

## Sıçan Fetüslerinde Humerus Primer Ossifikasyon Bölgesi Gelişimi: Histolojik ve Histokimyasal Bir Çalışma

İsmail ÜSTÜNEL, Gökhan AKKOYUNLU, Erdoğan KOCAMAZ, Ramazan DEMİR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 07070, Antalya - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 26.04.2000

**Özet :** Gebeliğin 14-18 günleri arasında olan sıçan fetüslerinin humeruslarında ilk kemikleşme alanlarını histolojik, histokimyasal ve histoenzimolojik metodlarla incelemeyi amaçlayan bu çalışmada, 30 adet *Rattus norvegicus* türü sıçan fetüsü kullanıldı. Fetüslerden alınan humerus diyafizi örneklerine; alsiyan mavisi-hematoksilen, periyodik asit Schiff (PAS)-hematoksilen, alsiyan mavisi-PAS-hematoksilen, alizarin kırmızısı ve toluidin mavisi, alkalın fosfataz (ALP), adenozin trifosfataz (ATPaz) ve asit fosfataz (ACP) boyama teknikleri uygulandı.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular şöyle özetlenebilir; gebeliğin 14. gününde, henüz kemikleşmenin olmadığı, 15. günde bazı kondrositlerin sitoplazmalarında dejenerasyonun oluşmaya başladığı ve kıkırdak model periferinde osteoblastik hücrelerin oluştuğu belirlendi. 16. günde, ilk defa, osteoblastik hücre zonu ile diyafiz kondrositleri arasında hücresiz bir zonun (osteoid) oluştuğu gözlemlendi. 17. günde, oldukça parçalı görünen diyafiz matriksi içinde, çalışılan tüm enzim aktiviteleri belirgindi. 18. günde, kemik trabekülleri arasında ve çevresinde zengin damarlanma dikkat çekiyordu.

Sonuç olarak, sıçanlarda humerus kıkırdak modelinde ilk kemikleşmenin embriyonal dönemin 16. gününde başladığı ve kemikleşme sürecinde değişik fosfatazların rol alabileceği söylenilebilir.

**Anahtar Sözcükler :** Rat, Prenatal, Kemikleşme, Humerus, Fosfataz

### Humerus Primer Ossification Zone Development in Rat Fetuses: A Histological and Histochemical Study

**Abstract :** In this investigation of the primary ossification zones of 14-18 day-old fetal rat humeri by histological, histochemical and histoenzymatical methods, 30 rat fetuses of the species *Rattus norvegicus* were used. The humeral diaphysis samples of the fetuses were subjected to alcian blue-heamatoxylin, periodic acid Schiff (PAS)-heamatoxylin, alcian blue-PAS-heamatoxylin, alizarin red and toluidine blue, alkaline phosphatase (ALP), adenosine triphosphatase (ATPase) and acid phosphatase (ACP) staining techniques.

The results can be summarized as follows: On day 14, no ossification signs were evident yet, whereas on day 15, the initiation of degenerations in some chondrocyte cytoplasm and the formation of osteoblastic cells on periphery of the cartilage model were observed. On day 16, for the 1st time the formation of an acellular zone (osteoid) between the osteoblastic cell layer and the diaphysis chondrocytes was visible. On day 17, in the diaphysis matrix, which was almost dispersed, all of the enzyme activities being studied were prominent. And on day 18, rich vascular elements were evident between and around the ossified trabeculae.

According to these results, primary ossification in the humerus cartilage model of the rat appears to begin on day 16 and various phosphatases may play important roles in the ossification process.

**Key Words :** Rat, Prenatal, Ossification, Humerus, Phosphatase

## Giriş

Kemik oluşumu ve tamiri konusunda değişik yöntemler kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. Bunların büyük bir bölümü civiv embriyolarında kemik oluşumu, gelişmesi ve mineralizasyonu ile ilgilidir (1, 6). Bununla birlikte kemik oluşumunun hücrel ve moleküler detaylarını belirleyen kapsamlı çalışmalar henüz başarısızdır. Embriyolojik sürece bağlı olarak sıçan fetus humerusundaki kemikleşme seyrini belirleyen matriks elemanları fosfataz aktivitesi, prostaglandin etkilerini araştıran çalışmalar konuya yeni tartışmalar getirmişlerdir (7, 9). Sıçan fetüslerinin humeruslarında ossifikasyon zamanlama periyodlarının bilinmesi embriyolojik süreçte bazı sorulara ışık tutacağı açıktır. Dolayısıyla sıçan fetüsü humerusunda ilk kemikleşme belirtilerinin embriyonik gelişimin hangi gününde ortaya çıktığı sorusu halen tartışma konusudur. Ayrıca, bu konuda yapılan tartışmalara yeni boyutlar kazandırmak için bu kemikleşme noktalarında değişen enzim aktivitelerinin belirlenmesi önemli olmalıdır. Kemik gelişimi süresince, bir seri hidrolitik ve katalitik enzimler olaya katılırlar ve önemli görevler üstlenirler (10, 11). Bu enzimlerden ALP, ATPaz ve ACP'den sıklıkla sözedilmektedir (10, 12). Daha önceki çalışmaların sonuçlarına göre, sözü edilen bu enzimler kemikleşme aşamalarında oldukça önemli görevler üstlenmektedirler (13-15). Bu bağlamda konuya deneysel düzeyde yaklaşımda bulunarak katkı yapmayı amaçlayan bu çalışma planlandı. Çalışmada 14-18 günlük sıçan fetüslerinin humeruslarında ilk kemikleşme sahaları histolojik, histokimyasal (asit ve nötral mukopolisakkaritlerin yerleşimi) ve histoenzimolojik (ALP, ATPaz ve ACP) metodlarla incelenmektedir.

## Materyal ve Yöntem

Çalışma, gebeliğin 14, 15, 16, 17 ve 18. günlerinde olan 30 adet sıçan embriyosu (*Rattus norvegicus*) ile yürütüldü. Her deney gününde 6'şar adet embriyo disseke edildi. Disseke edilen embriyolardan humeruslar çıkarılarak diyafiz bölgeleri alındı.

Diyafiz örneklerinin bir kısmı nötral formalinde fikse edilip rutin histolojik yöntemlerle takip edilerek parafin ile bloklandı. Bu bloklardan elde edilen 6 µm kalınlığındaki seri kesitler; alsiyen mavisi ve hematoksilen; periyodik asit Schiff (PAS) ve hematoksilen; alsiyen mavisi, PAS ve hematoksilen birleşik boyama teknikleri ve alizarin kırmızısı boyama tekniği ile boyandı.

Diyafiz örneklerinin diğer bir kısmı -20 °C'de dondurularak Shandon AS620 Cryotome ile 10 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Bu seri kesitlere; alkalın fosfataz, ATPaz ve asit fosfataz (16, 17) boyama teknikleri uygulandı.

Geriye kalan diyafiz örnekleri önce fosfat tamponlu (pH 7.3) % 2,5 glutaraldehid, sonra % 1 ozmiyum tetraoksit (OsO<sub>4</sub>) ile fikse edildiler; yükselen alkol serilerinden geçilerek Araldite CY-212 ile bloklandılar. Bloklardan 1 µm kalınlığında kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanıp, Zeiss binoküler ışık mikroskobu ile incelendi. Fotoğraf büyütmelerinde; objektif büyütmesi X

fotooküler büyütmesi (2.5) şeklinde hesaplandı ve elde edilen sayısal sonuç orijinal büyütme olarak verildi.

## **Bulgular**

Doku örneklerinden elde edilen parafin seri kesitleri farklı gebelik günlerine göre gruplandı ve humerus kırkırdak modelindeki gelişimleri gösteren sonuçlar değişik boyama metodlarıyla Şekil 1'de toplu halde verildi. Bu şekillerde humerus kırkırdak modeli ve primer ossifikasyon bölgesi gelişimleri açıkça gözlenmektedir. Gebeliğin farklı günlerindeki humerus kırkırdak modelinin aynı seri kesitte farklı boya reaksiyonlarıyla boyanmasını sağlayan bir kıyaslama serisi, bize kemikleşmenin embriyolojik süreci hakkında açık bir fikir vermektedir (Şekil 1 a, b, c, d).

Gözlemlerin detaylandırılmasıyla hücre ayırımını yapmak mümkün oldu.

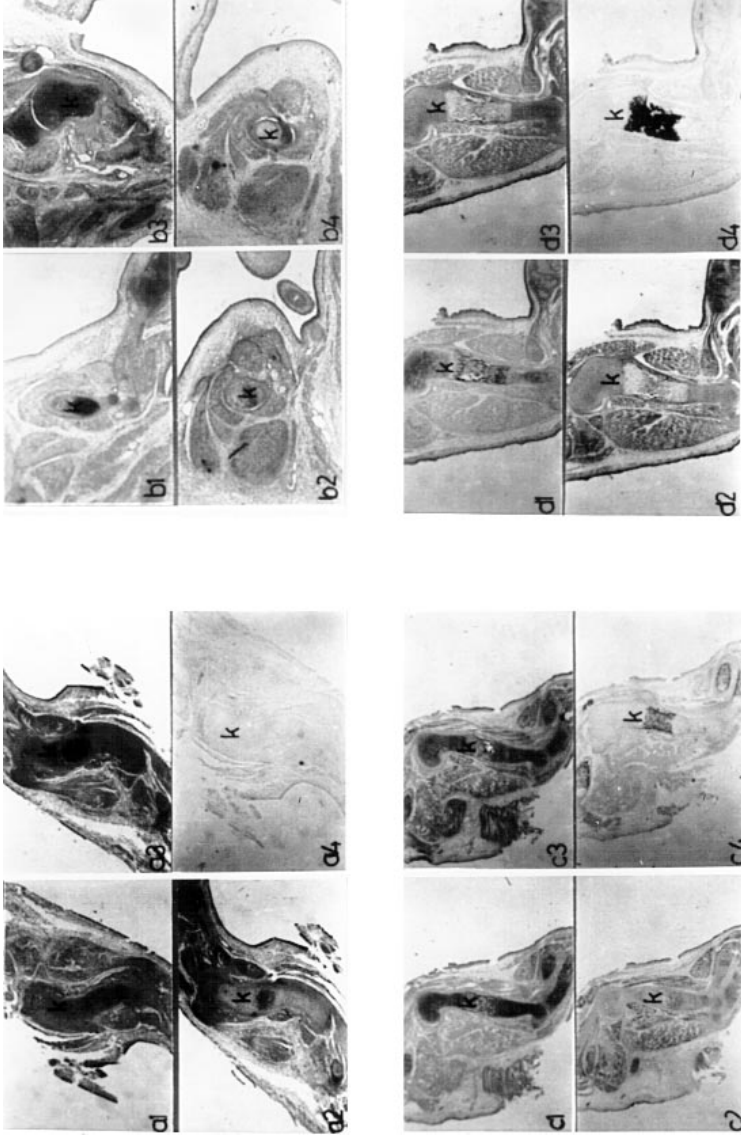
14. günde, mezenşimal doku içerisinde belirginleşmiş humerusa ait kırkırdak modeli ile mezenşimal doku arasında mezenşimal hücrelere göre daha yuvarlak ve koyu görünümlü tek sıra hücre tabakası, kondrositler vardı. Bu kondrositler kırkırdak modelin sınırını çiziyordu. Model içerisindeki kondrositler ise kırkırdak modelin uzun eksenine dik yerleşiktiler (Şekil 2).

15. günde, bazı büyük kondrositlerin sitoplazmalarında dejeneratif görüntülerin ortaya çıktığı gözlemlendi. Kırkırdak model çevresinde 7-9 hücre sırasından oluşan bir periosteumun oluştuğu, periosteum ile kırkırdak model arasında tek sıra halinde oldukça koyu sitoplazmalı küçük ve nispeten yassı görünümlü osteoblastların yer aldığı belirlendi (Şekil 3). Embriyonal dönemin bu evresinde özellikle osteoblast hücre katı ile periosteal bölgede, alkalın fosfataz (Şekil 4a) ve ATPaz (Şekil 4b) aktiviteleri yoğundu. Asit fosfataz enzim aktivitesi bu evrede gözlenemedi.

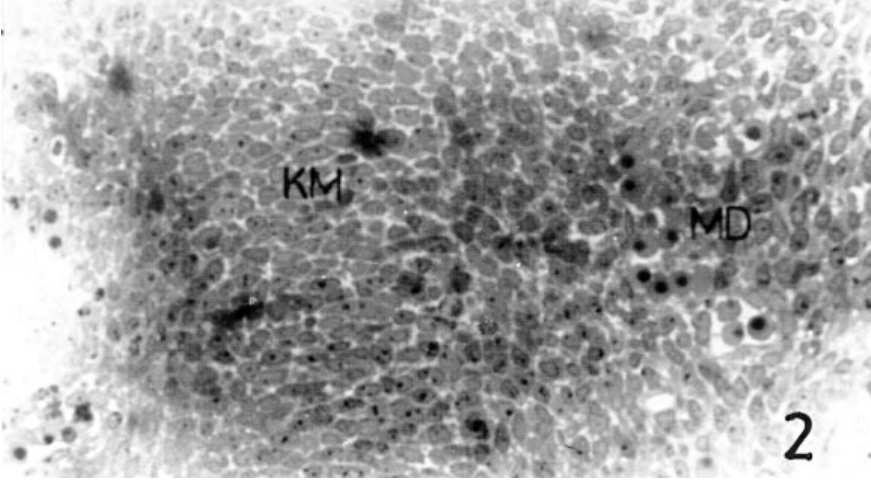
16. günde, kondrosit sitoplazmasında parçalanmaların olması, hücreler arasında yer alan yoğun birikimlerin bulunması dikkat çekiciydi. Bu evrenin en önemli özelliği, osteoblast hücre zonu ile diyafiz kondrositlerin arasında hücreden yoksun (asellüler) bir zonun (*osteoid*) oluşmasıydı. Alizarin kırmızısı boyama metodu ile bu oluşum daha belirgin gözlemlendi (Şekil 5).

17. günde, diyafiz matriksi oldukça düzensiz, bölmeler halinde gözlemlendi. Dejeneratif kondrositler rastgele dağılım gösteriyorlardı. Kemik matriksi belirgindi (Şekil 6). Bu evrede, çalışılan tüm enzim aktiviteleri ileri bir pozitif derece ile gözlemlendi.

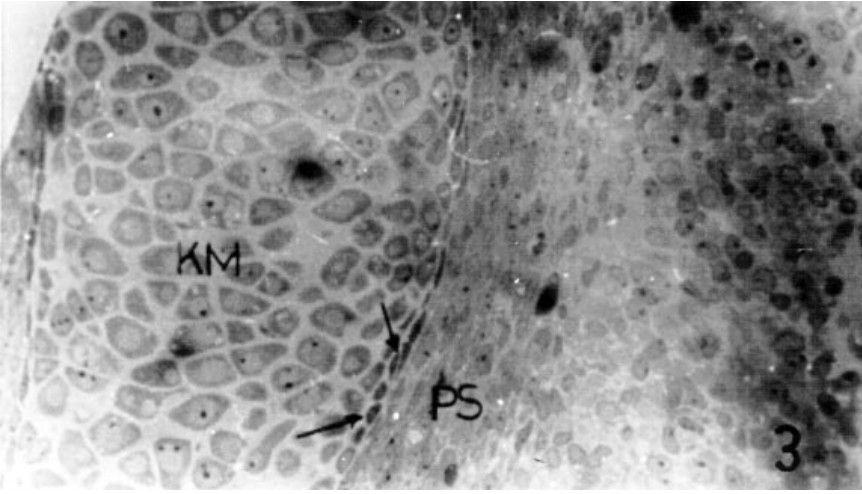
18. günde, kemik trabekülleri arasında damardan zengin alanlar ve kan elemanları belirgindi (Şekil 7).



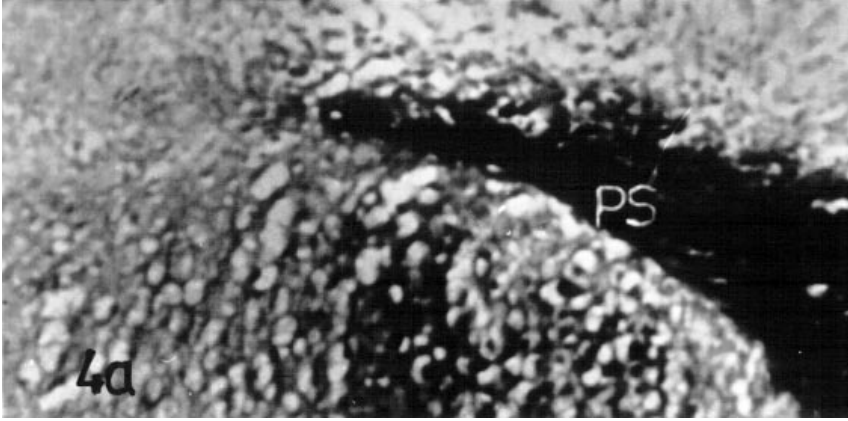
Şekil 1. Humerus kırıkarak modellerinin (k) farklı gebelik günlerine (a-d) göre değişik boyama metodlarıyla (1-4) görünüşleri. Her blok farklı bir gebelik evresini, her blokta aynı rakam numarası aynı boya yöntemini göstermektedir. a= 15 günlük fetüs, b = 16 günlük fetüs, c= 17 günlük fetüs, d= 18 günlük fetüs; 1= Alsiyan mavisi-hematoksilen, 2=periyodik asit Schiff (PAS)-hematoksilen, 3=Alsiyan mavisi-PAS-Hematoksilen, 4=Alizarin kırmızısı, X4.



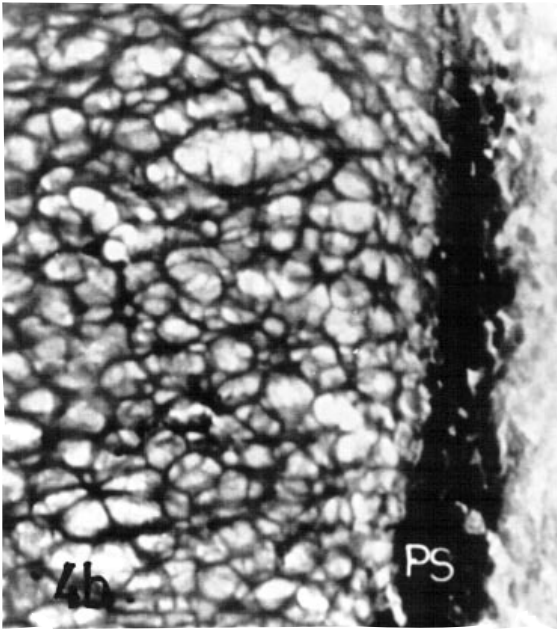
Şekil 2. 14 günlük mezenşimal doku (MD) içerisinde humerusa ait kıkırdak model (KM) gözlenmektedir. Yuvarlak, koyu boyalı hücre dizileri kıkırdak modelin sınırını temsil etmektedir. Araldit kesiti: Toluidin mavisi. X100.



Şekil 3. 15. günde, diyafiz bölgesinde periosteumun (PS) oluştuğu, periosteum ile kıkırdak model (KM) arasındaki tek sıra osteoblastların (oklar) varlığı görülmektedir. Araldit kesiti: Toluidin mavisi. X100.



Şekil 4a.

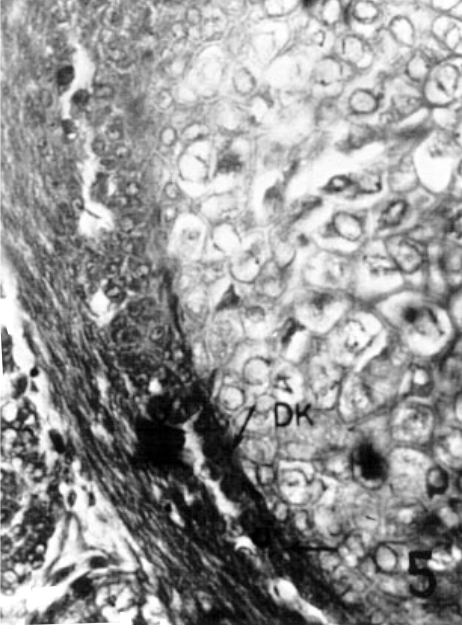


Şekil 4b.

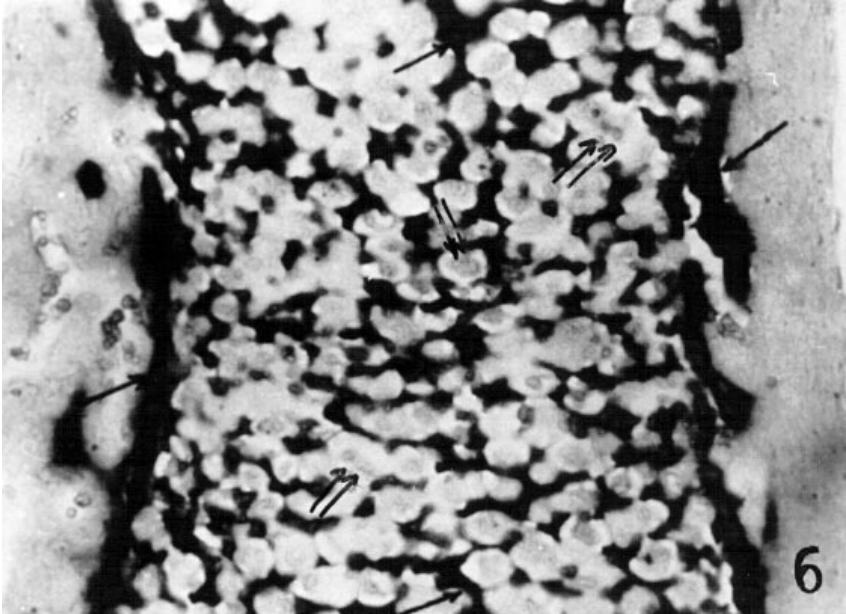
Şekil 4. 15. günde, alkalın fosfataz ve adenozin trifosfataz aktivitelerinin periosteal (PS) bölgelerdeki yoğun görünümü. 4a= Alkalın fosfataz/Alsiyan mavisi; 4b= ATPaz/Alsiyan mavisi. X25.

### Tartışma ve Sonuç

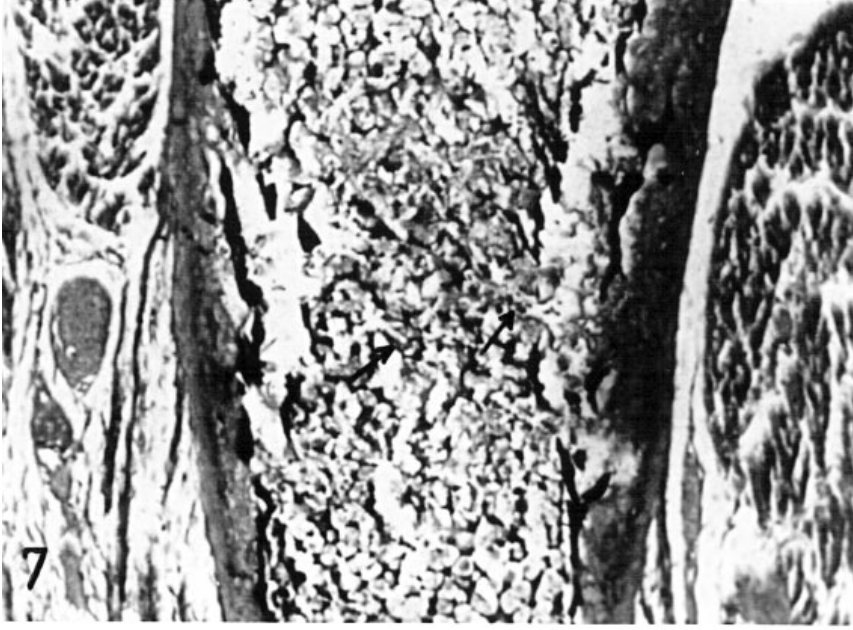
Endokondral kemikleşmenin gerçekleşebilmesi için öncelikle iki ön hazırlığın tamamlanması gerekmektedir; birincisi matriks oluşumu, ikincisi mineralizasyonun gerçekleşmesi (18). Mineralizasyon olayının gerçekleşebilmesi için, önce kıkırdak hücrelerinin hipertrofik hale



Şekil 5. 16 günlük sıçan fetusunda osteoblastik hücre zonu (o) ile diafiz kondrositleri (DK) arasında *osteoid*'in (oklar) ortaya çıkışı. Sitoplazmik dejenerasyon, yoğun birikimler belirgin. Alizarin kırmızısı. X100.



Şekil 6. 17. günde, kemik matriksinin (oklar) düzensiz bölgeler halinde belirginleştiği, rasgele dağılım gösteren dejeneratif kondrositler (çift oklar) görülmektedir. Alizarin kırmızısı. X50.



Şekil 7. 18. günde kemik trabekülleri arasında ve periferde yer alan damardan zengin alanlar ile diğer kan elemanları (oklar) sıklığı dikkat çekiyor. Alsiyan mavisi/PAS. X25.

geçmesi, daha sonra da, alkalın fosfataz ve ATPaz katkısıyla kalsiyum tuzlarının çöktürülmesi gerekmektedir (3-6). Çalışmamızda; gebeliğin 14-15. günlerinde alsiyan mavisi ile kıvrıkdak matrisinin belirgin boyanması matris oluşumunun bu evrede tamamlanmaya başladığına işaretler. Nitekim bu evrede hipertrofik kondrositlerin sadece kemikleşmenin gerçekleşeceği diyafiz bölgesinde yoğunlaşmış olması verilen kaynak bilgileri teyit ediyordu.

Hipertrofik hücreler ve onların matrislerinde yapılan biyokimyasal çalışmalar, bu hücrelerin kollojen, kondroitin sülfat proteoglikanlarını ve özellikle de tip X kollojeni sentezleyip matris salgıladıklarını ve bu tip X kollojenin kemik gelişiminde özel bir önemi olduğunu vurgulamaktadır (19, 20). Hipertrofik kondrositlerin çok belirgin olarak PAS pozitif gözlenmesi glikojen içeriklerinin de artmış olduğunun belirtisidir. Alkalın fosfataz ve ATPaz kemikleşme sürecinde çok önemli görevler yüklenen fosfatazlardır. Alkalın fosfataz plazma membranı üzerinden geçiş süresince enerji transportunda hücre içi sindirimi ve hücrenin salgılama işleminde ve kemikleşme süresi boyunca enerji metabolizmasında rol almaktadır (11, 21-23). Alkalın fosfataz elektrostatik bağlarla kıvrıkdak matrisi içerisindeki kollajene bağlanır. ALP-kollojen kompleksi kemik matrisinde yer alacak iyon kümelerinin çökmesini indükler (11). Bu yüzden, ALP aktivitesi kemikleşmenin ilk basamağını oluşturabilir. Kemikleşme noktalarında ATPaz aktivitesinin varlığı da kalsiyum çökmesiyle ilgilidir. Bu enzimin ayrıca osteoblastlarda mevcut olduğu ve bu hücreler tarafından üretilip matris içine salgılandığı belirtilmektedir (21,



24). 15. günde, diyafiz bölgesinin periosteuma yakın bölgelerdeki alkalın fosfataz ve ATPaz aktivitelerinin yoğun görülmesi de, kemikleşme süreci için gerekli moleküler altyapının hazır olduğunun kanıtı olabilir.

Gebeliğin 16. gününde, alizarin kırmızısı boyama metodu ile hücre yoksunu (aselüler) bir zonun varlığı belirlendi. Bu zon için "osteoid" terimi kullanıldı. Bu zonun kemik gelişimi açısından çok önemli olduğu bilinmektedir ve bu zonu oluşturan hücreler, kıkırdak modeli çeviren perikondriumun iç tarafındaki mezenşimal osteoprogenitör hücrelerin dönüşümü ile ortaya çıkan osteoblastlardır (2). Gözlemlerimize göre, 17. gün ve daha sonraki gebelik günlerinde, modelin periferik kısımlarında kemikleşme işlemi sürerken endokondral bölgelerde de matriksin dejenerasyon işlemi gerçekleşmektedir. Matriks dejenerasyonunda lizozomlarda lokalize olan asit fosfatazın önemi büyüktür. Kıkırdak matriksini dejenere ederek kemikleşmenin ilerlemesi için zemin oluşturur. Kondroklaslarda yer alan bu enzim sayesinde kıkırdak matriks ortadan kaldırılıp yerine kemik matriksi yapılabilmektedir (6, 21). Bu enzim, ayrıca, matriks üretimi yapan hücrelerde de yoğun miktarda gözlenmiştir (25). Gebeliğin son dönemlerinde gerek matriks içerisinde asit fosfataz aktivitesinin varlığı ve gerekse kemik trabeküllerinin arasında vasküler elemanların artışı ossifikasyonun devamı için zemin hazırlama işleminin sürdüğünü, bununla birlikte kemik iliği oluşumu için ön hazırlık yapıldığını gösterebilir. Sonuç olarak; sıçanlarda, humerus kıkırdak modelinde ilk kemikleşme olayının embriyonal döneminin 16. gününden başlayarak ortaya çıktığı ve bu embriyonik süreçte değişik fosfatazların rol aldığı sonucuna varıldı.

## Kaynaklar

1. Osdoby P., Caplan A.I., First Bone Formation in the Developing Chick Limb. Dev. Biol 86: 147-156, 1981.
2. Pechak D.G., Kujawa M.J., Caplan A.I., Morphological and Histochemical Events During First Bone Formation in Embryonic Chick Limbs. Bone 7: 441-458, 1986a.
3. Pechak D.G., Kujawa M.J., Caplan A.I., Morphology of Bone Development and Bone Remodelling in Embryonic Chick Limbs. Bone. 7: 459-472, 1986b.
4. Tian M.Y., Yanagishita M., Hascall V.C., Reddi A.H., Biosynthesis and Fate of Proteoglycans in Cartilage and Bone during Development and Mineralization. Arch. Biochem. Biophys. 247(1): 221-32, 1986.
5. Caplan A.I., Bone Development. Ciba Found. Symp. 136P:3-21, 1988.
6. Üstünel İ. and Demir R., A Histochemical Study on the Enzymatic Activity in the Proximal Epiphysis of the Humerus during the Prenatal and Postnatal Periods in Rats. Anat. Anz. 177(1): 73-83, 1995.
7. Boyan B.D., Schwartz Z., Swain L.D., Matrix Vesicles as a Marker of Endochondral Ossification. Connect. Tissue Res., 24(1): 67-75, 1990.
8. Schwartz Z., Langston G.G., Swain L. D., Boyan B. D., Inhibition of 1,25-(OH)2D3-Dependent Stimulation of Alkaline Phosphatase Activity by A23187 Suggests a Role for Calcium in the Mechanism of Vitamin D Regulation of Chondrocyte Culture. Bone Miner. Res. 6: 709-718, 1991.

9. Schwartz Z., Dennis R., Bonewald L., Swain L.D., Gomez R., Boyan B.D., Differential Regulation of Prostaglandin E2 Synthesis and Phospholipase A2 Activity by 1,25-(OH)2D3 Three Osteoblast-like Cell Lines (MC-3T3-E1, ROS 17/2, and MG-63). *Bone* 13: 51-58, 1992.
10. Fischer G., Die Verteilung und Aktivitat von Enzymen in der Humerusepiphyse von Albinoratten bestimmten Alters. *Acta Anat.* 106: 150-157, 1980.
11. Vittur F., Stagni N., Moro L., de Bernard B., Alkaline Phosphatase Binds to Collagen: A hypothesis on the Mechanism of Extravesicular Mineralization in Epiphyseal Cartilage. *Experientia* 40: 836-837, 1984.
12. Kufnec M.M. and Miller S.A., Alkaline and Acid Phosphatase Activities During Growth of Long Bones and Mandibles. *Calc. Tissue Res.* 9: 173-178, 1972.
13. Kanabe S., Hsu H.H.T., Cecil R.N.A., Anderson H.C., Electron Microscopic Localization of Adenosine Triphosphate (ATP)-Hydrolyzing Activity in Isolated Matrix Vesicles and Reconstituted Vesicles from Calf Cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 462-470, 1983.
14. Simmons D.J., Arsenis C., Whitson S.W., Kahn S.E., Boskey A.L., Gollub N., Mineralization of Rat Epiphyseal Cartilage: A Circadian Rhythm. *Mineral. Electrolyte. Metab.* 9: 28-37, 1983.
15. Valesco A. and Hidalgo J., Cytochemical Localization of Thiamine Pyrophosphatase and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphatase Activities in Rat Epiphyseal Chondrocytes. *Biol. Cell* 59: 161-168, 1987.
16. Bancroft J.D., Enzyme Histochemistry. In: *Theory and Practice of Histological Techniques*, Bancroft J.D., Stevens A., Dawson I.M.P. (eds.), New York, 1977, Churchill Livingstone, pp: 290-296.
17. Pearse A.G.E., *Histochemistry, Theoretical and Applied*, 1980, Churchill Ltd., p: 881.
18. Rooney P., Archer C., Wolpert L., Morphogenesis of Cartilaginous Long Bone Rudiments. In: *The Role of Extracellular Matrix in Development*, R.L. Trelstad, A.R. Liss, (eds.) New York, 1984 pp. 305-322.
19. Claassen H., Kampen W.U., Kirsch T., Localization of Collagens and Alkaline Phosphatase Activity During Mineralization and Ossification of Human First Rib Cartilage. *Histochem. Cell Biol.* 105(3): 213-9, 1996.
20. Poole A.R., and Pidoux I., Immunoelectron Microscopic Studies of Type X Collagen in Endochondral Ossification. *J. Cell Biol.* 109(5): 2547-54, 1989.
21. Akisaka T. and Gay C.V., Ultrastructural Demonstration of p-Nitrophenyl Phosphatase (p-NPPase) Activity in the Epiphyseal Growth Plate. *Acta Histochem. Cytochem.* 19:21-29, 1986.
22. Poole A.R., Matsui Y., Hinek A., Lee E.R., Cartilage Macromolecules and the Calcification of Cartilage Matrix. *Anat. Rec.* 224: 167-179, 1989.
23. Price N.C. and Stevens L., *Fundamentals of Enzymology*, Second Edition, Oxford, New York, pp. 499-515, 1989.
24. Kincaid S.A. and Van Sickle D.C., Effects of Exercise on the Histochemical Changes of Articular Chondrocytes in Adult Dogs. *Am. J. Vet. Res.* 43: 1218-1226, 1981.
25. Nilsen R. and Magnusson B.C., Enzyme Histochemical Studies of Induced Heterotropic Cartilage and Bone Formation in Guinea Pigs with Special Rference to Acid Phosphatase. *Scand. J. Dent. Res.* 89: 491-498, 1981.