 66) göstermiştir.

Fare ve sıçan tibiaları kullanılarak yapılmış organ kültürlerinde ise CNP'nin kondrosit proliferasyonunu ve hipertrofisini arttırdığı gösterilmiştir (38, 64). Yine

son dönemde yayınlanan bir çalı mada CNP'nin matriks sentezini arttırarak FGFR-3 mutasyonlu akondroplazik farelerde dwarfizmi engelledi i gösterilmi tir (66). CNP, NPR familyasından NPR-B'nin yanı sıra NPR-A ve/veya NPR-C'ye de ba lanabilmekte ve bu reseptörlerden özellikle NPR-C'de epifiz büyüme pla nda eksprese edilmektedir (5).

Di er taraftan Linkoln ve Cornwell (34) NPR-B'nin CNP ile aktivasyonu sonrası cGMP ile etkile ti ini ve cGMP ba ımlı protein kinazları aktive etti ini göstermi lerdir. Bu ba lamda farklı amaçla hazırlanmı bir cGKII (insanlarda *PRKG2* genine kar ılıklı gelmektedir) defektli fare modelinde dwarfizm gözlenmi olması da anlamlı bir bilgidir (48). cGKII knock-out farelerde epifiz pla ı terminal hipertrofi bölgesinde henüz de i imlerini tamamlayamamı kondrositlerin bir yı ılım olu turdukları gösterilmi tir (48). Ancak CNP knock-out farelerde aynı bulgunun bulunmayı ı ise NPR-B'nin endokondral büyüme yi hem cGKII ba ımlı hem de cGKII ba ımsız sinyal yollarının tümünü kullanarak regüle etti ini dü ündürmektedir (39).

Son olarak, NPR-B proteini fonksiyonel haploetersizli i (haploinsufficiency), ki bu durum AMDM gözlenen hastaların ta ıyıcı anne ya da babalarında görölmektedir, normale göre dwarfizm düzeyinde olmayan boy kısalı ı ile karakterizedir (5).

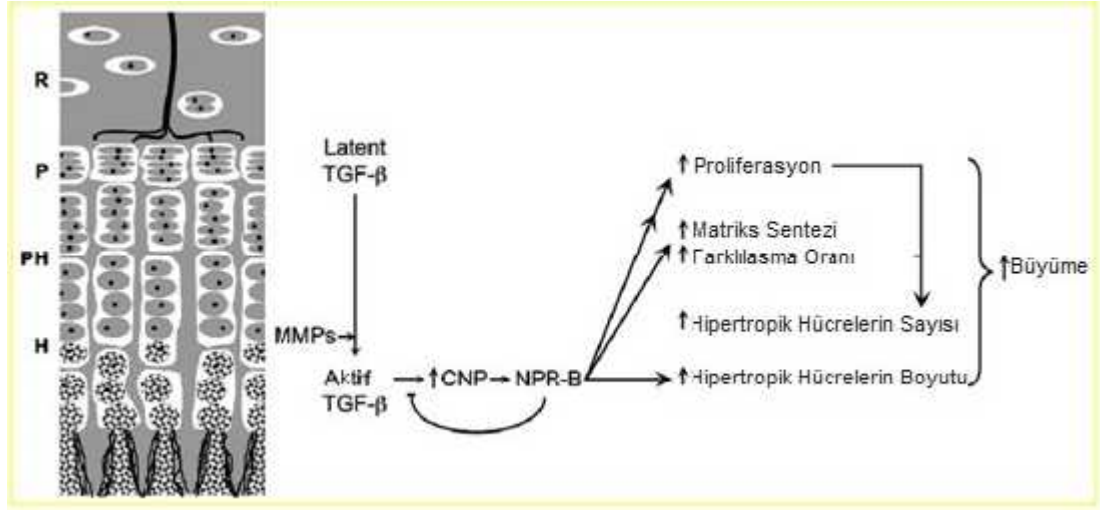
Tüm bu bilgiler ı ı nda NPR-B'nin endokondral büyüme üzerine olan etkilerinin ve hücre dı ı sinyallerin bu büyümenin hangi evresinde ve hangi mekanizmalar ile hücre içine ta ınarak ne gibi de i ikliklere yol açtı mının belirlenmesi büyük önem ta ımaktadır. Bu ara tırmadan elde edilecek yeni bilgiler oldukça kompleks bir regülasyonu olan endokondral büyüme biyolojisinde yeni yakla ımların yapılabilmesini sa layacak niteliktedir.

6. HİPOTEZ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Önceki çalışmalarda, insan trabeküler kemik kökenli MKH'lerinin gerek CNP'yi gerekse bu ligantın reseptörü olan NPR-B'yi endojen olarak ekspres ettiğini gösterilmiştir. CNP ile zenginleştirilmiş kondrojenik gelişim ortamlarında MKH'lerden gelişen kıkırdak dokusunda gerek glikozaminoglikan sentezi gerekse matürasyon ve hipertrofi yönünden artış gösterilmiştir. Dolayısıyla MKH'lerin CNP sekresyon yetileri, bu hücreleri bahsi geçen iskelet sistemi displazilerinde kullanılabilecek olası bir tedavi yöntemi olarak gündeme getirebilir.

Hipotezimizi test etmek için sıçan gelişim modeli kullanılmıştır. Önce normal sıçan gelişim parametreleri 14 haftalık süreçte takip ve analiz edilmiştir.

Ardından 7 günlük sıçanlardan dişekte edilen tibialar organ kültürlerinde 21 gün süre izlenerek CNP'nin bu kemiklerin boyuna büyümesi üzerine olan direkt etkileri ile MKH'lerden salındığı düşünülen CNP'nin etkileri karşılaştırılmıştır.



ekil 6: Hipotezimiz için Kabul Edilen Çalışma Modeli (45).

Potter LR et al., Endocrine Reviews, February 2006, 27(1):47-72; Olney RC, Growth Hormone and IGF Research 2006, 16: S6-S14; Alan T and Tufan AC, Journal of Cellular Biochemistry 2008, 105: 227-235; Tezcan B et al, Journal of Molecular Histology 2010, 41: 247-258; Kocamaz E et al, Journal of Molecular Histology 2012, 43: 497-508'den çalışmamız için adapte edilmiştir. (3, 31, 45, 49, 55)

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalı ma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 23.02.2011 tarihinde PAUHDEK-2011/009 numarasıyla ara tırma projesi olarak onay almı tır.

1. Trabeküler Kemik Kökenli Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerinin zolasyonu ve Kültüre Edilmesi

DeneySEL çalı ma, mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi için 5 adet erkek sıçanla yapılmı tır. Sıçanların tamamı çalı ma sürecinde oda ısısında (23°C), %60 nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan laboratuvar ko ullarında takip edilmi ve sıçanların istedikleri kadar yem ve suya eri meleri sa lanmı tır.

1.1. DeneySEL Uygulama

Bu deneyde kullanılan bütün kimyasallar Sigma Kimyasallarından (St. Lois. MO) temin edilmi tir. Erkek olan 5 adet sıçan sakrifiye edildikten sonra sıçanların femur medullasından alınan trabeküler kemik parçaları antibiyotik (250 µl penisilin – streptomisin) ve 50 ml DMEM içeren santrifüj tüplerine alınmı tır.

DMEM ile 4-5 yıkama sonrasında 50 ml DMEM, 250 µl penisilin-streptomisin, 0.5 ml esansiyel aminoasit ve 0.045 gr kollajenaz (Worthington, Lakewood, NJ, A.B.D) 20 µm çapında filtrelerden (Falcon, Franklin NJ, A.B.D) geçirilerek hazırlanmı tır. Kemik yüzeyi hücreSEL materyalden temizleninceye kadar 37 °C’de, %5 CO₂’li ve nemli inkübatörde 3-4 saat süre ile bekletilmı tir.

Kemik parçaları 4-5 kez %0.9’luk sodyum klorür ile yıkanmı tır. Enzimatik yıkımın durdurulması için %10 fetal bovine serum (FBS) (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA, A.B.D) kullanıldı. 0.5 ml glutamin, 0.5 ml esansiyel aminoasit, 250 µl penisilin-streptomisin ile 45 ml DMEM içeren tam besiyeri hazırlanmı tır.

Kemik parçaları tam besiyeri içeren kültür plakalarına ekilmı tir. Her 3-4 günde bir besiyeri taze hazırlanmı besiyeriyle de i tirilmı , hücrelerin trabeküler kemik fragmentlerinden migrasyonları ve ardından ço almalarına bakılmı tır. Kültür

plakalarında hücreler %80'lik bir yoğunlukta eritiğinde %0.25'lik tripsin içeren EDTA solüsyonu kullanılarak kültür plakların tabanına yapışmış olan hücrelerin kalkması sağlanmıştır.

1.2. Trabeküler Kemik Kökenli Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

MKH'in temel özelliklerinden birisi de kondrojenik, adipojenik ve osteojenik yönde de i im gösterebilme özelliğidir. Bunu gösterebilmek için aşağıda anlatıldığı gibi uygun besiyerleri ve boyalar kullanılmıştır.

1.2.1. Osteojenik Ve Adipojenik Tek Tabaka Kültürlerin Farklılaşması

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 ekilmektedir. Yoğun tek tabaka kültürlerin osteojenik farklılaşması osteojenik uyarıcı ile yapılırken, adipojenik farklılaşma adipojenik uyarıcı kullanılarak aktive edilmiştir. Osteojenik ve adipojenik uyaranlar ilave edilmeyerek kontrol grupları oluşturulmuştur. Osteojenik uyarı 3 hafta, adipojenik uyarı 2 hafta uygulanmıştır. Kültürler %95 hava ve %5'lik karbondioksit basıncında, 37°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Her 3 günde bir mediumlar değiştirilmiştir.

1.2.1.2. Oil Red O Boyama Solüsyonu

100 ml izopropanol içine 0.5 gr Oil Red O boyası (Zymed) eklenmiştir. 4 saat cam üzerinde karıştırılmıştır. Kurutma Kağıdı kullanılarak boyanın filtre edilmesi sağlanmıştır.

1.2.1.3. Fiksatif Solüsyonu Hazırlama

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

1) Medyum tamamen kaldırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır.

- 2) Hücre yüzeyinin kurudu undan emin olduktan sonra %10'luk formaldehit kullanılarak hücreler fiske edilmi tir. 30 dakika beklenmi tir.
- 3) Fikse edilmi tir hücreler 1-2 kez PBS ile yıkanmı tir.
- 4) Tamamen hücrelerin kuru olması hücre yüzeyinde partikül olu maması için gerekli görülmü tür.
- 5) Hazırlanan Oil Red O boyama solüsyonu ile hücreler 1 saat inkübe edilmi tir.
- 6) Boyama solüsyonu hücrelerin üzerinden alınıp PBS ile 1-2 kez yıkama yapılmı tir.
- 7) Hematoksilen Eosin ile hücreler zıt boyanmı ve distile su ile boyanın yıkanması gerçekte tirilmi tir.
- 8) Adipojenik hücreler mikroskop altında görüntülenmi tir.
- 9) Adipojenik kültür PBS içinde saklanmı tir.

1.2.1.4. Osteojenik De i imin Alizarin Red S Boyanması ile Hücre Analizi

- 1) Medyum plakalarından kaldırıldıktan sonra PBS ile 1 kez yıkanmı tir.
- 2) Hücreler %4'lük formaldehit solüsyonu ile 30 dakika fiske edilmi tir.
- 3) Fiksasyondan sonra 2 kez distile suyla yıkama yapıldıktan sonra %2 Alizarin Red S (Zymed) boyama solüsyonuna (PH4.2) 2-3 dakika maruz bırakılmı tir.
- 4) Alizarin Red S boyası 3 kez distile su ile yıkanmı tir.
- 5) Hematoksilen Eosin ile zıt boyama yapılmı ve distile su ile boyanın yıkanması gerçekte tirilmi tir.
- 6) Osteojenik hücreler 1 ık mikroskobu altında görüntülenmi tir.
- 7) Osteojenik kültür PBS içinde saklanmı tir.

1.3.Yüksek Yo unlukta Pellet Kültürlerin Kondrojenik Farklıla ması

Kondrojenik farklıla ma için kondrojenik farklıla ma besiyeri hazırlanmı tir. Alikuatlanan hücreler 0.5 ml mediumda 15 ml polyprolen tüplerde 5 dakika 500 q'de santrifüjlenerek pellet kültürler olu turulmu tur. Kondrojenik farklıla ma 10 ng/ml transforming growth factor- 1 (TGF- 1) ilavesi ile uyarılmı tir. C-Tipi Natriüretik Peptid (CNP) 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M konsantrasyonunda hazırlanarak, TGF- 1 ilavesi

ile uyarılmı gruplara ilave edilmı tır. Kültürler %95 hava ve %5'lik karbondioksit basıncında, 37°C'de inkübasyona bırakılmı lardır. Her 3 günde bir mediumlar de i tirilmı tır.

1.3.1. Kondrojenik De i imin Alcian Mavisi Boyanması ile Hücre Analizi

Tek tabaka kültürlerin idamesi sürecinde, 5-10-15 ve 20. günlerde seçilen kültürler besiyerinden arındırılıp, PBS ile yıkanmı tır. Ardından 30 dakika oda sıcaklı ında %10'luk paraformaldehid ile fiske edilen kültürler tekrar PBS ile yıkanmı tır. Fiksasyonları tamamlanan kültürler bir gece boyunca, oda sıcaklı ında, PH'ı 1.0 olan (37) Alcian mavisi (Sigma) boyası ile boyanmı , kültürler PBS ile yıkama sonrası rutin histolojik takip; alkolden geçirme (sırasıyla, %70, %80, %95, %100) ksilen, parafine gömme ve bloklama i lemlerine tabi tutulmu lardır. Boyama için 10 µm'lik kesitler alınmı tır. Dokular bir gece etüvde bekletildikten sonra yarım saat ksilene maruz bırakılmı tır. Ardından sırasıyla 10 dakika deparafinizasyon (%100, %95, %80, %70'lik alkol) 5 dakika su ile yıkama en az 1 gün alcian mavisi boyama-yıkama-kurutma ve kanada balzamu ile kapatma i lemleri dokulara uygulanmı tır.

1.4. Akım Sitometri Analizi

Bu analiz, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Ara tırma ve Uygulama Merkezinde yapılmı tır. 3. Pasaj (P3) a amasndaki hücreler besiyeri içerisindeki 1×10^6 hücre/ml yo unlukta süspansiyon haline getirilmı tır. Akım sitometri analizi, FACS Calibur (BD Biosciences, San Diego, USA) cihazı kullanılarak gerçekle tirilmı tır. Sonuçların analizi, Cell Quest (BD Biosciences) yazılım programı ile l hücreler dı lanarak gerçekle tirilmı tır.

Sıçan kemik kökenli mezenkimal kök hücrelerin immün fenotiplendirmesi u antikorlarla gerçekle tirilmı tır.

CD29 (ntegrin- 1 zinciri; FITC)

CD45 (Protein tirozin fosfotaz, reseptör tipi, C/PTPRC/lökosit) genel antigeni/ hematopoetik köken için hücre belirteci; FITC)

CD54 (ICAM-1; PE)

CD90 (Thy-1/Thy-1; FITC)

MHC class II (Temel doku uygunlu u kompleksi, hücre yüzey reseptörü; FITC)

2. Tek Tabaka Kültürlerde CNP ve NPR-B Varlı ının Gösterilmesi

zole edilen mezenkimal kök hücrelerde CNP ve NPR-B'nin protein düzeyinde varlı ının gösterilmesi için immünohistokimyasal analizi yapılmı tır. Uygulanan protokol sırası a a ıdaki gibidir.

- a) İlk önce kültürler PBS ile yıkama sonrasında %10 so uk metanolle buzdolabında +4°C'de 10 dakika fikse edilmi tir.
- b) Daha sonra metanolün uzakla tırılmasından sonra açık havada kurutulmu tur.
- c) PBS ile tekrar yıkanan hücrelerdeki endogen peroksidaz aktivitesi %30'luk H₂O₂: Metanol (1:9) karı mı ile 20 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırılmı tır.
- d) PBS ile yıkanan hücreler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklı ında bekletilmı tir.
- e) Hücreler üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece over night yapıldı. Bu çalı mada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları dilasyonlar u ekildedir. CNP 1:50, NPR-B 1:50 oranında PBS ile dilue edilmi tir.
- f) Hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmi afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edilmi tir.
- g) Tekrar PBS ile yıkaması yapılan hücrelere, biotinlenmi sekonder antikorlara kolayca ba lanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptovidin (HRP-SA) 20 dakika kadar muamele edilmi tir.
- h) Hücreler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 60 dakika kadar muamele edilmi tir.
- i) Antigenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için hücrelere hematoksilin (Merk Harris' hematoksilin) ile zıt boyama yapılmı tır.

CNP (H-115) ve NPR-B (H-80) tav an poliklonal antikorları Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) firmasından temin edildi. Her iki protein için de pozitif kontrol, primer antikor basamağı atlanarak gerçekleştirilmiştir.

3. Sıçanların Büyüme Parametreleri ve Kemik Boy Uzunlukları Ölçümü

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Birimi bünyesinde yetiştirilen Wistar Albino tipi sıçanlardan doğumlarını takip eden 3. haftadan başlamak üzere 14. haftaya kadar her doğum haftasında 3 dişi, 3 erkek olmak üzere büyüme parametreleri olarak kabul edilen sırasıyla biparietal (BP) uzunluk, nazo-okspital (NO) uzunluk, Nazo-anal (NO) uzunluk, nazo-kuyruk (tail) uzunluk ölçümleri, vücut ağırlığı ölçümleri ve alt, üst ekstremitelerdeki kemik boyu ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Alt ekstremitelerdeki kemik olarak femur ve tibia uzunluğu, üst ekstremitelerdeki kemik olarak humerus ve ön kol uzunluğu ölçülmüştür.

3.1. Histolojik İnceleme Amacı

Sakrifikasyon sonrası üzerlerindeki yumuşak dokulardan arındırılmış sıçan femurları ve tibia'ları fiksasyon sonrası %10 formaldehit solüsyonunda bekletilmiştir. Ardından materyalleri dekalsifiye etmek için %8'lik formik asit stok solüsyonu + %8'lik hidroklorik asit solüsyonu eşit oranda karıştırılmıştır. Kemik dokudaki kalsiyum uzaklaştırmaya kadar solüsyonda bekletilmiştir. Materyaller su ile yıkanmıştır. Materyallerin büyüme plaklarını içine alan, uzun eksene paralel kesitler olacak şekilde makroskopik kesitler alınmıştır. Kesitler alındıktan sonra takip amasına geçilmiştir. %70, %80, %90, %100'lük alkol serilerinde 1'er saat tutulmuştur. Ardından 2 saat ksilen solüsyonunda, 2 saat sıvı parafinde bekletilmiştir. Bloklama işleminden sonra 5 µ kalınlığında kesitler alınmıştır. 1 saat etüvde, 1 saat ksilende bekletildikten sonra %100, %90, %80, %70 alkol serilerinde toplam 15 dakika bekletilmiştir. Su ile yıkanmıştır. Hematoksilen boyasında 3 dakika bekletildikten sonra su ile yıkanmıştır. %1'lik asit alkol solüsyonuna batırılıp çıkartılmıştır. Tekrar su ile yıkanmıştır. Amonyaklı suya (%1'lik) batırılıp çıkartılmıştır. Tekrar su ile yıkanmıştır. Eosinde 30 sn bekletilmiştir. Su ile yıkanma sonrasında %70, %80, %90, %100'lik alkol serilerinde 10-15 dakika tutulduktan

sonra ksilende 10 dk bekletilmi tir. Entellan ile kapatma i lemi gerçekte tirilmi tir. Preperatlar mikroskobik olarak incelemeye hazır hale getirilmi tir.

3.2. mmünohistokimyasal Boyama

Femur ve Tibia kemikleri histolojik takipten geçirildikten sonra hazırlanan parafin kesitler üzerinde CNP ifadesi HK yöntem ile incelenmi tir. Doku takip yöntemi tamamlanan femur ve tibia bloklarından mikrotom cihazıyla 5 µm'lik kesitler alınıp, kesitler benmariya bırakılmı tır. Ardından uygulanan protokol sırası a a ıdaki gibidir (Reaktifler için Histostain-Plus kit kullanılmı tır).

- a) Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam ta ıma sepetine yerle tirilmi tir.
- b) Lam ta ıma sepeti etüvde 60⁰C'de 1 saat bekletilmi tir.
- c) Ksilende, deparafinizasyon i lemi için 1 saat bekletilmi tir.
- d) Kesitler sırasıyla %100, %96, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2' er dakika bekletilmi tir.
- e) Alkolden çıkan preparatlar akarsuda yıkanarak 10 dakika PBS'de bırakılmı tır. Bu a amada kesitler PAP pen kullanılarak i aretlenmi tir.
- f) Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, %30'luk H₂O₂:Metanol (1:9) karı ımı ile 20 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırılmı tır.
- g) PBS ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklı ında bekletilmi tir.
- h) Kesitler üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece over night yapıldı. Bu çalı mada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları dilüsyonlar u ekildedir: CNP 1:50, NPR-B 1:50 oranında PBS ile dilue edilmi tir.
- i) Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmi afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edilmi tir.
- j) Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmi -sekonder antikorlara kolayca ba lanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 20 dakika kadar muamele edilmi tir.

- k) Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3-10 dakika kadar muamele edilmi tir.
- l) Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilen (Merk Harris' hematoksilen) ile zıt boyama yapılmı tir.
- m) Dokuların üzeri entellan ile kapatılmı tir.

4. Serum NT- proCNP Düzeylerinin Ölçümü

Wistar Albino tipi sıçanların kan örnekleri, 3. haftadan ba layarak 14. haftaya kadar intravenöz yol kullanılarak toplanmı tir. Uygulanan protokol sırası a a ıdaki gibidir.

- a) Alınan kan örnekleri hemolize olmamasına özen gösterilerek, Falcon tüplere konulmu tur.
- b) 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmı tir. Pellet kısmı atılmı süpernatant kısmı pipetle çekilmi ve eppendorf tüplere konmu tur.
- c) Örnekler 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmi tir.
- d) Örneklerin pellet kısmı atılmı , süpernatant kısmı pipetle çekilerek -80 °C'ye konulmu lardır.
- e) Daha sonra toplanan serumlar 37°C'de çözülmeye bırakılmı , EL SA yöntemiyle (NT-proCNP-Kit, Biomedica, Wien-Austria) NT-proCNP düzeyleri ölçülmü tür.

5. Sıçan Tibia Organ Kültürü

Do umu takiben 1 haftalık geli imini tamamlayan altı adet sıçan sakrifiye edilmi tir. Daha sonra tibia kemikleri yumu ak dokulardan özenli bir ekilde ayrılmı tir. Tibia kemikleri Kontrol, MSC ve CNP olmak üzere 3 gruba ayrılmı tir.

Gruplar:

- 1- Kontrol: Tibialar serumsuz DMEM içinde,
- 2- MSC grubu: Kültür plakları tabanı doygunlu a ula mı MKH ile kaplı ve üzerindeki tibialar serumsuz DMEM içerisinde, (MKH lerin CNP salgısı ile besi yerinin zenginle ip içerisinde büyüyen kemiklere pozitif etki edece i öngörülmektedir.)

3- CNP grubu: Tibialar serumsuz ancak 10^{-7} M konsantrasyonda CNP ilave edilmi DMEM içerisine bırakılmı tır.

Her üç gruptaki platelerin içindeki besiyerleri gna ırı alacak ekilde de i tirilmi tir. 21 günün sonunda tibia kemikleri dekalsifiye edilmi ve histolojik takipten geçirilerek kesitler alınmı tır. Preperatlar mikroskopik olarak incelemeye hazır hale getirilmi tir.

statiksel Analiz

Bu alı mada elde edilen sonuçlar bir n veri çalı masının sonuçları olarak de erlendirilmi olup, istatiksel anlamlı sonuç elde edebilmek için denek sayısının bu çalı madakinden çok artırılması gerekti i istatiksel g analizi ile tespit edilmi tir.

BULGULAR

1. Büyüme Parametreleri

Sıçanların vücut a ırlıkları 3-14. haftalar arası tartılmı ve ortalamaları alınarak gösterilmi tir. Vücut a ırlıkları 12. haftaya kadar kademeli olarak artı göstermi , 13. haftadan itibaren plato düzeyine ula ıldı ı izlenmi tir (ekil 7).

Sıçanların biparietal (BP), nazo-oksipital (NO), ve nazokuyruk (NK) uzunlukları 3-14. haftalar arası ölçülmü ve ortalamaları alınarak gösterilmi tir. Biparietal (BP), nazo-oksipital (NO), ve nazokuyruk (NK) uzunlukları 12. haftaya kadar kademeli olarak artı göstermi , 13. haftadan itibaren plato düzeyine ula ıldı ı izlenmi tir (ekil 8).

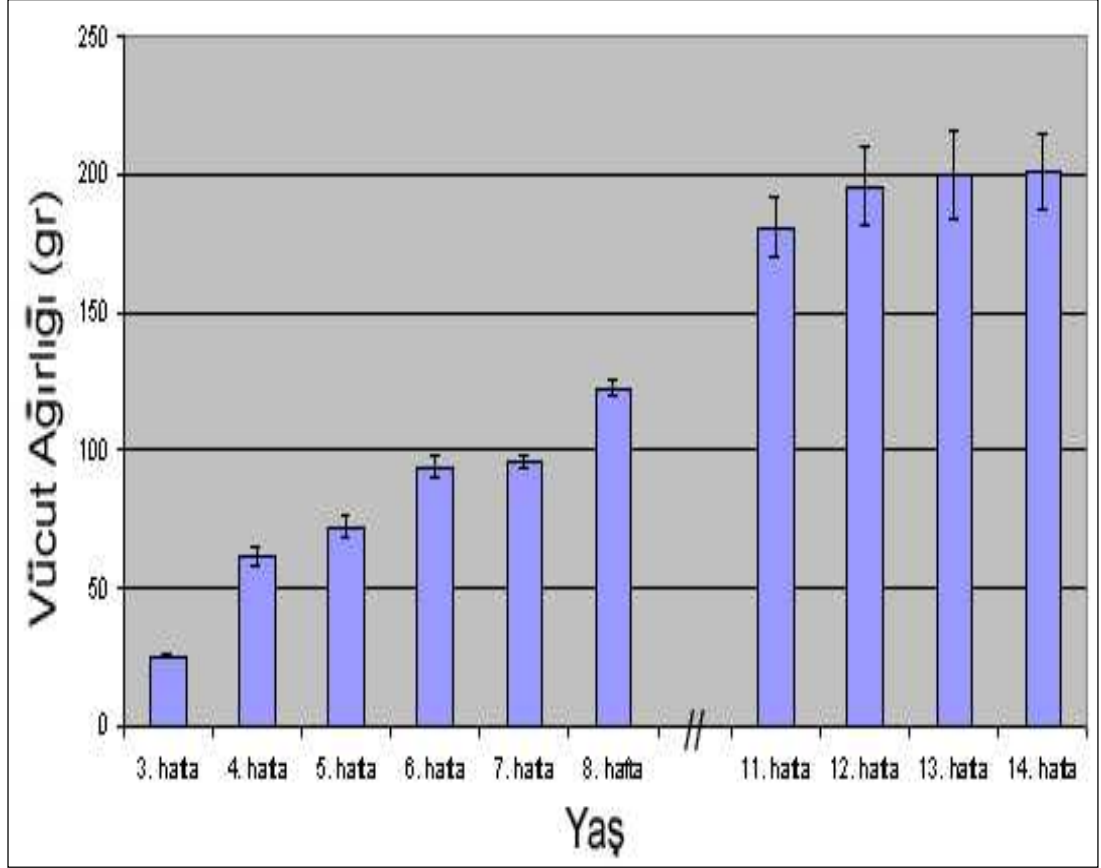
Sıçanların femur, tibia, humerus ve ön kol uzunlukları 3-14. haftalar arası ölçülmü ve ortalamaları alınarak gösterilmi tir Femur, tibia, humerus ve ön kol uzunlukları 12. haftaya kadar kademeli olarak artı göstermi , 13. haftadan itibaren plato düzeyine ula ıldı ı izlenmi tir (ekil 9).

2. Sıçanların Geli im Sürecinde Femur Epifiz Büyüme Pla ında Gözlenen Histolojik De i iklikler

3 haftalık sıçanın epifiz büyüme pla ı rezerve kıkırdak, proliferasyon, maturasyon-hipertrofi ve kemikle me bölgesinden olu mu tur. 3. haftada sıçanın epifiz pla ının kalın yapıda oldu u ve açıklık miktarının fazla oldu u görülmü tür (ekil10- A).

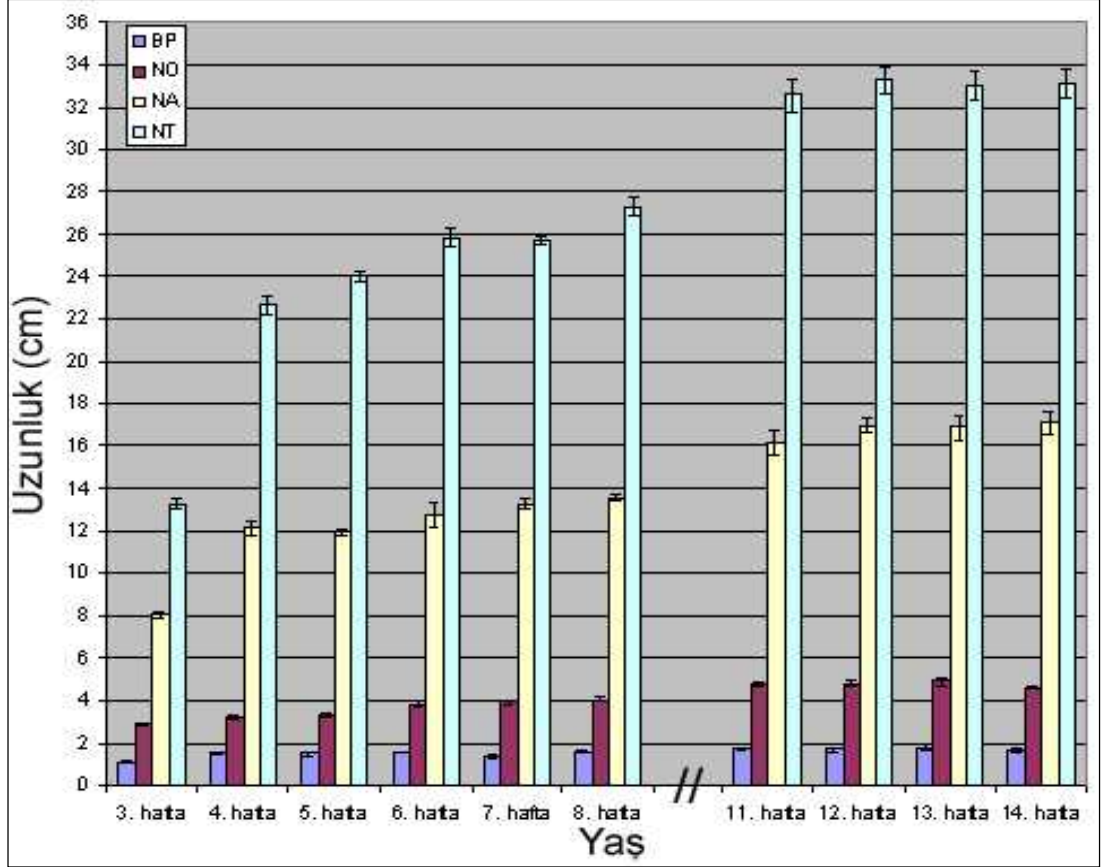
5. ve 8. haftalarda epifiz büyüme pla ı kademeli olarak incelmeye ba lamı tir (ekil10- B ve C).

12. haftada epifiz büyüme pla ı oldukça incelmi tir (ekil10- D) ve 14. haftada epifiz büyüme pla ının kemikle ti i görülmü tür.



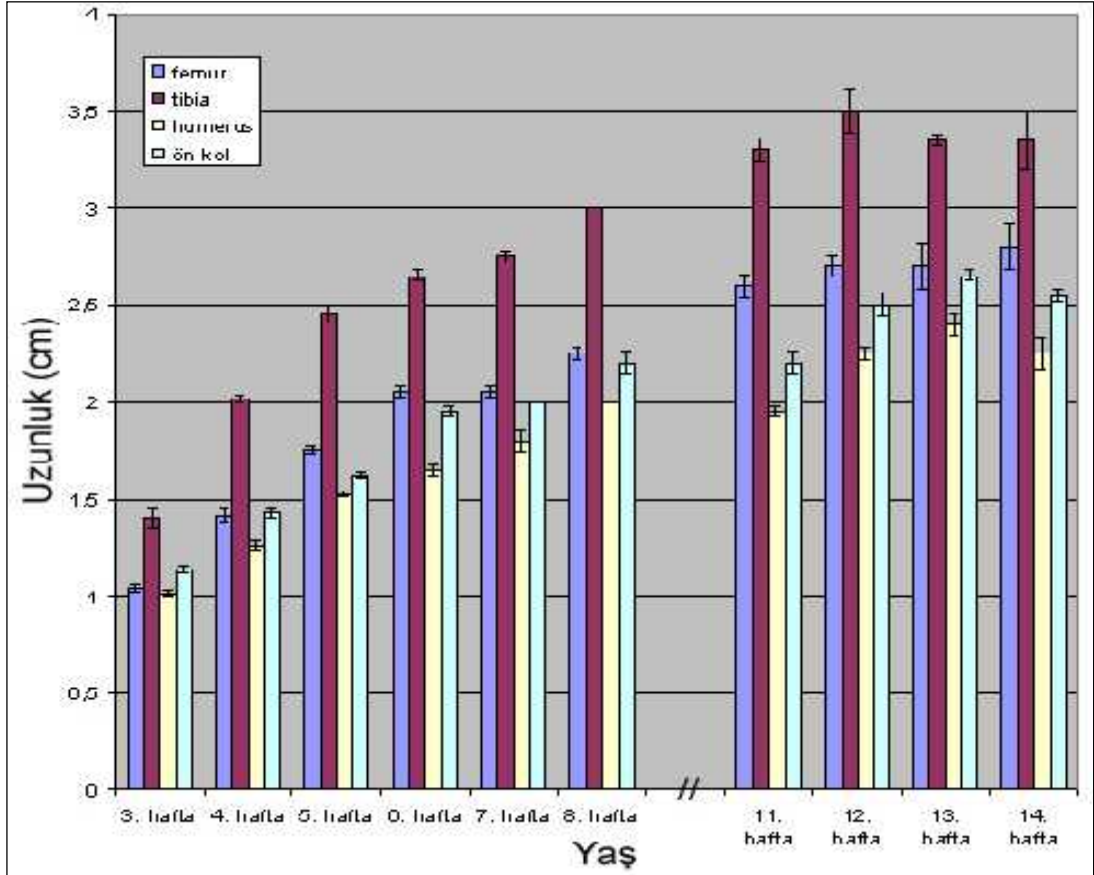
ekil 7: Sıçanların 3-14.hafta arasındaki vücut a ırlıkları ölçümü.

Sıçanların vücut a ırlı ının 12. haftaya kadar kademeli olarak artı gösterdi ini 13. haftadan itibaren plato düzeyine ula ıldı ı görülmü tür.



ekil 8: Sıçanların 3-14. hafta arasındaki biparietal (BP), nazo-oksipital (NO) ve nazokuyruk (NK) uzunlukları.

Sıçanların biparietal (BP), nazo-oksipital (NO) ve nazokuyruk (NK) uzunluklarının 12. haftaya kadar kademeli olarak artı gösterdi ini 13. haftadan itibaren plato düzeyine ula ıldı ı görülmü tür.



ekil 9: Sıçanların 3-14. hafta arasındaki alt ve üst ekstremité ölçümleri.

Sıçanların femur, tibia, humerus ve ön kol uzunluklarının 12. haftaya kadar kademeli olarak artı gösterdi ini 13. haftadan itibaren plato düzeyine ula ıldı ı görülmü tür.

3. Serum NT- proCNP düzeylerinin ölçümü.

Epifiz büyüme plaklarının en kalın oldu u 3. haftada serum NT-proCNP düzeyinin oldukça yüksek (56.75 ± 1.428 pmol/l) düzeyde oldu unu, ya arttıkça ve epifiz plakları kapandıkça (süreç daha fazla kemikle me yönüne do ru kaydıkça ve kemik boyu uzadıkça) serum NT-proCNP düzeylerinin kademeli olarak azaldı ı ve 14. hafta civarında eri kin düzeylerine (4.25 ± 0.407 pmol/l) dü tü ü gösterilmi tir (ekil11). Eri kin sıçanlarda serum NT-proCNP düzeyi (4.1 ± 0.958 pmol/l) olarak bulunmu tur.

4. Trabeküler Kemik Kökenli Sıçan MKH'lerin zolasyonu

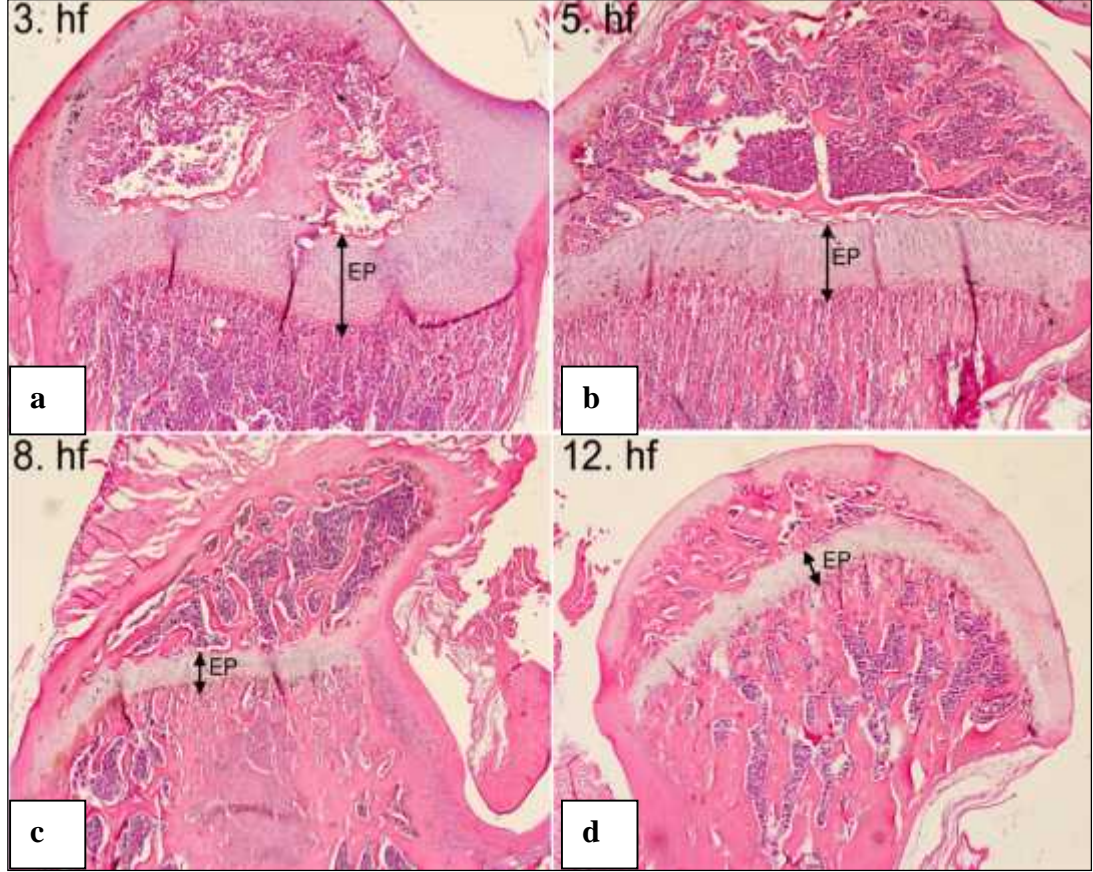
5 adet sıçan femurundan alınan trabeküler kemik parçaları enzimatik yıkımdan sonra 100 mm lik petri plaklarına ekildi. Üzerine besiyeri ilave edilmi tir. 7. günde mezenkimal kök hücreleri petri kabında mikroskopik olarak görülmeye ba lamı tir. 10. günde migrasyon ve proliferasyon ile petri kabında sayıca ço aldıkları görülmü tür (ekil12-A). 2. haftada sayılarının arttı ı (ekil12-B) ve 3. hafta sonunda da petri kabının tamamen kök hücrelerle doldu u görülmü tür (ekil12-C).

4.1. Trabeküler Kemik Kökenli Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Bu hücrelerin mezenkimal kök hücreler oldu unu kanıtlamak için hücrelerin de i im potansiyelleri gösterilmi tir. Mezenkimal kök hücrelerin 3 ana özelli i; ya dokuya dönü ebilmeleri, kemik dokuya dönü ebilmeleri ve kıkırdak dokuya dönü ebilmeleri gösterilmi tir.

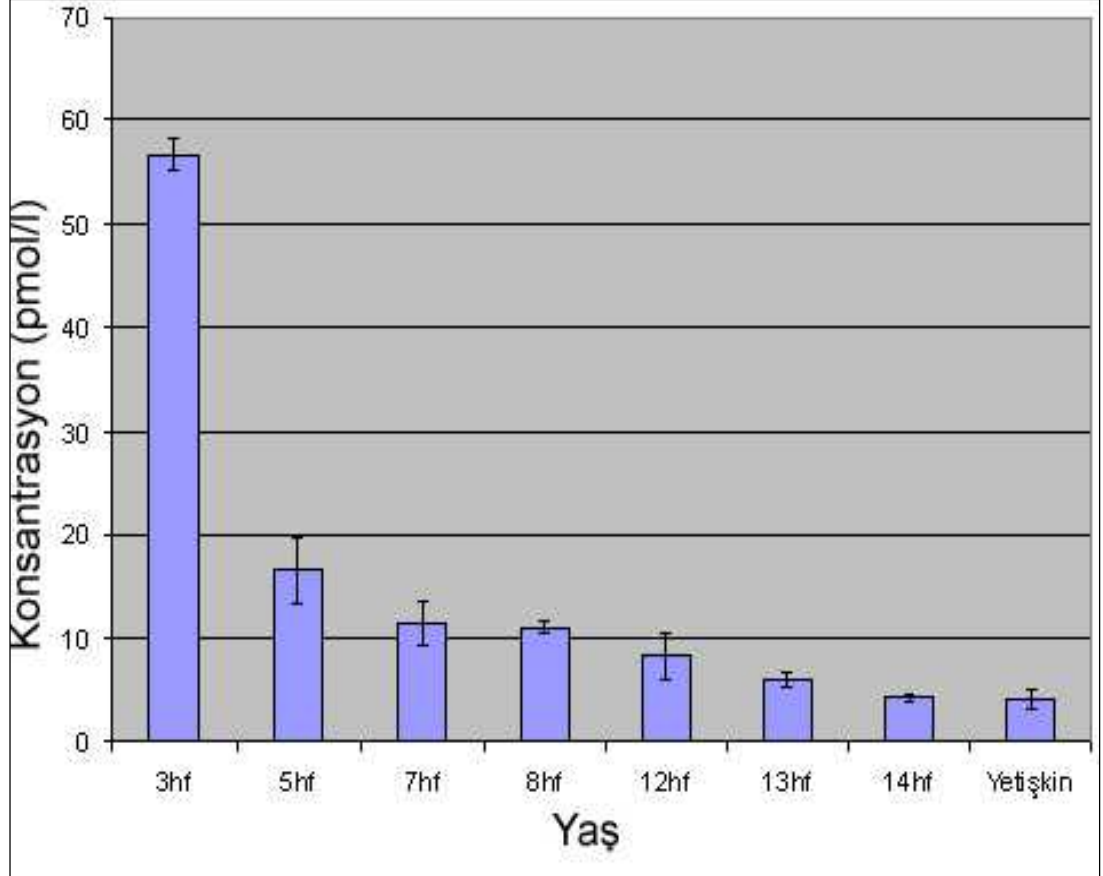
Ya hücrelerine dönü ümün gösterilmesi için 2 haftalık inkübasyon sonrası Oil Red O boyası ile kırmızı renge boyanan hücreler ya hücrelerine dönü ümün gerçekleşti ini göstermi tir (ekil13-A).

Kemik dokuya dönü üm için 3 haftalık inkübasyon ile Alizarin Red S boyası ile kalsifikasyon odaklarının görülmesi kemik dokuya dönü ümü göstermi tir (ekil13-B).



ekil 10: Sıçan femur epifiz büyüme plaklarının histolojik görüntüsü.

3. haftada epifiz plaklarının kalın yapıda oldu u daha sonraki haftalarda kademeli olarak incelmeye başladı 1 gözlemlenmiştir.



ekil 11: Sıçanların serum NT- proCNP düzeylerinin ölçümü.

3. haftada serum NT-proCNP düzeyleri oldukça yüksek oldu u, daha sonraki haftalarda epifiz plakları kemikle me yönüne kaydıkça kademeli olarak düzeylerinin dü tü ü ve 14. haftada eri kin düzeyine yakın seyretti i görülmü tür.

Kıkırdak dokuya dönüşüm ise besiyerine kondrojenik indükleyici olan TGF-1 verilmesi ve Alcian mavisi ile boyanması sonucu kıkırdak matrisindeki glikozaminoglikan sentezi gösterilmiştir (ekil13-C).

Elimizdeki hücrelerin mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özelliği olan her üç ana hücre tipine dönüşümünü gösterilmesini üretilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğunu göstermiştir.

4.2. Akım Sitometri Analizi

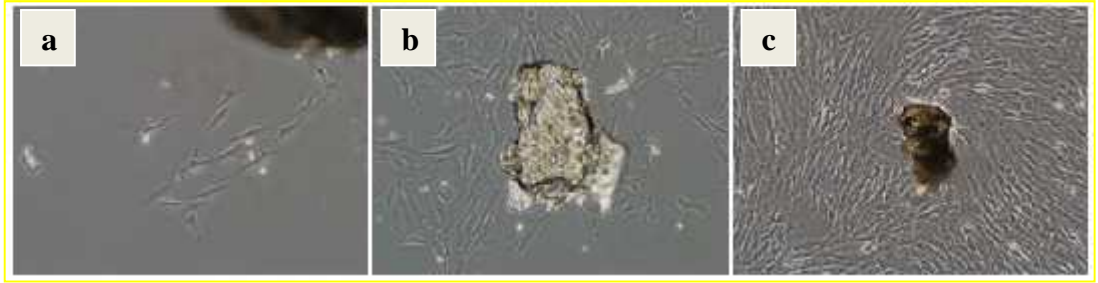
Akım sitometri genellikle mezenkimal kök hücre ve hematopoetik kök hücre belirteçleri için kullanılır. Akım sitometri analizi, elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterlerini detaylı olarak ortaya koymuştur (ekil13). İzole edilen mezenkimal kök hücreler CD29, CD90, CD54 için pozitif, CD45 ve MHC ClassII için negatif reaksiyon vermektedir.

5. Sıçan Tibiası Organ Kültürü

7 günlük sıçanların, sakrifiye edilerek tibialarının yumuak dokulardan arındırılması suretiyle aseptik ortamlarda kültüre edilmesi gösterilmiştir (ekil 15). Bu aynı zamanda organ kültürü deneyinin başlangıç noktasıdır. 21 günlük organ kültürü süreci sonucu tibia kemikleri gösterilmiştir (ekil16). Tibia kemikleri kültür grupları (Kontrol, MKH ve CNP) gösterilmiştir (ekil17).

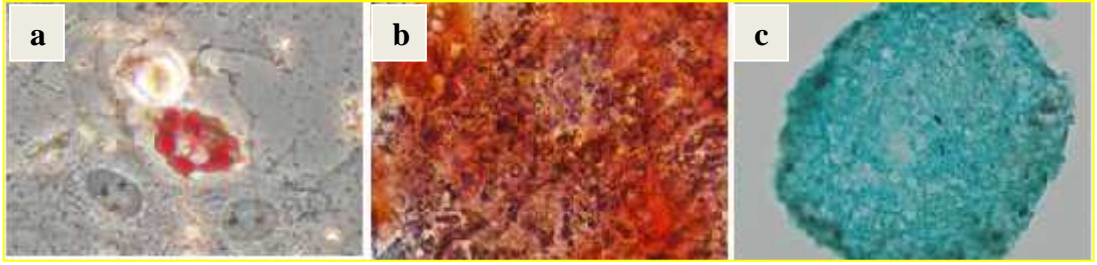
15 ve 21 günlük kültür sürecinde CNP grubu ve MKH grubu tibialarda kontrol grubu tibialara göre daha fazla boyuna uzama olduğunu gösterilmiştir. En fazla boyuna uzama CNP grubunda izlenmiş, MKH grubundan da yakın değerler gözlemlenmiştir.

Başlangıç noktasına göre: 15. günde Kontrol grubu kemiklerde boyuna büyüme ortalama %8.04, MKH grubu kemiklerde boyuna büyüme ortalama %12.53, CNP grubu kemiklerde boyuna büyüme ortalama %15.78 düzeyinde gerçekleşmiştir.



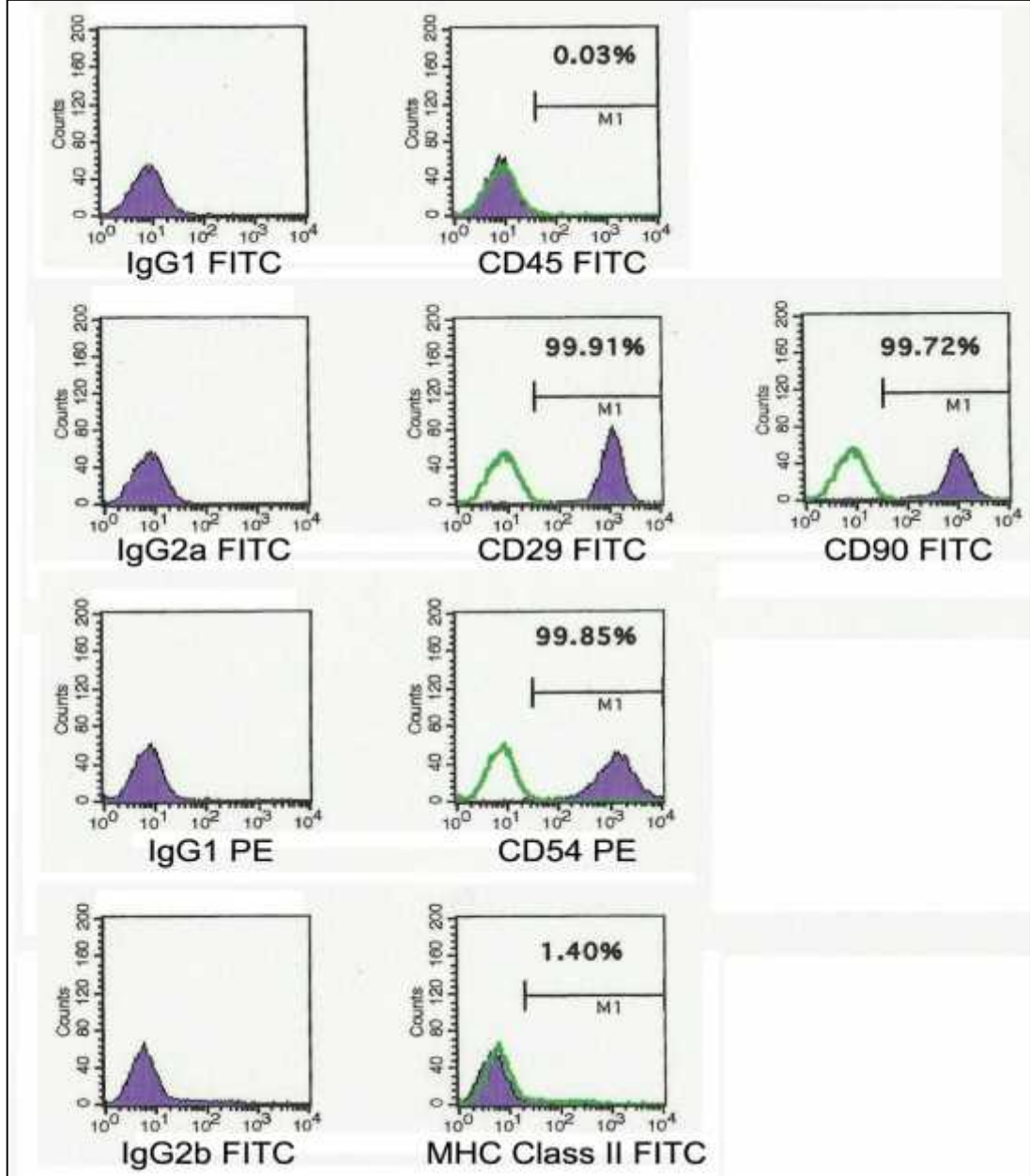
ekil 12:Kollajenaz ile muamele edilen sıçan trabeküler kemik parçalarından izole edilen MKH'lerin morfolojik olarak gözlenmesi.

A) 10. gün trabeküler kemikten migrasyonla ayrılan mezenkimal kök hücreler. B) 2. hafta sonu mezenkimal kök hücrelerin görüntüsü. C) 3. hafta mezenkimal kök hücrelerin petri kabının tamamını kaplamı hali.



ekil 13: Mezenkimal kök hücrelerin karakteristk de i im potansiyelinin histolojik olarak gösterilmesi.

A) Oil Red O boyası ile yağ hücreleri boyanmıştır. B) Alizarin Red S boyası ile kemik dokudaki kalsifikasyon odakları görülmüştür. C) Alcian mavisi ile kıkırdak matriksindeki glikozaminoglikanlar gösterilmiştir.



ekil 14:Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi

Analiz edilen hücreler CD29, CD90, CD54 için pozitif, CD45 ve MHC ClassII için negatif reaksiyon vermişlerdir.

21. günde ise Kontrol grubu kemiklerde boyuna büyüme ortalama %9.82, MKH grubu kemiklerde boyuna büyüme ortalama %16.01, CNP grubu kemiklerde boyuna büyüme ortalama %20.88 düzeyinde gerçekleşmiştir.

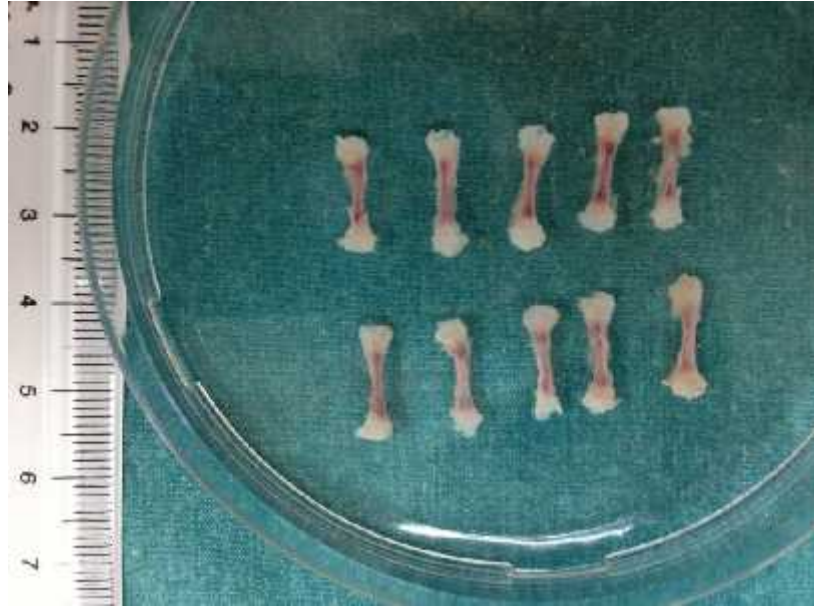
Kontrol grubu, CNP ve MKH grubu tibiaların epifiz plaklarının histolojik görünüşleri gösterilmiştir (ekil18). CNP ve MKH grubu tibiaların epifiz plakları incelendiğinde kontrol grubuna oranla kemik gelişiminin matürasyon ve hipertrofi bölgelerinde daha fazla olduğu görülmüştür.

6. Trabeküler Kemik Kökenli Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerinde CNP/NPR-B fadelerinin immünohistokimyasal Analizi

Sıçan trabeküler kemik kökenli MKH'lerinin gerek CNP'yi gerekse bu ligantın reseptörü olan NPR-B'yi endojen olarak ifade ettiğini gösterilmiştir. CNP'nin sekresyona uğrayan bir protein ile uyumlu olarak daha çok sitoplazma ve çekirdek çevresinde yoğunlaşmış granüler tarz bir pozitiflik gözlenmiştir (ekil 20), diğer taraftan NPR-B'nin ise bu ligantın reseptörü olarak hücre zarında lokalize olduğu görülmüştür (ekil 21). Negatif kontrol grubunda ise herhangi bir ifade olmadığı gözlemlenmiştir (ekil19).

7. Sıçan Tibia Kemiklerinde CNP'nin immünohistokimyasal Boyamayla fadeleri

Yapılan immünohistokimyasal inceleme ile epifiz plaklarının tüm zonlarının gözlemlendiği erken dönemde (3. hafta) CNP ifadesinin özellikle matürasyon, hipertrofi, kemikleme ve kemik iliyi bölgelerinde yoğun şekilde ifade olduğu gösterilmiştir (ekil 22). Büyümenin ilerleyen dönemlerinde (8. hafta ve sonrasında) CNP ifadesinin periosteum ve endosteum altı hücrelerde (osteoprogenitör) yoğunlaşmış olarak gösterilmiştir. Kemik iliyindeki CNP ifadeleri (ekil 22-A ve C), epifiz büyüme plakları matürasyon ve hipertrofi bölgelerindeki CNP ifadeleri (ekil 22-B), endosteum ve periosteum CNP ifadeleri (ekil 22-C) epifiz büyüme plakları kemikleme bölgelerindeki CNP ifadeleri (ekil 22-D) gösterilmiştir.



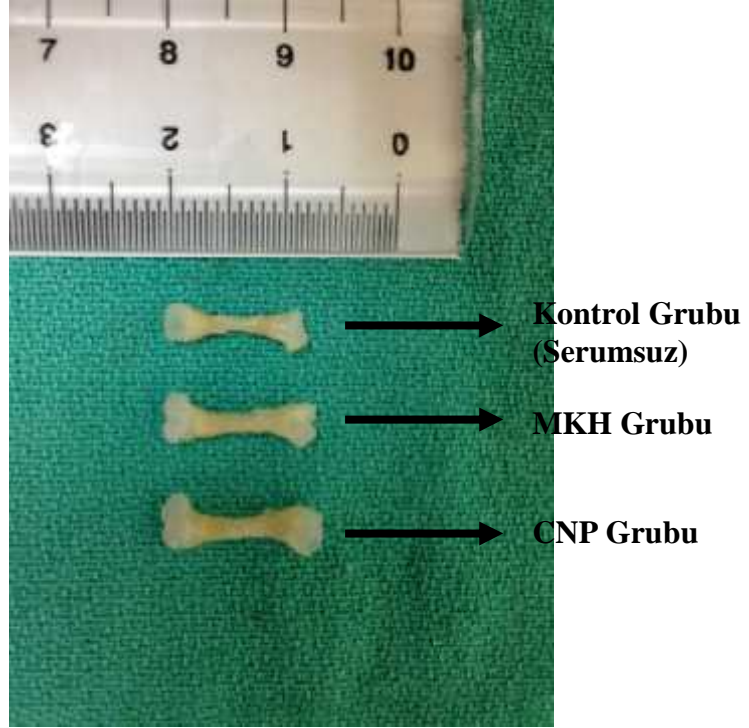
ekil 15: 7 Günlük san tibialarının izolasyonu.

Aseptik artlarda tibia kemiklerinin yumu ak dokulardan arındırılması sonucu olu turulan organ kültürü.



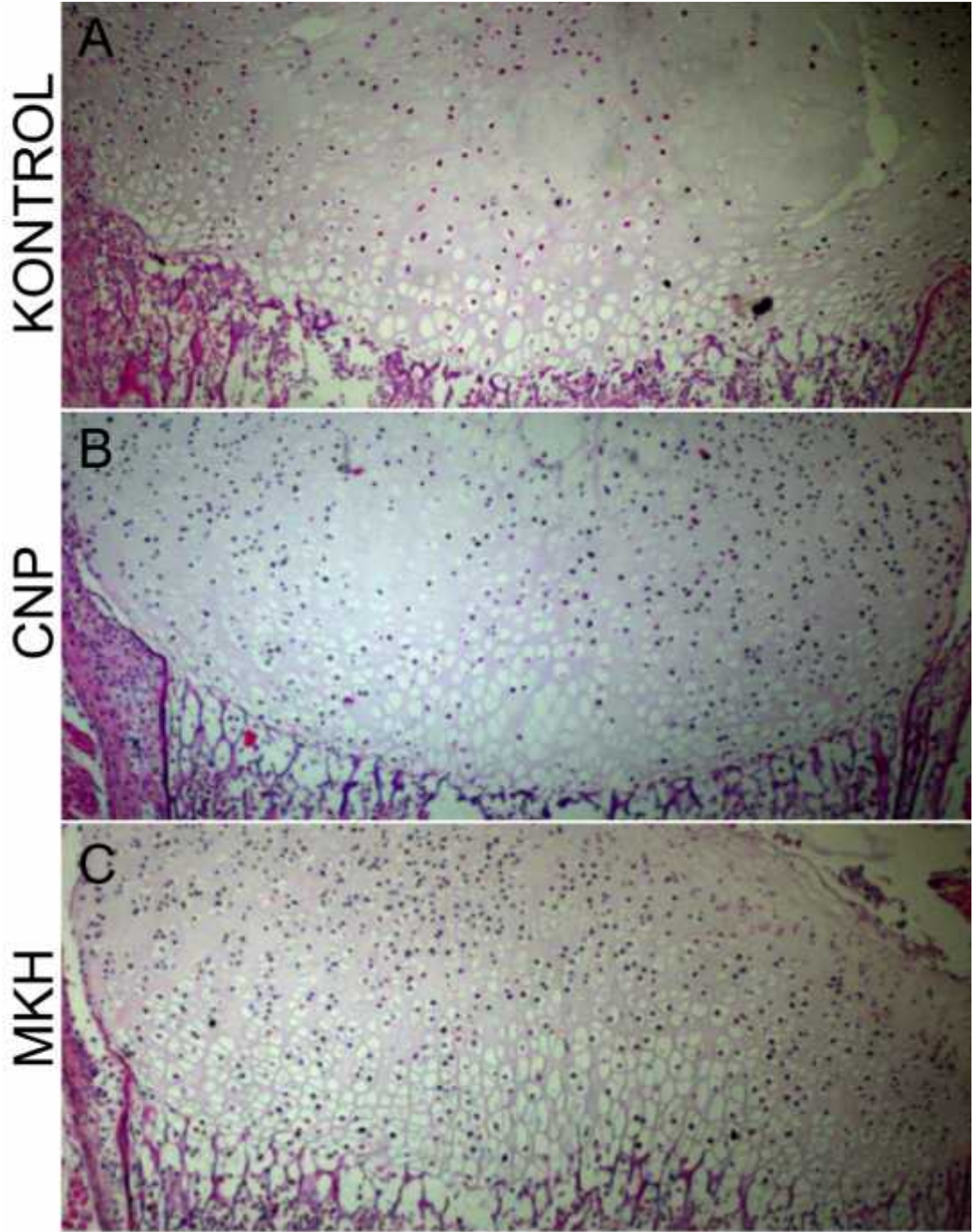
ekil 16: 21 günlük organ kültürü süreci

21 günlük kültür sürecinde tibia kemiklerinde boyuna uzama oldu u gözlemlenmi tir.



ekil 17:Deney sonunda gruplara ait tibia kemik görüntüleri.

MKH ve CNP grubu kemiklerde cesamet ve boyuna olan büyümenin kontrol grubu kemiklerine göre daha fazla oldu u görülmü tür.



ekil 18: Kontrol, CNP ve MKH gruplarında tibia epifiz büyüme plaklarının histolojik görünümüleri

CNP ve MKH grubu tibiaların epifiz plaklarındaki kemik gelişiminin, kontrol grubuna oranla matürasyon ve hipertrofi bölgelerinde daha fazla olduğunu görülmüştür.



ekil 19: Kontrol grubundaki mezenkimal kök hücreler

Negatif kontrol grubu MKH'lere, primer antikor basama 1 atlanarak yapılan immünohistokimyasal boyamada herhangi bir ifade olmadı 1 görülmü tür.

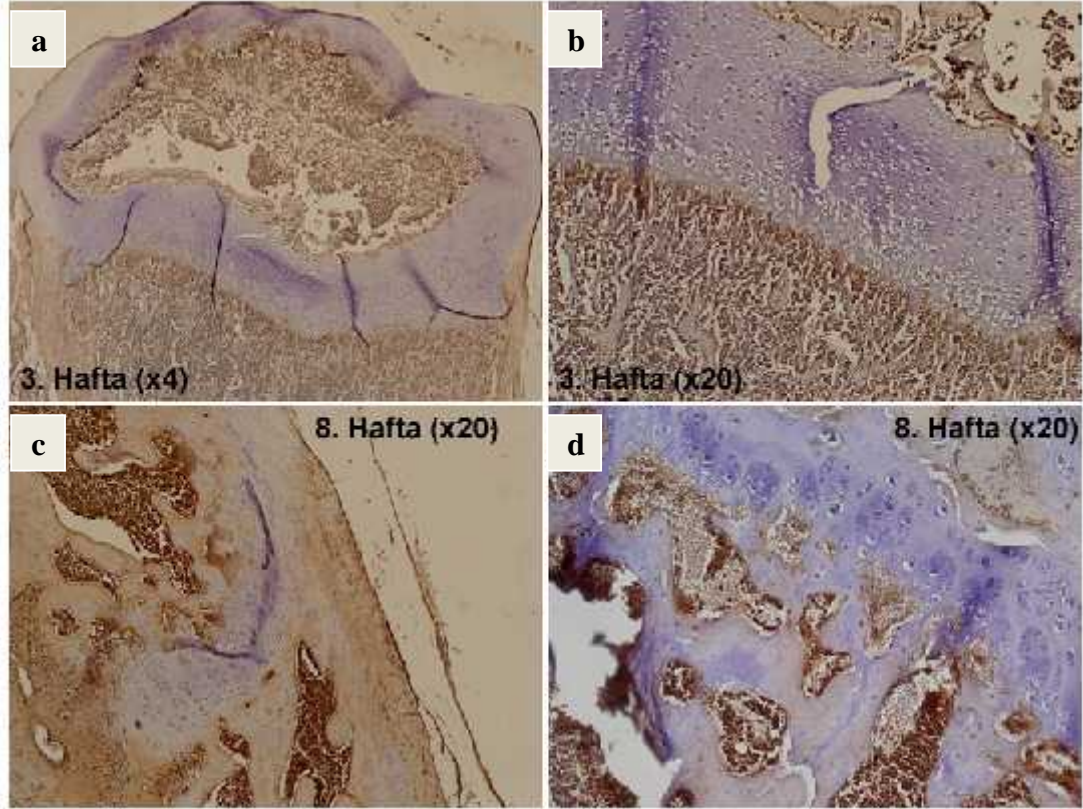


ekil 20: CNP grubundaki mezenkimal kök hücrelerin CNP ifadeleri
CNP'nin daha çok MKH'nin sitoplazmasında ve çekirdek çevresinde yoğunlaştığı, granüler tarzında olduğu görülmüştür.



ekil 21: Mezenkimal kök hücrelerde NPR-B ifadeleri

NPR-B'nin MKH hücre zarında lokalize oldu u görülmü tür.



ekil 22: CNP'nin epifiz plakları, matürasyon, hipertrofi, kemikle me bölgeleri ve kemik ili indeki ifadelerinin immünohistokimya ile gösterilmesi

Kemik ili indeki CNP ifadeleri (ekil 22 A-C), epifiz büyüme pla ı matürasyon ve hipertrofi bölgelerindeki CNP ifadeleri (ekil 22 B), endosteum ve periosteumdaki CNP ifadeleri (ekil 22-C), epifiz büyüme pla ı kemikle me bölgelerindeki CNP ifadeleri (ekil 22 D) görülmü tür.

TARTI MA

Tezcan ve ark. (55) alı masında insan mezenkimal kök hücrelerin TGF- 1 uyarısı altında kondrojenik de i imleri sürecinde CNP ile muamele edilmeleri sonucu ortaya çıkan de i iklikleri incelemi lerdir. Çalı malarda bu süreçte CNP'nin de i ime u rayan kültürlerdeki Alcian mavisi tutulumunu konsantrasyona ba ımlı olarak etkiledi ini göstermi tir. TGF- 1 ile uyarılan kültür ortamlarına 10^{-8} M ve 10^{-7} M CNP ilavesi, konsantrasyona ba ımlı ve konsantrasyonla do ru orantılı olarak Alcian mavisi tutulumunu artırmı tir. Ancak CNP'nin benzer kültür ortamlarına 10^{-6} M konsantrasyonda ilavesi ile bu etkinin ortadan kalktı ı görülmü tür. Bu sonuçlar CNP/NPR-B sinyal yolunun MKH'lerin TGF- 1 ba ımlı kondrojenik de i imleri sürecinde glikozaminoglikan sentezi ile yakından ili kili oldu u hipotezi ile uyumlu bulunmu tur. Bir sonraki a amada, CNP ilavesi ile kıkırdak glikozaminoglikan içeri inin ana bile eni olan agrekan'ın ve konrojenik belirteçlerden tip II kollagen ve Sox 9'un mRNA ifadesindeki olası de i iklikler RT-PCR ile analiz edilmi tir. Sonuçlar test edilen parametrelerle kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık ortaya koymamı tir. Dolayısı ile CNP/NPR-B sinyal yolunun, konrojeniz sürecinde glikozaminoglikan sentezi üzerine görülen ve Alcian mavisi tutulumu ile gösterilen etkisi, büyük olasılıkla agrekan'ın transkripsiyonu a amasında olmadı mı d ndrm tür. Ayrıca insan trabeküler kemik kökenli MKH'lerin gerek CNP'yi gerekse bu ligantın reseptörü olan NPR-B'yi endojen olarak eksprese etti i gösterilmi tir. MKH'lerin sitoplazmik sekresyon granüllerinde CNP, hücre membranında ise NPR-B'yi ifade ettikleri gösterilmi tir. Bu hücrelerin konrojenik de i imleri sürecinde CNP/NPR-B ifadelerinde TGF- 1 uyarısı altında artı oldu u mRNA düzeyinde gösterilmi tir. Bu artı ın erken kondrojenik de i im ve geç matürasyon-hipertrofi evreleri ile paralellik gösterdi i belirlenmi tir.

Kocamaz ve ark. (31) alı masında TGF- 1 ile uyarılan ve insanlardaki CNP'nin homolo u olan CNP-3'n, tavuk kemik ili inden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin, kondrojenik farklıla ma sürecinde glikozaminoglikan ve kondrosit hipertrofisine olan etkilerini ara tırılmı tir. İlkönce tavuk kemik ili inden izole edilen MKH'lerle tek tabaka kültürler olu turulmu tur. TGF- 1 ile muamele sonucu

RT-PCR yapılarak CNP-3 ve NPR-B mRNA ifadelerine bakılmıştır. Kontrol grubuna göre CNP-3'ün mRNA ifadesi artmış fakat NPR-B mRNA ifadesi azalmıştır. Bu sonuç CNP/NPR-B sinyal yolunun, TGF-1 mRNA seviyelerinde düzenlendiğini düşündürmüştür. Daha sonra kondrojenik tavuk ekstremite tomurcu undan mezenkimal mikrokütle kültürü oluşturulmuş ve altı grupta oluşturularak kondrogenез incelenmiştir. 10^{-7} M CNP ilave edilen grupta, kontrol grubuna göre Alcian mavisi tutulumunun daha fazla olmasından dolayı kondrogenезin arttığı anlaşılmıştır. 10^{-7} M CNP ve CNP antikor, NPR-B ve NPR-B, antikor, 10^{-7} M CNP ve her iki antikor karışımı ilave edilen gruplarda kondrogenез azalmıştır. Bunun aksine 10^{-7} M CNP ve spesifik antikor verilmeyen grupta, CNP'nin etkisi engellenmemiş ve kondrogenезin sadece CNP verilen grupla benzer şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Bir başka amada da kondrojenik çökelti kültürleri oluşturulmuştur. Bu çökelti kültürlerine TGF-1, TGF-1-antikor ve TGF-1-spesifik olmayan antikor ilavesi ile gruplar oluşturulmuş ve etkileri incelenmiştir. Kontrol grubunda yassı, diskoid ekilli yapı oluşmuş ve Alcian mavisiyle hafif boyanmıştır. TGF-1 ilavesi sonucu oluşan yapı 3 boyutlu sferoid ekinde oluşmuş ve Alcian mavisi ile yoğun olarak boyanmıştır. CNP ve NPR-B antikorları ve TGF-1 ile muamele edilmiş kültürde, sferoid ekindeki yapının büyüklüğü ve Alcian mavisi ile boyanma yoğunluğu azalmıştır. TGF-1 ile birlikte spesifik olmayan antikor ilavesinde ise bir değişiklik olmamıştır. Çökelti kültürlerinde TGF-1 ile muamele sonucu CNP ve NPR-B antikorları sinyal yolunu bloke etmesine rağmen kollajen tip II mRNA ifadeleri kontrol grubuna göre artmıştır. Bununla birlikte Alcian mavisi boyanması önemli derecede azalmıştır. Öte yandan TGF-1 ve spesifik olmayan antikor kullanılan grupta önemli bir fark olmamıştır. Sonuç olarak besiyerlerine TGF-1 uyarısına ek olarak CNP ilavesi farklı olan kondrositlerin matürasyonunu ve hipertrofini ileri derecede artırdığı analiz edilmiştir.

Uzun kemiklerin epifiz büyüme plaklarında boyuna uzamayı sağlayan endokondral kemikleme gözlenir. Endokondral kemik gelişiminde, kondrogenез ve osteogenез olmak üzere birbiri takip eden iki gelişim mekanizması vardır. Bu olgunlaşma sürecinde kondrositler prolifer olurlar, gelişim uyarılar, matriks sentezler ve boyutlarında artış ile karakterize matürasyon ve hipertrofi

evrelerinden geçerek kalsifiye olurlar. Son a amada ise kalsifiye kıkırdak matriksinin osteoblastlar ile yer de i tirmelerini ve kemikle meyi sa layan bir süreç geçirirler.

CNP, gen kodu ikinci kromozom üzerinde yer alan ve öncül formu Npcc geni tarafından kodlanan özel bir gen ürünüdür. CNP, beyinde ve kondrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve granüllerde depolanmaz. Normal plazma konsantrasyonu çok dü üktür ve konjestif kalp yetmezli i gibi hastalıklarda oranı yükselir (49).

Kondrogenез sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolu, prekondrojenik mezenkimal yo unla ma ve glikozaminoglikan sentezi üzerine artırıcı etki gösterir.

CNP/NPR-B sinyal yolunun uyarılması hücre içerisinde u olası de i ikliklere yol açar.

- 1- Bu sinyal yolunun ikinci habercisi olarak çalı an cGMP'nin hücre içi sentezi artar.
- 2- cGMP hücre içerisinde cGMP ba ımlı protein kinazI ve II' yi (cGK-I ve cGK-II), cGMP ba ımlı iyon kanallarını ve cGMP ba ımlı fosfodiesterazları aktive eder (45, 49).

Endokondral büyüme endokrin, parakrin ve otokrin pek çok faktör tarafından kontrol edilir.

Bu faktörleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar vb. durumlar bahsi geçen mekanizmaların etkilenmesine, aksamasına ve sonuç olarak klinikte gözlenen dwarfizm (patolojik boy kısalı ı) olgularına yol açar.

Maroteaux tipi akromezomelik displazi (AMDM) otozomal çekinik geçi gösteren bir dwarfizm türü olup, C-tipi natriüretik peptid (CNP)'in reseptörü olan natriüretik peptit reseptör-B (NPR-B)'nin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonları sonucu ortaya çıkar (66).

Mezenkimal öncül hücrelerin (kök hücrelerin) kondrojenik gelişimleri sürecinde CNP/NPR-B sinyal yolunun olası rolü hakkındaki bilgiler yeterli değildir. MKH'lerle olan in vitro kondrojeniz bu hücrelerin TGF- β 1 varlığında 3 boyutlu kültür sistemlerinden biri olan çökelti kültürde, kültür edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu kültür sisteminin sağladığı avantajlardan en önemlisi kondrojeniz evrelerinin, bu evrelere spesifik moleküller temeller alınarak ayrı ayrı, ancak bir sıra dahilinde birbirleri ile olan ilişkileri de göz önüne alınarak analiz edilebilmeleridir. Bu bağlamda en sıklıkla kullanılan başlıca belirleyici moleküller ve spesifik oldukları kondrojeniz evreleri şu şekilde sıralanabilir.

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

Alan ve ark. (3) çalışmasında CNP'nin kondrojenik proliferasyonu, matriks sentezini ve kondrojenik hipertrofiyi arttırdığı ve bu etkileri NPR-B yolu ile gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Diğer taraftan NPR-B'ye ait homozigot mutasyon görülen bireylerde serum IGF-I düzeylerinde azalma ve serum CNP düzeylerinde artışı görülmektedir (45). IGF-I büyüme, boy uzaması ve kemik gelişimi üzerine uyarıcı etkileri olduğu bilinen bir büyüme faktörüdür. CNP/NPR-B sinyal yolunun bu yolakla olan olası etkileşimi de henüz aydınlatılmamıştır. Örneğin IGF-I'in etkilerinin en azından bir kısmı CNP sinyal yolu üzerinden gerçekleşiyorsa, yukarıda bahsi geçen mutant bireylerde NPR-B reseptörü üzerinden etki gösteremeyen CNP'nin serum düzeyindeki kısa süreli bile olsa görülebilecek artışı sonrası IGF-I üzerine negatif baskılayıcı etki gösteriyor olabilir. Bu hipotez de henüz cevap bekleyen önemli bir bilinmeyendir.

Bu bilgilerden yola çıkarak CNP/NPR-B sinyal yolunun, uzun kemiklerde boyuna uzamayı sağlayan endokondral kemikle mede rol oynadığı düşünülmektedir. Birinci hedefimiz doğumu takiben erken gelişim döneminden başlayarak erişkin dönemine kadar geçen süreç içerisinde sıçanlardaki serum CNP düzeyleri ile büyüme parametreleri ve kemik boy ölçümleri arasındaki ilişkiyi incelemek, uzun kemik epifiz büyüme plaklarında ve kemik iliğini kapsayan bölgelerde CNP ifade profilini belirlemek olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızın birinci bölümünde, sıçan modelinde 3-12. haftalar arasındaki dönemde hızlı bir büyümenin söz konusu olduğu, 13. haftadan itibaren ise bu büyümenin plato düzeyine eriştiği gösterilmiştir.

Epifiz büyüme plaklarının histolojik olarak en açık olduğu ve tüm zonlarının gözlenebildiği 3. haftada serum NT-proCNP düzeyinin yüksek (yaklaşık 55 pmol/l) düzeyde olduğu, yaşı arttıkça ve epifiz plakları kemikle birlikte serum NT-ProCNP düzeylerinin kademeli olarak azaldığı ve 14. hafta civarında erişkin düzeylerine (yaklaşık 5 pmol/l) düştüğü gösterilmiştir.

Yaptığımız immunohistokimyasal inceleme ile epifiz plaklarının tüm zonlarının gözlemlendiği erken dönemde (çalışmamızın 3. haftasında) CNP ifadesinin özellikle matürasyon, hipertrofi ve kemikle temas bölgelerinde yoğun şekilde gözlemlendiği tespit edilmiştir. Büyümenin ilerleyen dönemlerinde (çalışmamızın 8. hafta ve sonrasında) CNP ifadesinin periosteum ve endosteum altı hücrelerinde (osteoprogenitör hücrelerde) yoğunlaşarak dikkati çekmiştir.

Osteokondrogeniz literatüründeki tüm bu yeni bilgi ve gelişmelerin ve sinyal yolları arasındaki çapraz etkileşimlerin özellikle doku mühendisliği ve biyoteknoloji alanlarına taşınması amacıyla son 10 yıllık süreçte yeni bir yaklaşım olarak kök hücrelerin kullanımı karşımıza çıkmaktadır. Pek çok farklı yaklaşımlarda kullanılabilirliği gösterilmiş önemli bir grup kök hücre topluluğu mezenkimal kök hücrelerdir. MKH'ler ilk olarak 1966 yılında Friedensteyn ve arkadaşları tarafından

osteojenik de i im gösterebilen, yapı ma özelli i ta ıyan, koloni olu turucu ve fibroblast benzeri hücreler olarak tanımlanmı lardır.

Mezenkimal kök hücreler kemik, ya , kas, amniyon sıvısı, kordon kanı, plasenta, di pulpası, amniyon sıvısı, karaci er, periosteum, endosteum gibi birçok dokudan izole edilen fibroblast benzeri eri kin tipi kök hücrelerdir (11, 46).

Önceki çalı malarda, insan trabeküler kemik kökenli MKH'lerin gerek CNP'yi gerekse bu liganın reseptörü olan NPR-B'yi endojen olarak eksprese etti i gösterilmi tir (31, 55). Dolayısı ile MKH'lerin CNP sekresyon yetileri, bu hücreleri bahsi geçen iskelet sistemi displazilerinde kullanılabilir olacak bir tedavi yöntemi olarak gündeme getirebilir.

İkinci hedefimiz sıçan modelinde trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücreleri izole etmek, karakterizasyonlarını ve bu hücrelerin CNP proteinini endojen olarak ifade etti ini göstermek, uzun kemiklerde endokondral büyüme sürecinde CNP'nin etkilerinin gösterebilece i bir kemik organ kültürü olu turmak ve bu etkileri analiz etmektir. Bir di er amacımız kemik organ kültürlerinde boyuna kemik büyümesi üzerine MKH'lerin etkilerini analiz etmektir.

Tezcan ve ark. (55) çalı masında insan kaynaklı MKH'lerde gösterilen CNP ve NPR-B ifadeleri bu çalı mada sıçan kaynaklı MKH'lerde de gösterilmi ve türler arasında MKH'lerin CNP/NPR-B ifadesi yönünden herhangi bir farklılık olmad ı tespit edilmi tir. MKH'lerin sitoplazmik sekresyon granüllerinde CNP, hücre membranında ise NPR-B'yi ifade ettikleri gösterilmi tir.

Elde etti imiz hücreler, fibroblast benzeri görünüşleri ve plastik kültür kaplarına yapı ma yeteneklerinin yanı sıra akım sitometri ile analiz edilmi tir. Sonuçlar, bu hücrelerin CD45, MHC ClassII yüzey belirteçleri yönünden negatif reaksiyon verdikleri, CD29, CD54 ve CD90 yönünden pozitif reaksiyon verdikleri görülmü tür. Bu sonuçlar elde edilen hücrelerin, immunofenotipik olarak

mezenkimal kök hücre karakteri taşıdıklarını doğrulamaktadır. Bunun yanı sıra, elde edilen hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik de i im potansiyelleri de gösterilerek MKH'lerin tüm karakteristik özelliklerini taşıdıklarını doğrulamıştır.

CNP ile zenginleştirilmiş organ kültürü ortamlarında ve/veya MKH'lerin üzerinde, bu hücrelerden salgılanan salgılar ile (CNP'yi kapsadığı düşünülmektedir) zenginleştirilmiş organ kültürü ortamlarında, kontrol grubuna oranla belirgin kemik boyu uzaması görülmüştür.

Aynı kemiklerin epifiz büyüme plakları histolojik olarak incelendiğinde, bu kemik gelişiminin özellikle matürasyon ve hipertrofi bölgelerindeki defektlerden kaynaklandığı gösterilmiştir. Bu durum akondroplazi vakalarının tedavisi amaçlı CNP infüzyonu yapılan sıçan modellerindeki bulgular ile örtüşmektedir (66).

Akondroplazi en sık rastlanan iskelet displazisidir. Yaklaşık 10000'den fazla bir görülür. Fibroblast growth factor receptor 3 mutasyonu sonucu meydana gelir. Akondroplazide growth hormon uygulamaları olmasına rağmen bu tedavinin etkileri sınırlıdır ve bu konuda yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç vardır. Akondroplazili farelerde kemiklerdeki büyüme plaklarında FGFR-3 aracılı MAPK sinyal yolunun inhibisyonu matriks sentezini azaltmaktadır (66). CNP'nin matriks sentezini arttırarak FGFR-3 mutasyonlu akondroplazik farelerde dwarfizmi engellediği gösterilmiştir (65).

Yaptığımız çalışmamızın sonucunda ileriye dönük bazı sorular oluşmuştur. 1) Sadece MKH'ler mi yoksa CNP gen aktarımı yapılmış MKH'ler mi bu amaçla kullanılmalıdır? 2) Hücreler hangi yolla verilmelidir? 3) Verilecek hücre sayısı ne olmalıdır? 4) Hücrelerin vücuttaki dozlarının bir önemi var mıdır? 5) Olası yan etkiler neler olabilir? gibi sorular in vivo hayvan deneyleri ile mutlaka test edilmelidir.

SONUÇLAR

Veriler CNP'nin büyüme ve iskelet gelişimi ve kemik boy uzamasında önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Bundan dolayı serum CNP düzeyi hedef alınarak dwarfizme karşı tedavi stratejileri geliştirilebileceği öngörülmektedir. MKH'ler geliştirilebilecek bu tedavi stratejileri içerisinde yerini alan önemli bir seçenek olarak düşünülebilir.

Yüksek serum CNP düzeyi uzun kemiklerde boyuna uzamayı artıran bir etken olarak düşünülmektedir. Sıçan modelinde de önceki insan MKH'leri ile elde edilen veriler tekrarlanabilirse, bu model üzerinde MKH'lerin kemik uzaması/büyümesi üzerine etkileri test edilebilir diye düşünülmüştür.

Sıçan modeli üzerinde denenecek olan yöntemler CNP/NPR-B sinyal yolunun hem normal büyüme ve iskelet sistemi gelişimi üzerine etkilerini, hem de osteokondrodizplazi modellerinde (akondroplazi, growth hormon eksikliğine bağlı büyüme geriliği vb.) olası bir tedavi yöntemi olarak başarıyı değerlendirecektir.

KAYNAKLAR

1. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF. 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** 1992; 89:2732-6.
2. Ahrens PB, Solursh M, Reiter RS. Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. **Dev Biol** 1977; 60:69-82.
3. Alan T, Tufan AC. C-type natriuretic peptide regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin and collagen type X-related functions. **J Cell Biochem** 2008; 105(1):227-35.
4. Ballock RT, Reddi AH. Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. **J Cell Biol** 1994; 126:1311-8.
5. Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, et al. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomic dysplasia, type Maroteaux. **Am J Hum Genet** 2004; 75(1):27-34.
6. Cameron Gren GB, White CN, Laterza OF, Clarke W, Kim H, Sokoll LJ. Assessment of BNP and NT-proBNP in emergency department patients presenting with suspected acute coronary syndromes. **Clin Biochem** 2006; 39:11-8.
7. Can A. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. **TÜBA**: Ankara, 2009: 15-22.
8. Cooper GM, Hausman RE. Hücre Moleküler Yaklaşım. Sakızlı M, Atabey N, Çev. Ed, 3. Baskı, İzmir Tıp Kitabevi, 2006:621-624.

9. Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, et al. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98(7):4016-21.
10. Cserjesi P. A basic helix-loop- helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. **Development** 1995; 121: 1099-110.
11. Çetinkaya DU. Kök Hücre Biyolojisi Ve Klinik Uygulamalar. **TÜBA**: Ankara, 2009: 53-62.
12. De Bold AJ, De Bold ML. Determinants of natriuretic peptide production by the heart: basic and clinical implications. **J. Investig Med** 2005; 53:371-7.
13. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. **J Osteoarthritis Cartilage** 2000; 8:309-34.
14. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor-3 is a negative regulator of bone growth. **Cell** 1996; 84: 911-21.
15. Ellmers LJ, Scott NJ, Piuholaj Maeda N, Simithies O, Frampton CM, Richards AM, et al. Npr1-regulated gene pathways contributing to cardiac hypertrophy and fibrosis. **J Mol Endocrinol** 2007; 38: 245-57.
16. Gilbert SF, Sunderland, MA, Sinauer. **Developmental Biology** 2001; 35:346-47.
17. Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. **Genes Dev** 1996; 10:301-12.
18. Gülen H. Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. **Sa lıkta Birikim Dergisi** 2009;1(5):67-80.

19. Haliloglu M, Ozen H, Kocak N, Unsal M. Acromesomelic dysplasia associated with mild lumbar spine stenosis. **Eur Radiol** 1999;9(1):103-4.
20. Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. **Bioessays** 2000; 22:138-47.
21. Hall BK, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. **Int J Dev Biol** 1995; 39:881-93.
22. Hickok NJ, Haas AR, Tuan RS. Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. **Microsc Res Tech** 1998; 43:174-90.
23. Ianakiev P, Kilpatrick MW, Daly MJ, Zolindaki A, Bagley D, Beighton G, et al. Localization of an acromesomelic dysplasia on chromosome 9 by homozygosity mapping. **Clin Genet** 2000;57(4):278-83.
24. Iida-Klein A, Varlotta V, Hahn TJ. Protein kinase C activity in UMR-106-01 cells: effects of parathyroid hormone and insulin. **J Bone Miner Res** 1989; 4:767-74.
25. İnan S, Özbilgin K. Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. *Sağlıkta Birikim Dergisi* 2009;1(5):11-23.
26. Junguiera LC, Corneiro J. Temel Histoloji. Solakoğlu S, Aytekin Y, Çev. Ed, 11. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi: İstanbul, 2009; 135-152.
27. Kant SG, Polinkovsky A, Mundlos S, Zabel B, Thomeer RT, Zonderland HM, et al. Acromesomelic dysplasia Maroteaux type maps to human chromosome 9. **Am J Hum Genet** 1998; 63(1):155-62.

28. Kaplan SL, Grunbach MM. Pathophysiology and treatment of sexual precocity. **J Clin Endocrinol Metab** 1990; 71: 785-9.
29. Karaöz E. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Kocaeli: 2010;2-94.
30. Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler, Derya kitabevi, Trabzon: 2004;1-157.
31. Kocamaz E, Gok D, Cetinkaya A, Tufan AC. Implication of C-type natriuretic peptide-3 signaling in glycosaminoglycan synthesis and chondrocyte hypertrophy during TGF- 1 induced chondrogenic differentiation of chicken bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J Mol Histol** 2012; 43: 497-508.
32. Lee K, Deeds JD, Segre GV. Expression of parathyroid hormone-related peptide its receptor Messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology* 1995;136,453-463.
33. Lev R, Spicer S. Specific staining of sulfated groups with Alcian blue at low pH. **J Histochem Cytochem** 1964; 12: 309.
34. Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. **FASEB J** 1993; 7(2):328-38.
35. Loder RT, Wittenberg B, Silva G. Slipped capital femoral epiphysis associated with endocrine disorders. **J Pediatr Orthop** 1995; 15:349-56.
36. Maroteaux P, Martinelli B, Compoille E. Acromesomelic dwarfism *Presse Med* 1971; 79, 1839-1842
37. Mello MA, Tuan RS. High density Micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: An in vitro model of endochondral skeletal development. **In Vitro Cell Dev Biol Anim** 1999; 35:262-9.

38. Mericq V, Uyeda JA, Barnes KM, De Luca F, Baron J. Regulation of fetal rat bone growth by C-type natriuretic peptide and cGMP. **Pediatr Res** 2000; 47(2):189-93.
39. Miyazawa T, Ogawa Y, Chusho H, Yasoda A, Tamura N, Komatsu Y et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. **Endocrinology** 2002; 143(9):3604-10.
40. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. **Clinically Oriented Embryology** 1993; 5th ed. Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company.
41. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NR, Tuan RS. **J Orthop Res** 2002; 20:1060-1069.
42. Oberlender SA, Tuan RS. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. **Development** 1994; 120:177-87.
43. Oberlender SA, Tuan RS. Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. **Cell Adhes Commun** (1994); 2:521-37.
44. O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Rosier RN. 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** 1994; 12:299-310.
45. Olney RC. C-type natriuretic peptide in growth: a new paradigm. **Growth Horm IGF Res** 2006; 22:6-14.
46. Ovalı E. Türk Hematoloji Derneği, Mezenkimal Kök Hücre Kursu, zmir:2008;7-10.

47. Owen, M.E. The marrow stromal system. In Marrow Stromal Cell Culture. (Eds. Beresford, J.N. Owen, M.E.) 1-10, **Cambridge Univ Press**.
48. Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. **Science** 1996; 274(5295):2082-6.
49. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. **Endocrine Reviews** 2006; 27:47-72.
50. Rosier RN, O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE. Transforming growth factor beta: an autocrine regulator of chondrocytes. **Connect Tissue Res** 1989; 20:295-301.
51. San Antonio JD and Tuan RS. Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations, *Dev Biol* 1986;115, 313-324.
52. Sato N, Sanjuan IM, Heke M, Uchida M, Naef F, Brivanlou AH. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. **Dev Biol** 2003; 20:404-1
53. Tamura N, Garbers DL. Regulation of the guanylyl cyclase-B receptor by alternative splicing. **J Biol Chem** 2003; 278(49):48880-9.
54. Tavella S, Raffo P, Tacchetti C, Cancedda R, Castagnola P. N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. **Exp Cell Res** 1994; 215:354-62.
55. Tezcan B, Serter S, Kiter E, Tufan AC. Dose dependent effect of C-type natriuretic peptide signaling in glycosaminoglycan synthesis during TGF- β 1 induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J Mol Histol** 2010; 41: 247-258.

56. Tufan AC, Tuan RS. Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. **FASEB J** 2001; 15(8):1436-8.
57. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML. Characterization of Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Human Trabecular Bone. **Stem Cells** 2003; 21:681-693.
58. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature** 1988, 335:440-2.
59. Vortkamp A, Lee K, Lanske K, Segre G, Kronenberg HM. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTS-related protein. **Science** 1996 273:613-22.
60. Wallen-Ohman M, Lonnbro P, Schon A, Borrebaeck CA. Antibody-induced apoptosis in a human leukemia cell line is energy dependent: thermochemical analysis of cellular metabolism. **Cancer Lett** 1993; 75:103-9.
61. Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. **EMBO J** 1996; 15:520-7.
62. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J. The Sry-related gene *sox9* is expressed during chondrogenesis in Mouse embryos. *Nat Genet* 1995; 9,15-20.
63. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. **Nature** 1999; 398:714-8.
64. Yasoda A, Ogawa Y, Suda M, Tamura N, Mori K, Sakuma Y, et al. Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-

type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway. **J Biol Chem** 1998; 273(19):11695-700.

65. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, et al. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. **Nat Med** 2004; 10(1):80-6.

66. Yasoda A, Kitamura H, Fujii T, Kondo E, Murao N, Miura M, et al. Systemic Administration of C-Type Natriuretic Peptide as a Novel Therapeutic Strategy for Skeletal Dysplasias **Endocrinology** 2009; 150(7):3138-3144.

67. Yılmaz M. Türk Hematoloji Derneği, Mezenkimal Kök Hücre Kursu, zmir:2008; 11-13.

EKLER

T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

Sayı :B.30.2.PAÜ.0.20.05.07/08
Konu :Çalışma Başvurusu

25.02.2011

Sayın;

Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Tıp Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İlgi : 18.02.2011 tarihli dilekçeniz.

“Serum/Plazma CNP düzeyindeki artışın büyüme, iskelet sistemi gelişimi ve iskelet displazileri üzerindeki olası etkilerinin sıçan modelinde incelenmesi” konulu PAUHDEK-2011/009 no’lu çalışmanız 23.02.2011 tarih ve 02 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu Çalışmanın yapılmasının **Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna**, ve toplam 70 adet sıçan kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi

Gereğini bilgilerinize rica ederim.



Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY

Başkan

ASLI GİBİDİR
Nejla YÜKSEL
Fakülte Sekreter
04.03.2011

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
TOPLANTI TUTANAĞI

Toplantı Tarihi	23.02.2011	Karar	11
Toplantı Sayısı	2	Toplantı Saati	14:00
Toplantı Günü	Çarşamba	Toplantı Yeri	Dekanlık

KARARLAR:

Karar 11- Üniversitemiz Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. A.Çevik TUFAN'ın yürütücüsü olduğu "Serum/Plazma CNP düzeyindeki artışın büyüme, iskelet sistemi gelişimi ve iskelet displazileri üzerindeki olası etkilerinin sıçan modelinde incelenmesi" konulu PAUHDEK-2011/009 no'lu çalışması görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu Çalışmanın yapılmasının **Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna**, ve toplam 70 adet sıçan kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi




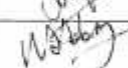


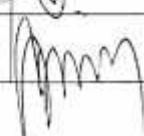
ASLI GİBİDİR

Nejla YÜKSEL
Fakülte Sekreter

23.02.2011

Yrd.Doç.Dr.Mustafa KARATEPE

Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY
Başkan

Doç. Dr. Çağrı ERGİN		Yrd.Doç.Dr.Mustafa KARATEPE	
Doç. Dr. Yakup KASKA		Doç. Dr. Habip ATALAY	
Yrd. Doç. Dr. Funda BÖLÜKBAŞI HATİP	Katılmadı	Uzm. Vet. Hek. Barbaros ŞAHİN	
Dr. Berna TURGUT		Şemsettin ÖZMEN	


PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

Sayı : B.30.2.PAÜ.0.05.02.00/919

10/10/2011

Konu : Proje

Sayın: Doç.Dr.Ahmet Çevik TUFAN

Üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun 05/10/2011 tarih ve 06 sayılı toplantısında 2011TPF037 numaralı "Serum/Plazma CNP Düzeyindeki Artışın Büyüme, İskelet Sistemi Gelişimi ve İskelet Displazileri Üzerindeki Olası Etkilerinin Sıçan Modelinde İncelenmesi" isimli Tıpta Uzmanlık Tez Projenizin 20.000-TL olarak desteklenmesine karar verilmiştir. Birimimiz web sitesinden temin edebileceğiniz; projenizin başlatılabilmesi için doldurmanız gereken **proje protokolü** (iki nüsha) ve ilk rapor dönemi için almak istediğiniz mal veya hizmet alımlarına ilişkin **malzeme talep formunu** (makine teçhizat talebi varsa şartnameleriyle birlikte hap@pau.edu.tr adresine) e-posta ile göndermeniz ve ayrıca bir suretini doldurup imzaladıktan sonra birimimize 18/11/2011 tarihine kadar teslim etmeniz hususunda;

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Raşit URHAN
Koordinatör

Önerilen

Dönem (yıllık)	Makina Teçhizat	Sarf Malzemesi	Hizmet Alımı	Seyahat	Diğer Giderler	Toplam
2011	15,000	5,000				
2012						
2013						
Toplam						20,000

Onaylanan

Dönem (yıllık)	Makina Teçhizat	Sarf Malzemesi	Hizmet Alımı	Seyahat	Diğer Giderler	Toplam
2011	15,000	5,000				
2012						
2013						
Toplam						20,000

Tel: 0 (258) 296 20 36
Kınıklı Kampüsü 20670, DENİZLİ


ASLI GİRİDİR
Sevcan KURAN
Personel Şube Müdürü

e-posta : hap@pau.edu.tr
www.pamukkale.edu.tr