

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı

FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ-2 BLOKLAMASININ
TAVUK EMBRİYOSUNDA KRANİAL SÜTÜR GELİŞİMİNE
ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Araştırma Görevlisi Tamay ŞİMŞEK

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Yusuf Kurtuluş Duransoy

Manisa, 2014

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖNSÖZ	
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	4
1. GİRİŞ VE AMAÇ	7
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Kranial Sütürler	9
2.2. Sinostoz Histolojisi	11
2.3. Sinostoz Etiyolojisi	12
2.4. Primer Kraniosinostozlar	12
2.5. Sekonder Kraniosinostozlar	13
2.6. Kraniosinostoz Sınıflandırma	14
2.6.1. Metopik Sinostoz (Trigonosefali)	15
2.6.2. Tek Taraflı Koronal Sinostoz (Plagiyosefali)	16
2.6.3. Bilateral Koronal Sinostoz (Brakisefali)	17
2.6.4. Sagittal Sinostoz (Skafosefali, dolikosefali)	17
2.6.5. Lambdoid Sinostoz	18
2.7. Sütür Biyolojisi	21
2.7.1. Transforming Growth Factor β	21
2.7.2. Fibroblast Growth Factors – Fibroblast Büyüme Faktörleri	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Deney ve Denekler	27
3.2. Laboratuvar Koşulları	29
3.3. Uygulama ve Örneklem	29
3.4. Morfolojik Ölçüm	30
3.5. Parafin Bloklarda Histolojik İnceleme	31
3.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması	32
3.5.2. Mason Trikrom Boyaması	33
3.5.3. Von Kossa Boyaması	33
3.5.4. Alizarin Red Boyaması	34
3.5.5. Morfometrik Skorlama	34
3.6. Parafin Bloklarda İmmünohistokimyasal İnceleme	34
3.6.1. İndirekt İmmünohistokimya	34

3.6.2. TUNEL Boyaması	37
3.7. İstatistiksel Yöntem	39
4. BULGULAR	
4.1. Makroskopik Bulgular	40
4.2. Morfolojik Ölçümler	41
4.3. Histolojik Bulgular	43
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7. KAYNAKLAR	72

TEŞEKKÜR

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim boyunca, bana emeği geçen, bilgi, görgü ve deneyimlerini benimle paylaşan, sıcak ilgi, destek ve yakınlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, gerek beyin cerrahisi sanatını öğrenmemde, gerekse bilimsel açıdan yetişmemde çok değerli katkı ve destekleri ile tüm meslek yaşamım boyunca bana ışık tutacak olan, basta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mehmet SELÇUKİ olmak üzere, çok değerli hocalarım Prof. Dr. Cüneyt TEMİZ, Doç. Dr. Ahmet Şükrü UMUR, Yrd. Doç. Dr. Mustafa BARUTÇUOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Yusuf Kurtuluş DURANSOY ve Uzm. Dr. Mesut METE' ye candan teşekkürlerimi sunarım.

"Fibroblast Büyüme Faktörü -2 Bloklamasının Tavuk Embriyosunda Kranial Sütür Gelişimine Etkileri" konulu uzmanlık tezimin yapılması sırasında bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren her konuda desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Yusuf Kurtuluş DURANSOY'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Nöroşirürji uzmanlık eğitimim sırasında birlikte omuz omuza çalıştığım şu an mezun olan Op. Dr. Seymen ÖZDEMİR' e ve asistan arkadaşlarım, Dr. Güven GÜRSOY, Dr. Ülkün Ünlü ÜNSAL, Dr. Aytaç TAŞKIN' a, bu süreçte birlikte çalıştığım tüm sekreter, servis ve ameliyathane hemşire, teknisyen ve personellerine yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında katkılarını gördüğüm Embriyoloji ve Histoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. M. İbrahim Tuğlu ve asistanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan sevgi ve desteklerini esirgemeyen amaçlarıma ulaşmamda büyük pay sahibi olan rahmetle andığım annem ve babama teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca, beni büyük özveri ve anlayışla destekleyen her zaman yanımda ve arkamda olan eşim Selime'ye, hayatıma anlam katan neşe kaynağım canım kızım Mira 'ya teşekkür ederim.

Tamay ŞİMŞEK

ÖZET

FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ-2 BLOKLAMASININ TAVUK EMBRİYOSUNDA KRANİYAL SÜTÜR GELİŞİMİNE ETKİLERİ

Kranial kubbenin normal büyümesi ve morfogenezi, sütürlerdeki hücre proliferasyonu ile kranial kemiklerin kenarlarındaki osteogenez arasındaki dengeyi yansıtmaktadır. Klinik bir durum olan kraniosinostozda, erken osteojenik farklılaşmadan dolayı sütürler prematür birleşir ve kraniofasiyal malformasyon meydana gelir. Günümüzde, bazı fibroblast büyüme faktör (FGF) reseptör genlerindeki mutasyonlar major kraniosinostotik sendromlar için sorumlu tutulmuştur. Tavuk embriyosu kranial kubbelerindeki endojen FGF-2 ligandlarının seviyelerini manipüle etmek ve morfogenezi bozmak için antikor bloklama yöntemi kullanılmıştır. FGF-2'nin yüksek ve düşük seviyeleri farklı tepkiler verilmesine neden olmaktadır. Bu farklı seviyeler arasındaki denge normal kranial morfogenezi sağlamaktadır. Bu çalışmada, literatür bilgileri ışığında deneysel model olarak tavuk embriyosu gelişimi kullanılarak FGF-2 bloklaması ile kranial sütür gelişimi, deneysel kraniosinostoz oluşumuna etkisi ve kemikleşme öncesi ve sonrasında oluşabilecek değişikliklerin morfolojik, histolojik ve protein düzeyinde incelenmesi amaçlandı. Bu süreçte oksidatif stres ile hücre ölümünün ilişkisi araştırıldı.

Çalışmamızda Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen spesifik patojen içermeyen (SPF, specific pathogen free) 120 adet tavuk yumurtası kullanıldı. Yumurtalar, 37,5°C sıcaklıkta, yaklaşık %60-80 nem orana sahip etüvde inkübe edildi. Dört deney grubu oluşturuldu. Birinci grup kontrol grubu 20 denek. İkinci grup

fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) verilen, üçüncü grup 0,01 µg/ml anti-bFGF-2 ve dördüncü grupta 0,1 µg/ml anti-bFGF-2 ile bloklama yapılan grup olarak oluşturuldu. İkinci üçüncü ve dördüncü gruplar içinde uygulama yapılan günlere göre E2 (2. gün), E4 (4. gün), E6 (6.gün), E8 (8. gün) olmak üzere 4 alt grup oluşturuldu. PBS verilen 2. grupta her alt grup için 5'er adet toplam 20 adet, anti-FGF-2 ile bloklama yapılan 3. ve 4. grupta da her alt grupta 10'ar adet toplam 80 adet denek kullanıldı. Gelişimin farklı aşamalarında anti-temel fibroblast büyüme faktörü-2 (anti basic fibroblast growth factor 2, anti-bFGF-2) uygulandı. Fertilize yumurtalar inkübatörde 15 gün süresince inkübe edilerek 2., 4., 6. ve 8. günlerde her gruba ameliyat mikroskobu yardımı ile 1 doz olmak üzere umbilikal kord etrafına 0,1 ve 0,01µg/ml olacak şekilde PBS içinde antikor ile bloklama uygulandı. E15 günü sakrifiye edildikten sonra alınan örnekler Bouin tespit solüsyonu ile fikse edildi, rutin doku takibine alınarak parafine gömüldü ve 5 µm'lik seri kesitler alındı. Makroskobik gelişim etkilenmesi morfolojik olarak, mikroskobik etkileşim Hematoksilen-Eozin, Mason Trikrom, Vonkossa ve Alizerin Red ile histokimyasal ve oksidatif stres için anti-eNOS, çoğalma için anti-PCNA ve hücre ölümü için TUNEL ile immunositokimyasal yöntemle boyanarak incelendi. Gelişimin makroskobik karşılaştırmaları morfometrik ölçümler ile boyamaların karşılaştırmaları skorlama ile gerçekleştirildi. Farkların ortaya konmasında Graphpad istatistik yazılımı kullanıldı. Tek yönlü ANOVA analizi ile yapılan karşılaştırmalarda $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

E4 ile E8 embriyolarının antikor ile bloklanması sonrasında E15 günü yapılan morfolojik, histolojik ve immunositokimyasal bulgularda beklenen kraniyosnostoz oluşumunun gerçekleşmediği, yerine kıkırdak hâkimiyetinin varlığı saptandı. Örneklerde morfolojik bozukluk, anomali veya gelişme geriliği gibi patolojiler saptanmadı. Antikor bloklaması ile oluşan ancak sistemik yapıyı etkilemeyen FGF-2 için sütürlerdeki eNOS boyaması ile gösterilen oksidatif stres durumunu değiştirerek PCNA ile saptanan çoğalmanın devamına ve apoptoz ile belirlenen hücre ölümüne etki yaptığı

gözlendi. Bu etkilerin en belirgin bir biçimde E8 embriyolarında görüldüğü ve oluşun etkinin ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğı saptandı.

Bulgularımız FGF-2'nin anlamlı ve tekrarlanabilir bir biçimde kranial gelişimde önemli rol oynadığını, blokladığı takdirde sütür kapanmasında gecikmeye neden olduğunu gösterdi. FGF'ün normalde kemik gelişimini hızlandırdığı ancak sütürlerde kapanmayı geciktirdiğı bilgisine paralel olarak bu faktörü bloklamanın kapanmayı erkenleştirmesini beklerken tam tersi bir etkinin varlığı saptandı. Sütür aralarının bu beklenmedik etki ile daha da genişlediğı izlendi. Bu sonuçlar, bloklamaya bağı başka yan etkiler görülmemesi nedeni ile antikor ile bloklamanın kraniyosnostozlarda tedavi amaçlı kullanılabileceğini düşündürdü. Kraniyosnostoz ve fibroblast büyüme faktörü-2 ilişkisinin ve kullanılan oksidatif stres ve apoptoz ilişkisinin ileri teknikler ile daha ayrıntılı incelenmesi bu hastalıktan mağdur olan insanlara daha kaliteli bir yaşam sunmak için önemli bilgiler oluşmasını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Fibroblast Büyüme Faktörü, Tavuk embriyo, kranial sütür, kraniyosinostoz, histoloji, oksidatif stress, apoptoz.

SUMMARY

THE EFFECTS OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR- 2 BLOCKING ON DEVELOPMENT OF CHICK EMBRYO CRANIAL SUTURES

Normal growth and morphogenesis of the cranial dome, reflects the balance between cell proliferation in the cranial sutures and osteogenesis in the bone edges. In craniosynostosis, due to early osteogenic differentiation, sutures closure prematurely and craniofacial malformations occur. Nowadays, mutations in fibroblast growth factor (FGF) receptor's genes have been implicated as a major factor in craniosynostotic syndromes. In chicken embryo cranial dome, antibody blocking method is used to disrupt morphogenesis and to manipulate the endogenous FGF-2 ligand. High and low levels of FGF-2 are caused to different reactions. The balance between these different levels is provided normal cranial morphogenesis. In this study, chicken embryos were used as experimental models. The effects of FGF-2 blocking on development of cranial sutures and experimentally formation of the craniosynostosis were investigated. Also morphological, histological and changings that may occur before and after ossification at the protein level was examined. In this process, the relationship between oxidative stress and cell death was investigated.

In our study, chicken eggs which obtained from Bornova Veterinary Control and Research Institute were used. Eggs were incubated at 37.5 degrees Celsius in the oven for about 60-80% humidity and four experimental groups were formed. First group was control group and consisted 20 eggs. Second group was included sterile phosphate buffered saline and others (group 3 and 4) were FGF-2 blocking groups. Group 3 and 4 were included 0,1 and 0,01 µg/ml anti-bFGF-2 respectively. Second, 3rd and 4th groups subdivided into 4 groups as E2, E4, E6 and E8. While second group included 5 eggs for each subdivision group (total :20 eggs), 3rd and 4 th groups

included 10 eggs for each subdivision groups (total: 80 eggs). In 3rd and 4th group, FGF-2 blocking was done in E2nd, E4th, E6th and E8th days. Anti-basic fibroblast growth factor-2 (anti-bFGF-2) was applied at different stages of development. Fertilized eggs were incubated for 15 days in an incubator and 0.1 and 0.01 µg/ml antibody (in one dose) in PBS was applied under operating microscope around the umbilical cord at 2nd, 4th, 6th and 8th days to each group for blocking. Samples were taken on E15th day after sacrificization and were fixed with Bouin's fixing solution. Tissues were embedded in paraffin according to routine follow-up and 5 µm sectiones were cut. While macroscopic development was examined morphologically, microscopic interactions were evaluated after Hematoxylin-eosin, Mason trichrome, Vonkossa and Alizer Red staining histochemically. Also oxidative stress, proliferation and cell death were examined after immuncytochemically staining with anti-eNOS, anti-PCNA and TUNEL respectively. While comparison of the macroscopic development was done by morphometric measurements, comparison of staining was done by scoring. Graphpad statistical software was used to exposed differences. The comparison was done with the one-way ANOVA test and p value as <0.05 was considered as statistically significant.

Embryos which were blocked with antibody on E4th and E8th days evaluated on E15th day with morphologically, histologically and immunocytochemically. Findings revealed the presence of cartilage sovereignty instead of craniosynostosis. In the examples, pathologies such as morphological disturbance, abnormalities or growth retardation were not detected. We observed that, antibody blocking did not affect the systemic structure. It changed the oxidative stress in sutures which is shown by eNOS staining and affected the continuation of proliferation and cell death which were detected by PCNA and apoptosis respectively. These effects were seen most clearly in the E8th embryos and the difference was statistically significant.

Our findings showed that, FGF-2 plays an important role in the development of the cranium and blocking of FGF-2 causes to delays in the

closure of the sutures. Normally, on the one hand FGF accelerate the normal bone development, on the other cause to delay in suture closure. While our expectation was acceleration of the suture closure by blocking of this factor, opposite effect was observed. The distance between sutures was increased more which was unexpected result. These results suggested that, blocking with antibody can be used for treatment of craniosynostosis. The relationship between craniosynostosis, FGF-2, oxidative stress and apoptosis should be examined in more detail with advanced techniques. So, more important information could be obtained to provide better quality of life to these patients.

Keywords: Fibroblast Growth Factor; Chicken embryo; Cranial sutures; craniosynostosis; histology; oxidative stress; apoptosis.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kranial sütürler, kranial kemiklerin birbirleri ile olan ilişkisini meydana getiren oluşumlar olup kranial kubbenin btnlgn sağlarlar. Kranyumda metopik, koronal, sagital ve lambdoid sütürler yer alır. Metopik sütür gelişimin üç ile dokuzuncu aylarında kapanırken, lambdoid, sagital ve koronal sütürler yirmiiki ile otuzdokuzuncu aylar arasında kapanır. Kranial sütürlerin normalden erken kapanması işlemi kraniyosinostoz olarak adlandırılır.

Karışık ve uzun bir olaylar zincirinde daha alt bir basamak erken sütür kapanmasını başlatmakta, çeşitli büyüme faktörleri de sütürleri etkileyerek parakrin yolla kapanma işlemini organize etmektedir. Transforming growth factor-beta (TGF- β), basic fibroblast growth factor (bFGF) ve insülin like growth factor-II (IGF-2) bu işlemlerde rol oynayan büyüme faktörleri arasındadırlar.

Bu çalışmada tavuk embriyolarında FGF-2 blokaması ile kafa kemiklerinde sütür gelişimine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Embriyonik dokularda endojen FGF seviyelerini manipule etmek için antikor ile bloklama yöntemini kullandık. Çalışmamızda blokama ile azalmış FGF-2 seviyelerine karşı konsantrasyon bağımlı yanıtın gösterilmesini hedefledik. Normal strel büyüme ve morfogenezi sağlayan gelişimsel mekanizmaları inceleyerek, kranial sütürlerin patolojik olarak erken kapanmasını açıklayacak in-vivo deneysel modellerle sağlaması istendi. Bu modellerde kranial morfogeneizde rol alan diğer büyüme faktörleri ve çevresel faktörler değiştirilerek çoğalma ve kemikleşme arasındaki denge yeniden yapılandırılabilir. Çalışmamızda, bu yapılandırmayı sağlayan faktörleri irdelemek sureti ile kranial gelişimde ilgili mekanizmaları daha iyi anlamak ve ilgili klinik durumlar için daha yeterli tedaviler oluşturmak amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Kraniyosinostozların patogeneğinde, karışık ve uzun bir olaylar zincirinde önceki bir basamağın TGF- β ve bFGF gibi çeşitli büyüme faktörlerinin etkisi altında sütürlerin etkilenecek şekilde kapanma işleminde rol oynamaları bulunmaktadır. Bu faktörler kemik metabolizmasının lokal kontrol mekanizmalarında görev yapmaktadır. FGF-2'nin uzun kemikler üzerindeki etkileri hakkında geniş klinik ve deneysel bilgi bulunmakla beraber kranial kemik ve sütürler üzerindeki etkileri ile ilgili bilgi son derece sınırlıdır (1).

Kranial sütürler, kranial kemiklerin birbirleri ile olan ilişkisini meydana getiren oluşumlar olup kranial kubbenin bütünlüğünü sağlarlar. Kranial sütürler, ikinci yaşta kapanan metopik sütür hariç, ikinci veya üçüncü dekadlarda kapanmaya başlar. Kranial sütürlerin normalden erken kapanması işlemi kraniyosinostoz olarak adlandırılır. İnsidansı yaklaşık olarak 2500 canlı doğumda 1 dir. Erken kapanan sütürler kendilerine özgü kafa şekillerini oluştururlar. Virchow Kanunu'na göre kapanan sütür yönüne dik olan doğrultuda kranial büyüme durmakta, açık sütür bölgelerinde ise beyin gelişimini rahatlatacak aşırı büyüme olmaktadır. Büyümekte olan bir çocuğu ve ailesini gerek fiziksel gerekse psikolojik olarak olumsuz etkileyen kraniyosinostozların etyolojileri ve gelişim basamakları hakkında önemli bilgilere ulaşılmakla beraber henüz açıklığa kavuşturulmamış çok sayıda nokta mevcuttur (1,2). Çeşitli büyüme faktörleri sütürleri etkileyerek parakrin yolla kapanma işlemini organize etmektedir. TGF- β , bFGF ve IGF-2 bu işlemlerde rol oynayan büyüme faktörleri arasındadır. Bu çalışmada bir büyüme faktörü olan FGF-2'nin antikor aracılı bloklanması ile tavuk embriyosu kranial sütürlerinin gelişimi üzerindeki etkileri araştırıldı.

2.1. Kranial Sütürler

Kraniyosinostoz bir kranial sütün erken füzyonu veya yokluğu olarak özetlenebilir. Kafatası ve yüz kemiklerinin şekli insanoğlunda güzellik ve estetik kaygılar var olduğundan bu yana dikkati çekmiştir. Kafatası şekilleri ve şekillendirmesi üzerine ilk yazılı belgeleri İÖ 400'de Hipokrat'a ait Orta Avrupa el yazmalarında bulunabilir. Bu yazılarda Hipokrat, kafatası "uzunluğunun" soyluluğa işaret ettiği bir Kuzey Karadeniz halkından bahsetmiş ve kafatası şekillendirmesini bebeklikte yaptıklarını nakletmiştir. Antik Mısır uygarlığında da Tutankamun ve Nefertiti'ye ait büst ve kafatasları incelendiğinde alnı uzun gösterecek şekilde kafatası şekillendirmesine maruz kaldıkları görülmektedir. Yenidünyada da benzer bir soyluluk alameti olarak Maya uygarlığında elit ailelerin çocukluktan itibaren alnı uzun ve düz gösterecek şekilde kafatası şekillendirmesi yaptıkları bilinmektedir (2).

Kemik oluşumu endokondral ve membranöz olarak gerçekleşmektedir. Membranöz kemikleşme direk olarak kemikten, endokondral kemikleşme ise kartilaj üzerinden meydana gelmektedir. Kraniyofasiyal kemikleşme çoğunlukla membranöz olup kondrokranium ve küçük kemikçikler bunun dışında kalır (3). Kraniyosinostozların etyolojileri ve gelişim basamakları hakkında önemli bilgilere ulaşılmakla beraber henüz açıklığa kavuşturulmamış çok sayıda nokta mevcuttur. Crouzon sendromu kranial sütünlerin erken birleşmesi ve anormal bir görünüm ile ortaya çıkan bir durumdur. Sütün birleşmesi ile katılan sütünlerin miktarına bağlı olarak etkilenir. Santral sinir sistemi anomolileri ile birlikte görülür (4).

Kranial kemiklerin birbirleri ile olan ilişkisini oluşturan sütünler, kemiklerin kenarları boyunca uzanır ve ince fibröz bir tabaka ile kemik kubbenin devamlılığını sağlar. Kranial sütünler, doğum sırasında kranial kemiklerin üst üste binmesine izin vererek kafanın doğum kanalından geçişini kolaylaştırır. Oluşan şekil değişikliği doğum sonrası birinci haftada düzeldikten sonra kranial genişleme ve sütünlerin açılması normale döner. Çocuğun büyümesi ile sütünler beyin gelişimine paralel olarak kranial kubbenin büyümesi ve şekillenmesine izin verirler. Kranial sütünlerin testere

dişi şeklindeki yapısı, travma gibi dış kuvvetlerle kemiklerin birbirinden ayrılmasını önler. Erken çocuklukta maruz kalınan minör travmalarda ortaya çıkan mekanik stresler de sütürlerin hafif harekete izin vermesi ile absorbe edilir. Bir veya daha fazla sütürün erken kapanması kraniostenosis olarak adlandırılmaktadır. Kraniosinostoz terimi daha sık kullanılmakla beraber, teknik olarak kraniosinostoz erken sütür kapanması işlemini, kraniostenosis ise ortaya çıkan sonucu tarif etmektedir (5,6).

Sütürler kraniyofasiyal eklemler olup üç ana biyolojik fonksiyonu vardır. Bu bölge ana büyüme bölgesi olup aynı zamanda kafa kemiklerinin birarada tutulmasını sağlar ve ayrıca büyümeye bağlı olarak gelişen mekanik stresleri absorbe ederek büyümenin olduğu osteojenik dokuları korur ve gelişim ilerledikçe daha da sertleşirler. Sinostoz ile ilgili asıl mekanizmalar henüz anlaşılmamış olup hayvan modellerinde bir hipotez olarak kemik köprüleşmesi ile kapanma şeklinde kraniyofasiyal sütür kaynaşması olarak düşünülmüştür. Bu modelde osteoblast yeni doku oluşumu için ortamda bulunmasına karşın sütür alanına geçmez ve bu sütür alanında kemik dokuyu uzaklaştıracak olan osteoklastlar bulunur. Normalde osteoklastın bulunmaması nedeniyle uzaklaştırılmayan kemik dokusu küçük spiküller şeklinde birleşmeye başlar ve sonuç olarak kırılmadığı için kemikleşmeyi gerçekleştirir. Önceki çalışmalarda kraniyosinostozun bir noktada başladığı bu noktanın ön, arka veya ortada bir yerde olabileceği ve buradan tüm sütüre yayılacağı düşünülmüştür. Küçük bir noktada başlayan spiküller arasındaki birleşme bütün sütürün kapanmasını sağlamaktadır. Bu şekilde kapanma defektine bir örnek olarak gösterilen Crouzon sendromunda kafa şeklinin oluşması farklı sütürlerin zamana ve duruma bağlı olarak kaynaşmasıyla gerçekleşir. Normal gelişimde doğum sonrası kraniyofasiyal büyüme kemiğin yer değiştirme ve yeniden yapılanmasıyla olur. Yeniden yapılanma her bir kemik için şekil açısından önemli olurken yer değiştirme sütür fonksiyonu ile ilgilidir. Prematür kraniyosinostozlarda prematür kranial sütürlerin kaynaşması normal kemik yer değişmesini bozarak etkilenen bölgelerde kalıcı sütürlerin oluşmasını sağlar. Bu şekilde anormal büyüme yapısı oluşur (6,7,8).

2.2. Sinostoz Histolojisi

Kraniyosinostoz genellikle bir veya iki kranial sütürün erken kapanması Şeklinde tanımlanır. Esas olarak konjenital malformasyonlar, ikincil olarak da metabolik bozukluklardan hematolojik bozukluklara uzanan geniş bir patolojik durumla iliŐkilidir. Sütürlerin kemiklerle iliŐkisine bağlı olarak gerŐekleŐen sreŐte beynin bu duruma uyum sağlayamaması sorun oluŐturmakta ve hayatın ilk iki yılında asıl kemiksel genişleme gerŐekleŐmektedir. Ancak bütün sütürlerin kemikleŐmesi yetiŐkinliėe kadar sürmektedir (9).

Kraniyosinostozlar bir noktadan baŐlayarak sütür hattı boyunca ilerlediği iÇin hat boyunca değişik derecelerde kapanma alanları saptanabilir (10). Kapanmanın tam olduğu kısımlarda, sütür boŐluėu boyunca non-lameller kemik iÇeren, tam kemiksel daralma alanı görülür. Tam kapanma alanının yakınılarında, bazı sütür bağ dokusu elemanlarının eşlik ettiği non-lameller kemik dokusu oluşumu ile seyreden kısmi kapanma alanları izlenir. Daha distal bölgelerde, kemik kenarlarında belirgin değişikliklerin oluştuğu ve sütürün bağ dokusu kısmında daralma ile seyreden, kemikleŐmek üzere olan bir alan tespit edilir. Kemikleşmenin olmadığı bölgelerde ise sütür boŐluėunda belirgin bağ dokusu iÇeren alanlar görülmektedir.

Tavuk modelinde kranial kemiklerin oluşumu incelendiğinde gelişimin 10. gününde Çenede ve kafanın oksipital bölgesinde bir kısım kırıkta oluşumunun başladığı ancak kemikleşmenin olmadığı gösterilmiştir. Dört gün sonrasında Çenede bir miktar kemik farklılaşması baŐlasa da kafada hala az miktarda olmaktadır. Gzn hemen yanındaki bölge ile oksipital bölgede kŐk yoėunlaŐmıŐ mezenkimal bölgeler görülmektedir. On altıncı güne ulaŐıldıėında kafada iki ayırt edilebilir kemik görülür ve frontal ve pariyetal olarak isimlendirilir. Kafanın merkezinde hala kocaman bir alan farklılaŐmamıŐ mezenkimal olarak kuluŐkadan sonrasına kadar kalır. Onaltıncı günde sütür kelimesinin kullanılması kemikleşme alanlarının arasındaki farklılaŐmamıŐ dokular nedeniyle Çok doğru olamayabilir. Buralarda sütür diyebileceğimiz yapılar henüz oluŐmamıŐtır. Bemmell ve

arkadaşlarının yaptıkları çalışmada onuncu gün özellikle seçilmiş ve çok az miktarda kemik farklılaşmasının görüldüğü sınır olarak kabul edilmiştir (9).

2.3. Sinostoz Etiyolojisi

Sütür kapanması vasküler, hormonal, genetik, mekanik ve lokal faktörlerden etkilenmektedir. Ancak erken sütür kapanmasının kesin sebebi halen bilinmemektedir. Kraniosinostozlar etioloji ve patogenezi açısından heterojenite içermektedir. Değişik etiolojik faktörler değişik patogenezi mekanizmaları üzerinden benzer fenotipik görüntüye yol açabilmektedir (Tablo 2.3.1).

Tablo 2.3.1: Kraniosinostozların etiolojik ve patogenetik heterojeniteleri (11).

ETYOLOJİ	PATOGENEZ	FENOTİP
Otozomal dominant gen	→ Mezenşimal blastema	→→→→
Hipertiroidizm	→→→ Hızlanmış kemik maturasyonu	→ Kraniosinostoz
Mikrosefali	→→→→→ Sütürler arası gerim	→→→→ kuvvetinin azalması

2.4. Primer Kraniosinostozlar

Monojenik sebepler: Basit kraniosinostozların önemli bir kısmı sporadik olmakla beraber ailevi etiolojiye sahip olanlara da rastlanmaktadır. Kraniosinostozlu hastaların %8'inde aile öyküsünün pozitif olduğu gösterilmiştir. Otozomal dominant kalıtım genel olarak rastlanan kalıtım tipidir. Kromozomal patolojiler: Çok değişik kromozomal patolojilerin kraniosinostozlara eşlik ettiği gösterilmiştir. Bazılarında kraniosinostozlara sık olarak rastlanırken, bazılarında kraniosinostozlar nadir olarak görülmektedir (12,25).

2.5. Sekonder Kraniosinostozlar

Primer kraniosinostozlar daha sık görülmekte ve bir veya daha çok sütünü etkileyebilmektedirler. Sekonder kraniosinostozlarda ise tanı konulan başka bir patoloji sinostoza yol açmaktadır. Hipertiroidizm: Hipotiroidi için tiroid hormon tedavisi gören veya tirotoksik guatr olan hastalarda kranial sütünlerin erken kapanması gözlenen bir bulgudur. Rikets: Kraniosinostoz, değişik etyolojik nedenlerle ortaya çıkan rikets hastalarında rapor edilmiştir. Hastalığın şiddeti sinostozun gelişim ve şiddeti ile doğru orantılıdır. Riketsin başlama yaşı da kraniosinostoz şiddetini arttırmaktadır. Yüksek alkalin fosfataz değerleri de kraniosinostoz sıklığını doğru orantılı olarak etkilemektedir. Mukopolisakkaridoz ve Mukolipidozlar: Kraniosinostozlar; Hurler sendromu, Morquio sendromu, β -glukuronidaz eksikliği, Mukolipiozis III ve α -mannozidaz eksikliği gibi çeşitli mukopolisakkaridoz ve mukolipidozların eşlik eden bir bulgusudur. Hematolojik bozukluklar: Talasemiler, orak hücreli anemi, konjenital hemolitik ikter ve polisitemi vera gibi hematolojik bozukluklarda kraniosinostoz ortaya çıkabilmektedir. Kemik iliği hiperplazisi ve kompensatuar kemik büyümesi kalvarial sütünleri erken kapatabilmektedir. Teratojenler: Difenilhidantoin, retinoidler, valproat, aminopterin, flukonazol ve siklofosfamide bağlı olarak gelişen kraniosinostozlar bildirilmiştir. Holoprosensefali: Metopik sütünün yokluğu holoprosensefaliye eşlik eden bir bulgudur. Mikrosefali: Merkezi sinir sisteminin büyümemesi sütünlere etki eden streslerde azalma yaratacağından sinostoza yol açmaktadır. Kranial sütünler tamamen kapanmakta veya zor olarak seçilebilmektedir. Artmış intrakranial basınç bulgusuna rastlanmamakta ve kalvaryal kemikler kalınlaşmaktadır. Kraniosinostozlar zaman zaman ensefalosellere eşlik etmektedir. Ensefalosel, sütünlere etki eden büyüme streslerini azaltarak sinostoza neden olabilmektedir. Eşlik eden hidrosefali varlığında şantlarla basınç azaltılması sonucunda da benzer bir etyoloji ile sinostoz gelişebilmektedir. Sendromlarda ensefalosel ve kraniosinostoz aynı mutant genin etkisi sonucu birlikte ortaya çıkabilmektedir. Şant takılan hidrosefali hastalarında kemiklerin ve sütünlerin

genişlemesini stimüle eden kuvvetlerin şantlar aracılığı ile ani olarak azaltılması sonucu ortaya çıkmış kraniyosinostoz olguları bildirilmiştir (12).

2.6. Kraniyosinostoz Sınıflandırması

Kraniyosinostozları sınıflandırmada farklı yaklaşımlar kullanılmıştır. Füzyone uğramış sütür sayısı göz önüne alınarak yalnız tek sütür ise izole, birden fazla sütür füzyone ise kompleks şeklinde sınıflandırılabilirler (13). Bir diğer sınıflandırma yöntemi tanımlı bir kraniyofasyal sendromun varlığı veya yokluğu ileler. Eğer herhangi bir ekstrakranial patoloji eşlik etmiyorsa sendromik olmayan veya izole olarak sınıflandırılabilirdiği gibi ekstrakranial patolojileri de içeren kraniyosinostoz ile ilişkili 180'den fazla sendrom tanımlanmıştır ve bunlar sendromik olarak sınıflandırılırlar (13). En sık karşılaşılan sendromik tipteki kraniyosinostozlar Tablo 2.6.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.6.1: Sendromik kraniyosinostozların fenotipik ve genotipik özellikleri (13).

Sendrom	Diğer semptom ve bulgular	İlişkili gen
Crouzon Sendromu	Hipertelorizm, belirgin kemerli burun, düz yüz görünümü	FGFR2, FGFR3
Apert Sendromu	Füzyone el veya ayak parmakları, düz orta yüz yapıları	FGFR2
Crouzonodemosk eletal Sendrom	Hipertelorizm, belirgin kemerli burun, düz yüz görünümü, kadifemsi cilt kıvrımları, omurga anomalileri, çenede bening lezyonlar	FGFR3
Jackson- Weiss Sendromu	Büyük kemerli tırnaklar, düz orta yüz yapıları	FGFR1,FGFR2
Muenke Sendromu	Koronal sinostoz, el veya ayakta iskelet anomalileri, işitme kaybı	FGFR3
Pfeiffer Sendromu	Geniş kısa el parmakları yada büyük ayak baş parmakları, füzyone el veya ayak parmakları	FGFR1, FGFR2
Loeys-Dietz Sendromu	Hipertelorizm, yarık damak dudak, arteriel tortuozite, aortik dilatasyon, anevrizmalar	TGFBR1, TGFBR2, SMAD3
Saethre-Chatzen Sendromu	Fasyal asimetri, düşük frontal saç çizgisi, ptozis, füzyone el ve ayak parmakları, geniş büyük ayak parmakları	TWIST
Shprintzen-Goldberg Sendromu	Ekzoftalmus, düz yüz görünümü, herniler, uzun ince parmaklar, zihinsel ve bedensel gelişim geriliği	FBN1

Daha sık kullanılan başka bir sınıflandırma ise fenotipik sınıflandırmadır. Fenotipik sınıflandırma temelde Virchow kanunlarının işleyişine göre kalvaryal kemiklerin füzyonu, büyümesi ve şekillenmesine göre isimlendirilir. Virchow 1851 yılında erken füzyone olan sütürün neden olduğu sonuçları değerlendirdi. Buna göre erken füzyon olmuş sütüre dikey olacak şekilde kalvaryal büyümede gerilik ve paralel olacak şekilde büyümenin devam ettiği yorumunu yaptı (14). Virchow kanunu olarak da bilinen bu gözlem ile erken füzyone olmuş sütürlerin neden olabileceği deformiteler ön görülebilir ancak kompanse edici tüm büyüme modellerini içermediğinden 4 kural şeklinde modifiye edilmiştir:

1. Füzyone olmuş sütüre bağlı olan kalvaryal kemikler azalmış büyüme potansiyeline sahip tek bir kemik plaka gibi davranır.

2. Sütürlerde asimetrik kemik depozisyonu kemik plakada dış sınırı boyunca oluşur.

3. Füzyone olmuş sütürle ilişkisiz sütürler, sütür hattı boyunca kemik depozisyonlarını simetrik yaparlar.

4. Füzyone olmuş sütürle ilişkili sütürler dengeleyici şekilde açılırlar.

Sendromik olmayan kraniyosinostozlar aşağıdaki gibi sıralanır.

2.6.1. Metopik sinostoz (Trigonosefali): Trigonosefali metopik sütürün erken kapanması sonucu oluşan fenotipik görünümün ismidir (15,16). Sivrileşmiş alın, azalmış frontonazal açı ve daralmış bitemporal mesafe izlenir. Orta seviyede hipotelorizm olabilir. Dünya çapında tüm yeni doğanlarda, sıklığı ülkeden ülkeye farklılık göstermekle beraber, 1/700 ile 1/15000 arasında görülebilir ve erkek bebeklerde kız bebeklere görece 2/1 ila 6,5/1 arasında değişen oranlarda sık görülür (17,18,19). Cerrahisinde temel hedef frontal sivrileşmeyi düzelterip frontoorbital rekonstrüksiyon yaparak, alnın ve orbitanın genişlemesini sağlamaktır. Sonuçta azalmış anterior kranial fossa hacmini arttırmak ve hipotelorizmi düzeltmek gerekmektedir. Cerrahisinde temel hedef frontal sivrileşmeyi düzelterip fronto-orbital

rekonstrüksiyon yaparak, alnın ve orbitanın genişlemesini sağlamaktır. Sonuçta azalmış anterior kranial fossa hacmini arttırmak ve hipotelorizmi düzeltmek gerekmektedir. Bir yaşından küçük çocuklarda cerrahi kemik yapılar şekillendirmeye daha müsait olduğundan üç yaşından büyük çocuklara göre farklıdır. Buna göre hasta supin pozisyonda cerrahiye alınır. Bikoronal insizyon yapılır. Sonrasında subperiostal disseksiyon mümkünse periosta zarar vermeden dikkatlice yapılmalıdır. Cilt insizyonu sırasında hemostaza dikkat edilmesi önerilir. Özellikle bir yaşından küçük çocuklarda basit bir cilt kanaması dahi hipovolemiye yol açabilir ve katastrofik sonuçlar doğurabilir. Sonrasında koronal sütürlerin önünden supraorbital rimin 1 cm üzerine gelecek şekilde bifrontal kraniyotomi yapılır. Supraorbital rimler de bilateral supraorbital rim osteotomisi ile eksize edilir. Kemik yapılar kaldırılırken de özellikle sagittal sinüs trasesine dikkat edilmeli hemostaz gözden kaçırılmamalıdır. Sonrasında modellemeye başlanır. Modelleme “yeşil ağaç kırığı” şeklinde yapılır. Frontal kemik ve supraorbital rim şekillendirildikten sonra yeniden yerleştirilir (17,18,19).

2.6.2. Tek taraflı koronal sinostoz (Plagiyosefali): Tek taraflı koronal sinostoz olarak özetlenebilecek bu anomalide sağ ve sol arasında fark olduğundan kafatasına ilaveten yüz anomalileri de eşlik eder (15). Anomalinin ciddiyeti eşlik eden sfenofrontal, sfenoetmoid ve sfenozygomatik sütürlerin de sinostozu ile artar. Aynı tarafta alın ve pariyetal bölgede düzleşme, karşı frontal kemikte çıkıklaşma, ve aynı taraf skuamöz temporal bölgede belirginleşmeye yol açar. Etkilenen tarafta sfenoid kanat anterosuperiora yer değiştirir. Sonuçta orbita superoinferiora elonge olur. Burun kökü etkilenmiş tarafa deviye olur. Aynı taraf superior oblik parezisi, strabismus ve kafanın tilti sık görülür. Kısalmış ön kafa tabanı posteriora yer değiştirmiş orbita tavanına yol açar ve strabismusa neden olur. Ancak unutulmamalıdır ki strabismus kraniyofasyal düzeltme ile nadiren düzelir. Cerrahide amaç alın ve orbitada simetriyi sağlamaktır (20). Bir yaşından küçük çocuklarda temporal kas korunarak bifrontal kraniyotomi yapılır. Bilateral orbital tavan osteotomisinin ardından orbital rimler simetriyi sağlayacak şekilde düzeltilir. Aynı taraf pterion frontosfenoid sütürden

rezeke edildikten sonra komposit temporal flep füzyona uğramış sütünre doğru yükseltilir. Modelleme yapılan orbital rimler ve frontal kemik fikse edilir. Temporal flep orbital rimlere fikse edilmelidir. Üç yaşından büyük çocuklarda bifrontal kraniyotomi yapıldıktan sonra modelleme paralel şeritler halinde düzenlenen fleplerin fiksasyonu yolu ile yapılır. Supraorbital rim ilerletilmesine kemik yapısına göre karar verilmelidir (21,22,23).

2.6.3. Bilateral koronal sinostoz (Brakisefali): Bilateral koronal sinostoz izole veya sendromik olarak görülebilir. Genişlemiş supraorbital rim, düz, elonge frontal kemik, oksiputta düzleşme, bitemporal protrüzyon, anteriora kaymış verteks elonge kafatası ve Harlequin deformiteleri gösterir. Bir yaşından küçük çocuklarda cerrahisi yapılırken bifrontal ve bipariyeto-oksipital kraniyotomiler yapılır. Her iki kemik flebe de fıçı benzeri osteotomiler yapıldıktan sonra bilateral supraorbital rim osteotomisi yapılır ve yükseklik kazandırılır. Üç yaşından büyük çocuklarda ise yükseklik kazandırma ve fıçı benzeri osteotomiler genç hastalarla benzer olmakla beraber tatmin edici sonuçlar yakalamak daha zordur (21,22,23).

2.6.4. Sagittal sinostoz (Skafosefali, Dolikosefali): Yunanca “kayık kafa” anlamına gelen bu anomalide sagittal sinostoz görülür. Sonuç itibarı ile kafa ön-arka eksen boyunca büyüyebilir. Anterior, posterior veya “golf topu ayağı” deformiteleri gibi alt tipleri bulunur. Orbital deformite izlenmez (15). Bir yaşından küçük çocuklarda bifrontal, ayrı ayrı olan bipariyetal, bioksipital kraniyotomiler yapıldıktan sonra modelleme yapılır. Laterale fıçı tahtası benzeri kafatasının genişlemesine izin verecek şekilde osteotomiler yapılırken, oksipital çıkıntıyı düzeltecek şekilde oksipital kemiğe modelleme yapılır. Orta hatta kalan kemik kısaltılır ve frontal çıkıntıyı önleyecek şekilde frontal modelleme yapılır. İnferolateral frontal kemik rezeke edilir. Bipariyetal modelleme yapılır. Sonrasında modelleme yapılan kemikler kısaltılmış orta hattaki kemiğe sabitlenir. Üç yaşından büyük çocuklarda geniş kemik yapıları modellemek zor olacağından sagittal sütünre dik olacak şekilde ardışık kemik greftler alınır ve iç yüzleri çentiklenir. Modelleme sonrası ardışık kemikler birbirlerine fikse edilir (17,18,23).

2.6.5. Lambdoid sinostoz: Bu tip sinostozda 3 temel deformite vardır. Oksipital deformite lambdoid sütünün tek veya çift taraflı füzyonona bağlı olarak gelişen, tek veya çift taraflı düzleşme, asimetric veya simetric frontal kabarıklık ve kafatası yüksekliğinde artış. Ciddi lambdoid sinostozun erken dönemde ortaya çıkması nedeni ile genellikle bir yaş öncesinde tedavi edilir. Cerrahi temeller ayrıca diğer yaş gruplarına da modifiye edilerek uygulanabilir. Eğer anomali pariyeto-oksipital bölgede sınırlı ise bikoronal insizyon ile girilir, diseksiyon ile foramen magnum arka kenarına kadar ulaşılır. Transfers sinüs altına incek şekilde oksipital kemiğe osteotomiler yapılır, parçalar bükülerek hazırlanır. Bilateral parieto-oksipital kemik greftde radyal osteotomiler ile şekillendirilip duraya tespit edilir. Yeni oluşturulan sütündeki aralık 5-10 mm olmalıdır. Eğer anomali frontal kemikte de deformite ile birlikte ise bifrontal kraniotomi de eklenmelidir. Bu deformitelere ek olarak kule kafa deformitesi de varsa daha önce tarif edildiği gibi intrakranial basınç monitörizasyonu eşliğinde yükseklik azaltılması da yapılmalıdır. Bilateral koronal sinostozda uygulanan teknik uygulanır ancak verteksin kaydırılması gerekmez. Posteriyor pariyetal ve anteriyor oksipital kemik kısımları arasındaki açıklık en az 5-10 mm olmalıdır (17,22,23). Sütlere göre kraniyosinostoz sınıflandırılması Tablo 2.6.2 de özetlenmiştir.

Tablo 2.6.2: Sütlere göre kraniyosinostoz sınıflandırması.

Klinik Tanımlama	Etkilenen Sütün	Kafa Şekli
Skafosefali, Sindolikosefali	Sagital	Uzamış (ön-arka)
Plagiyosefali	Unikoronal	Asimetric frontal düzleşme
Trigonosefali	Metopik	Sivrileşmiş alın, azalmış frontonazal açı
Posterior Plagiyosefali	Lambdoid	Asimetric oksipital düzleşme
Brakisefali	Bikoronal	Sferik
Akrosefali Sinoksisefali	Bikoronal / Multiple	Kule kafa

Yaklaşık olarak kraniyosinostozların %40'ı sendromiktir; yaygın olanlar arasında Apert, Crouzon, Pfeiffer, Muenke ve Saethre-Chotzen sendromları

vardır (25). Bunlara klinik bulgularla tanı koyulur ve genetik testler ve direk grafi, bilgisayarlı tomografi ve/veya manyetik rezonans görüntüleme gibi kafatası görüntüleme yöntemleri ile konfirme edilir. Crouzon sendromu, 25.000 doğumda 1 meydana gelen, en yaygın sendromlardan biridir (26). Crouzon 1912'de sendromun bulgularını şu şekilde tanımlamıştır; sinostoz, hipertelorizm, egzoftalmi, papağan-gagası burun, kısa üst dudak ve rölatif mandibular prognatizm (27). Bikoronal sinostoz sıklıkla meydana gelir ama diğer sütürler de eşlik edebilir ya da unikoronal sütür bulunabilir (28,29). Sütürler her zaman doğumda birleşmiş olmayabilir ama doğumdan sonraki birkaç yılda füzyona progrese olur, bu da klinik tanıyı bazı durumlarda geciktirir. Crouzon sendromu, diğer sendromların aksine, klinik olarak anormal ekstrakraniyal bulgulara sahip değildir ki bu da ayırıcı tanıda Apert veya Pfeiffer sendromunu dışlamada yararlıdır (26).

Pfeiffer sendromu 100.000 doğumda 1 meydana gelir ve semptomları 1964'te Pfeiffer tarafından tarif edilmiştir ki bunlar arasında; brakioyosefalili koronal sinostoz (sagittal birliktelik var ya da yok), maksillar hipoplazi, hipertelorizm, proptosis, basık burun kökü, koanal stenozis veya atrezi, parsiyel sindaktili vardır (30,31). Pfeiffer sendromu geniş başparmak ve parmaklar gibi ekstrakranial bulgulara da sahiptir ki bunlar Apert sendromundan ayırıcı tanı da yararlıdır (26,30,31,32). İlginçtir ki, FGF-2-C278F ve FGFR2-C342Y gibi Pfeiffer sendromunda bulunan birçok nokta mutasyonu, Crouzon sendromunda da bulunur (33). Pfeiffer sendromu ekstra semptom ve prognozlar gösteren 3 klinik tipe ayrılır. Tip 1, normal nörolojik fonksiyon ve iyi prognozlu gelişimle alakalıdır. Tip 2, üç loblu kafatası deformitesi (yonca yaprağı kafa) daha belirgin proptosis, dirsek ankilozu veya stenozu, solunum güçlükleri, gelişim geriliği ve nörolojik komplikasyonları içerir ki bu da hayatta kalma için kötü prognoza neden olur. Tip 3, Tip 2'ye benzer ama yonca yaprağı kafatası yoktur (30).

Kraniyosinostoz artmış kafa içi basınç riskini artmasıyla alakalıdır; tek sütür sinostozu %15-20 risk taşıırken sendromik kraniyosinostozlar %30-40 risk taşımaktadır (34). Kraniyosinostozu takiben azalmış kafatası volümünün

de bulunduğu, kafa içi basıncı arttırıcı faktörlerin, kafa içi basıncı arttırmasıyla, kafatasında, beyinde ve altında uzanan optik sinir gibi sinirlerde bası meydana gelir. Bu görmenin, bilinç ve motor fonksiyonların ve gelişimin kaybı veya zarar görmesiyle sonuçlanabilir, bu yüzden kafa içi basıncı artışıını monitörize etmek ve artmış kafa içi basıncı azaltmak için tedavi etmek birincil önceliğimizdir (35). Kafa içi basıncı artışının gelişimi yavaş, sinsi bir süreç olabilir, bu yüzden düzenli oftalmolojik kontroller tavsiye edilmektedir (26,36,37). Beyin gelişimindeki primer defektlerden bağımsız olarak kafa içi basıncı artışının mental geriliğe yol açtığı hala tartışma konusudur. Kraniosinostozun tedavisi, kafatası dismorfolojilerini düzeltmek ve yüksek kafa içi basıncını düşürmek amacıyla cerrahidir, eğer tedavi edilmezse, mental gelişimde ve görmede hasar meydana gelebilir. Cerrahi teknikler, sütürlere ve diğer kraniyal bulgulara göre değişiklik gösterirler (38).

Tablo 2.6.3: Kraniosinostozlarda cerrahi tedavi (26).

Klinik	Cerrahi
Skafosefali	Tam rekonstrüksiyon
Sindaktilosefali	Basit kraniyektomi
Plagiyosefali	Fronto-orbital rekonstrüksiyon
Trigonosefali	Fronto-orbital rekonstrüksiyon
Brakisefali	Kemik ilerletme

2.7. Sütür Biyolojisi

Kraniosinostoz sendromunun genetik ilişkisi birçok çalışmada gösterilmiş ve çoğunlukla otozomal kalıtım bulunduğu gözlenmiştir. Doksanlı yıllarda ilk olarak FGF ve FGFR2 için genetik mutasyon olduğu gösterilmiş ve onuncu kromozomda lokalize olduğu saptanmıştır. Hemen arkasından FGFR1 ve FGFR2 için 8. kromozom, FGFR3 için de 4. kromozom ile ilişkili mutasyonlar saptanmıştır. Her ne kadar kafa kemiklerinin gelişmesi sırasında FGF ve FGFR dağılımları tam olarak bilinmese de mutasyonları ile

kraniosinostoz ilişkisi ortaya konmuş olup sadece FGFR4'ün kraniosinostozla ilişkili olmadığı saptanmıştır (39,40,41,42,43,44,45).

2.7.1. Transforming Growth Factor- β

TGF- β ailesi, yirmiden fazla değişik molekülden oluşan ve normal büyüme ve gelişmede hücre farklılaşması, hareketlilik, organizasyon ve ölüm gibi anahtar olaylarda rol oynayan bir polipeptid grubudur (46). Bunlar TGF- β , Bone Morphogenic Protein (BMP) ve aktivinler olarak üç ana grupta sınıflandırılmışlardır. TGF- β 'nin en önemli etkisi osteoblastik farklılaşmayı ve matriks oluşumunu indüklemesidir. TGF- β , osteoid oluşumunu stimüle etmekle beraber mineralizasyonu inhibe eder. BMP, yapısal benzerliği nedeniyle aynı aileye dahil olmakla beraber farklı etkilere sahiptir ve örneğin mineralizasyonu stimüle eder. BMP'lerin fetal kemik oluşumu ve gelişiminde rol oynadığı, TGF- β 'nin da gelişmiş kemiklerde ve yeniden şekillenmede rol oynadığı düşünülmektedir. TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 izoformlarının gelişmekte olan rat kranial sütürleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada sütürlerin kapanma aşamasında TGF- β 1 ve TGF- β 2 aktivitelerinin devam ettiği ancak TGF- β 3 aktivitesinde azalma olduğu saptanmıştır. Açık olan sütürlerde ise TGF- β 3 immünreaktivitesinde artış, TGF- β 1 ve TGF- β 2 aktivitelerinde ise azalma olduğu gösterilmiştir. Üç izoform içinde TGF- β 2 immün reaktivitesinin aktif olarak kapanmakta olan sütürlerde en belirgin aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır (47). TGF- β 'nin sütürlerin erken kapanmasında ikincil bir rolü olduğu düşünülmektedir. Karışık bir olaylar zincirinde daha erken bir basamağın kapanmayı tetiklediği, TGF- β 'nin bu zincir içindeki rolünün kesin olduğu ancak kraniosinostozlar için primer bir faktör olmadığı düşünülmektedir (41,12,48).

2.7.2. Fibroblast Growth Factors–Fibroblast Büyüme Faktörleri

FGF'ler yüksek benzerlikli 140 amino asidin merkezi çekirdeği tarafından tanımlanan ve heparin ve heparin-benzeri glikozaminoglikanlara

(Heparin-like glycosaminoglycans, HLGAG) güçlü affinitesi olan, yapısal bağlantılı polipeptid ailesidir (49,50). Şimdilik bilinen 25 tane FGF vardır ki bunların 22'si insanda keşfedilmiştir. Ayrıca FGF 1-23 ile farede keşfedilen FGF-15 hariç olarak bulunmuştur (51,52). FGF ailesi, yapısal olarak benzer 20 polipeptid mitojenden oluşan bir gruptur. İlk olarak mezodermal kaynaklı hücreler için mitojenik oldukları gösterilmişse de daha sonraları ektodermal, nöroektodermal ve endodermal kaynaklı hücreler için de mitojenik oldukları gösterilmiştir. FGF'ler gelişimsel indüksiyon ve farklılaşma, hücre büyümesi ve göçü, kemik büyümesi ve gelişimi, nöronal farklılaşma, anjiogenez, yara iyileşmesi ve tümör oluşumu gibi çeşitli alanlarda etkinlik göstermektedir (12). Dört adet FGF reseptörü (FGFR 1-4) vardır ve herbiri 3 tane immunoglobulin benzeri (Ig-like) ekstrasellüler komponent, önemli derecede benzerlik gösteren dört adet intrasellüler transmembranöz tirozin kinaz reseptöründen oluşan bir ailedir. FGF'ler 1'e 1 oranında (1:1) FGFR'lere bağlanır ve ligand-reseptör kompleksi dimerleşerek sinyalleşmeyi; heparan ya da heparin indüklemiş FGF oligomerizasyonu tarafından aracılık edilen süreci başlatır. FGFR dimerizasyonu tirozin kinaz komponentlerini, otofosforilasyon için yeterince yakına getirir ve sinyal kaskadını aktive eder. Aktivasyondan önceki FGF, FGFR ve HSPG bağlanma sıralaması hala tartışılmaktadır ama bazı modeller FGF'nin FGFR'ye bağlanmasının dimerleşmeye izin vermek için HSPG tarafından stabilize edildiğini önermektedir (53).

Çeşitli çalışmalarda, özellikle FGFR1 ve FGFR2'deki mutasyonların kraniosinostoz sendromları ile ilişki gösterdiği saptanmıştır. FGF ailesi içinde önemli bir yer tutan FGF-2 epitel-mezenşim etkileşimleri, ekstremitte şekillendirilmesi, kırık iyileşmesi ve kemik büyümesi üzerinde önemli rolleri mevcuttur. Ayrıca kranial sütürlerin kapanma aşamalarında da bFGF immun boyanmasında artış olduğu gösterilmiş ve sütür kapanması sırasındaki osteogenezde rolü olduğu saptanmıştır (12).

Hücre davranışını ve pozisyon bilgisini içermekte olup bu özellikler MAP (Mitogen-activated protein) kinaz yolağı ile ortaya konur. Doğal olarak embriyogenezde ve birçok organın gelişiminde önemli rol oynayıp FGF-4, 8,

10 ve 18'in ekstremitte oluşumu ve dizaynında yer aldığı bildirilmiştir. FGF-8 ayrıca orta beyinle arka beyin arasındaki organizasyonu sağlayan sinyaller üretmektedir (54). Dışarıdan verilen FGF-2 ile yapılan bir çalışmada ekstremitelerin iskelet gelişimi etkilenirken kranial sistemde bir etki görülmemiştir. Bir taşıyıcı aracılığı ile farklı konsantrasyonlarda FGF-2'nin kranial dokuda yaptığı etkiye bakılmış 1 µg/ml FGF-2'nin implantasyonu ile E10 örneklerinde osteojenik farklılaşmaya hiçbir etkilerinin olmadığı görülmüştür. Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında E16 için kranial gelişimde bir farklılık olmamıştır. Dozun on katına çıkarıldığı durumda bile yeni bir ektojik kemik oluşumu veya oluşan yeni kemikte bir farklılık veya inhibisyon gözlenmemiştir (55). Buna karşılık humerus, radius ve ulnada o alana implante edildiği takdirde kısalma ve incelleme şeklinde bozukluk oluşmaktadır. Bununla ilgili açıklama kranial dokudaki fazla miktarda FGF ile yapılmış bu fazla miktardaki FGF'e tepki verilmediği düşünülmüştür. Bu örneklerde PCNA (Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni, Proliferating Cell Nuclear Antigen) ile yapılan boyamalarda anti FGF ile yapılan implantasyonlarda bütün mezenkimal hücreler çoğalırlarken kontrol graflarında çok az bir çoğalma olmuştur. Buna karşılık gelişen kemik ve kıkırdakta artış görülmüştür. Anti FGF-2 implantlı mezenkimal hücrelerdeki çoğalmanın anlamlı olduğu saptanmıştır. Tavukların E10 ve E13 örneklerinde FGF-2, FGFR1 ve FGFR2 dağılımının benzer olduğu ve özellikle beyin, koroid pleksus, periost, kranial sütürler ve gelişen kıkırdakta bulunduğu saptanmıştır. Bu ligand ve reseptörlerin kranial sütürlerdeki konsantrasyonları E13'de çok daha belirgin bir hale gelmektedir. Bunun sütür yapısı ve kemikleşmenin düzenlenmesi ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Aynı çalışmada kemik ve periostal tabakada FGF-2'nin erken dönemde var olduğu ve farklılaşan kemikte yüksek konsantrasyonun devam ettiği ve sütürlerde daha fazla bulunduğu saptanmıştır. Bu fazlalık hücreleri farklılaşmadan ziyade bölünmeye yönlendirmektedir böylelikle sütürlerin kapanması engellenmektedir. Düşük dozlardaki FGF-2 olduğunda kranial mezenkimde çoğalma ve farklılaşma oluşmamaktadır. Yüksek düzeydeki FGF-2'de ise özellikle kranial sütürlerdeki etki hücre çoğalması şeklindedir. En yüksek doz

FGF-2 ise bu alanlarda kemikleşmenin gerçekleştiği yerlerde görülmektedir. İşte bu iki farklı etki neden FGF-2 bloklandığında farklı tepkilerin oluştuğunu açıklamaktadır. Kemikten ziyade periostda reseptörlerin bulunması ise bunların kemiğin devamlılığında ziyade osteogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir. Şu anda var olan antikorların varyasyonlara özel olmaması nedeniyle genel etkiler izlenmekte ancak özel etkiler gözlenememektedir (55,56,57).

Kemiğin gelişmesinde FGF kadar TGF- β 'nında önemli olduğu bilinmektedir. FGFR2 ile ilgili mutasyonda FGF sinyalleme sinin osteoblastta oluşturduğu değişiklikler ve buna bağlı gelişen kraniyosinostoz ile TGF- β arasında ilişki olduğu düşünülmüştür. Yeni doğan fare kafatasından elde edilen dizin osteoblastları insan FGFR2 ile transfekte edildiğinde ortaya in vitro model olabilecek iki tip hücre dizin çıkmaktadır. Bu hücre dizinleri kraniyosinostatik fenotip olarak tanımlanabilecek hücre sel ve moleküler düzeyde karakteristikler içermektedir. Bu hücrelerin çoğalmasının azalması ile artan bir apoptozis, osteopontin ve osteokalsin belirteçleri ile gösterilen artan bir farklılaşma izlenmiştir. Bu in vitro modelde bir inhibitör kimyasal kullanılarak FGFR baskılandığında çoğalma azalmaktadır. İlginç olarak aynı zamanda TGF- β 1 ve β 3 sinyali de azalmaktadır. Aynı kimyasalla TGF- β da inhibe edilirse hücre çoğalması en çok bu durumda azalmaktadır. TGF- β sinyalleme sinin osteoblast çoğalmasındaki etkisi ekstraselüler ilişkili kinaz (extracellular related kinase, ERK) 1/2 ile geri döndürülebilmektedir. Bu durumda osteoblast, fibroblast ve hepatositler büyümeyi durdurmaktadır. Bu mekanizmasal ilişkinin kraniyosinostatik osteoblast fenotipinde etkili olabileceği ERK1/2 nin de bu ilişkiyi yönlendirmede anlamlı olabileceği düşünülmüştü. FGFR1-3 reseptörlerindeki mutasyonların kraniyosinostozu neden olduğu bununda FGF ile TGF- β arasındaki sinyal ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (58).

Omurgalı kafatası, şekil ve yapıyı belirlemek için farklı gelişimsel mekanizmalar kullanan üç tamamlayıcı parçadan oluşan modüler yapıdır (59). Kranial kubbenin, büyük ölçüde nöral krest kaynaklı ektomezencefalimden

oluştugu bilinmektedir. Bu nöral krest kökeni sadece kranial kubbenin kendisini oluşturan membran kemiklerinin osteojenik hücrelerini değil aynı zamanda kemiklerin arasındaki yüzeylerde var olan sütürler ve büyüme zonlarındaki hücreleri de içerir. Kranial kubbenin normal morfogenezi, osteojenik tarafta osteoblast yönüne hücre farklılaşması sağlamakta ve sütürlerdeki osteojenik prekürsörler arasındaki dengeyi yansıtmaktadır. Yere, yaşa ve sağlık durumuna bağlı olarak sütürler, kemikleşerek kapanmadan önce kranial kubbenin büyüyen beyne uyum sağlamasına müsaade ederek bebeklikte ve sonrasında çoğalır ve açık kalırlar (60).

Sütürel fonksiyonun hücresel ve moleküler kontrolü ile sütürel hücrelerin proliferatif veya örneğin osteojenik farklılaştırıcı yönde işlev görmesini sağlayanın ne olduğu hakkında çok az bilgi vardır. Ancak, alttaki dura bu durumlarda, henüz tam olarak tanımlanmamış bir role sahiptir (61,62,63,64,65). Sütürlerdeki büyüme ve farklılaşmanın çift yönlü fonksiyonlarının belirgin spasyotemporal entegrasyonu, normal kafatası morfogenezi için gereklidir. Sütürlerin prematür kapanması, örneğin büyümenin durması ve kemiksel füzyonu, kranial kubbenin büyüme potansiyelini kaybettiği ancak büyümeye devam eden bir beyni barındırdığı “kraniosinostoz” olarak adlandırılan klinik duruma neden olmaktadır. Bu durum fetal gelişim esnasında veya doğumdan sonra ortaya çıkabilir ve bazen merkezi sinir sistemi hasarıyla ilişkili olarak kafatası ve yüzde dismorfogeneze neden olur (66,67). Kraniosinostoz hem sendromik hem de nonsendromik formlarda görülebilir ve ortalama 2500’de 1 çocuğu etkiler (24). Majör kraniosinostoz sendromlarının altısı FGFR1, 2 ve 3 mutasyonlarıyla ilişkili bulunmuştur. Bu mutasyonların reseptörün ligandan bağımsız aktivasyonuna ve sinyal artışına neden olduğu görülmektedir. Kranial kemiksel farklılaşmanın düzenlenmesi üzerinde FGF ligandlarının rolü hakkında çok az bilgi vardır (68,69).

FGF-3 ve FGF-4 genleri (FGFR2 için yüksek afinitesi olan ligandlar) arasındaki bölgede retrovirus aracılı yapılan mutasyonun şişkin gözlü Bey fare oluşmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu mutasyon, kranial sütürlerdeki

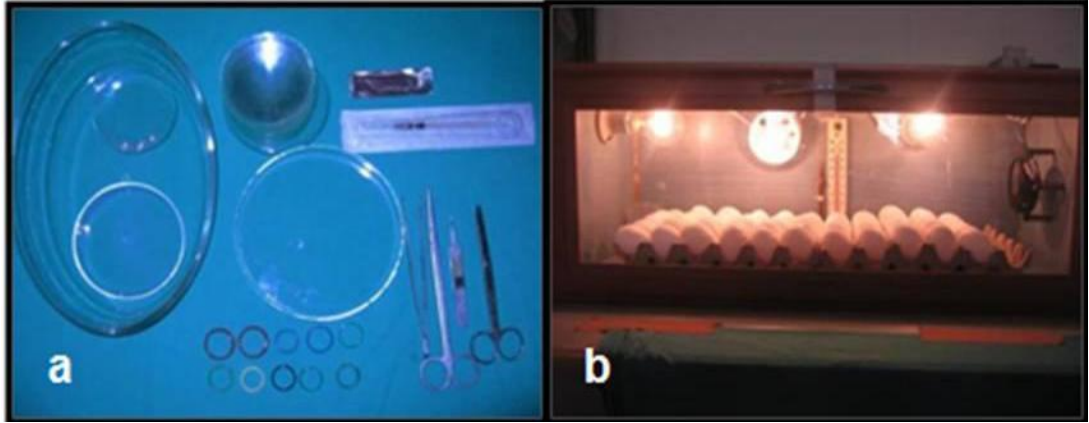
FGF-3 ve FGF-4'ün her ikisinin de artmasına neden olmaktadır ve fenotipik olarak Bey faresi Crouzon sendromuna benzer özellikler göstermektedir. FGF-2'nin kranial farklılaşmada rol oynayabildiğine dair kanıt mevcuttur. FGF-2 ile doldurulmuş boncukların farelerin kranial sütürlerine implantasyonu FGFR2'nin ektopik ekspresyonunu ve azalmasını tetiklemiştir (70,71). Son zamanlarda yapılan çalışmalar premigratuvar kranial nöral krest hücrelerinin FGF sinyallerine in vitro yanıt verebildiğini göstermiştir. FGF-2 konsantrasyonuna bağlı olarak, nöral krest hücreleri sadece proliferatif yanıt değil aynı zamanda kondrojenik ve osteojenik yanıtlar da göstermektedir (72).

Daha önceki çalışmaları genişletmek ve bütünlemek amaçlı yapılan bir çalışmada tavuk embriyo kraniumunda endojen FGF-2 seviyelerini manipüle etmesi için boncuklarla kaplı FGF-2 kullanıldığı bir dizi deney oluşturulmuştur. Dramatik ve konsantrasyon bağımlı bir yanıt gözlemlenmiş ve endojen FGF-2'nin azalması, kranial kubbedeki kemiksel yapıyı oluşturan hücreleri farklılaşma durumundan proliferatif duruma değiştirmiştir. Araştırmacılar daha fazla boncuğun eklenmesiyle birlikte daha ileri inaktivasyon oluştuğunu ve bunun da greftteki hem çoğalmayı hem de farklılaşmayı durdurduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlar, başka yazarlar tarafından gösterildiği gibi, dışarıdan verilen FGF-2 seviyelerinin kranial kubbe hücreleri üzerindeki konsantrasyon bağımlı etkilerini desteklemektedir. Ayrıca, kraniyosinostoz oluşturan FGFR genlerindeki mutasyonların reseptörlerin temel aktivasyonu ve akabinde FGFR yolağı ile sinyallerin artması ile sonuçlanma eğilimi iddiasını da desteklemektedirler (70,71,72). Önceki çalışmalardan alınan sonuçlar, FGF-2 uygulamalarının doza, yere, veriliş şekline ve verilen yere göre farklı etkiler oluşturabileceğini göstermiştir. Bunun anlamı FGF etkilerinin farklı şekillerde oluşabileceği ve hem normal kemik gelişimi hem de kraniyosinostoz oluşumunda bu etkilerin önemli olabileceğinin bilinmesi gerektiğidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney ve Denekler

Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi (C.B.Ü.) Tıp Fakültesi (T.F.) Araştırma Fonu Saymanlığı tarafından 2013-072 numaralı proje ile desteklendi. Çalışmamızda tavuk embriyolarının devamlılığının sağlanması ve istenilen saatlerde elde edilmesi için bölümümüz tavuk embriyosu deney laboratuvarında bulunan kuluçka makinesi kullanıldı (Şekil 3.1.1).



Şekil 3.1.1: a-Başlıca kullanılan malzemeler, b-İnkübatörde SPF yumurtalar.

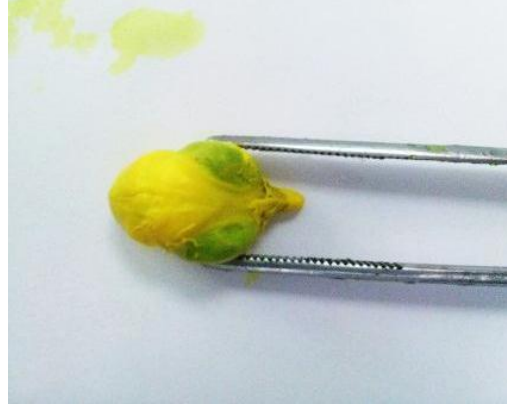
Çalışmanın histopatolojik değerlendirme aşamaları C.B.Ü.T.F. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Canlı tavuk yumurtalarının doğal gelişimi, embriyolojide oldukça gelenekselleşmiştir. Evcil kümes hayvanlarından elde edildikleri için istenilen dönemlere ait embriyoların rahatlıkla elde edilebilmesi ve inkübasyon periyotlarının kısa olması açısından vertebralıların, özellikle memelilerin gelişimi için tavuk embriyosu çok iyi bir model olmaktadır. Çalışma, C.B.Ü. Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı ile yapıldı. Çalışmada Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden alınan spesifik patojen içermeyen (SPF, specific pathogen free) 120 adet tavuk yumurtası kullanıldı. Yumurtalar, 37,5°C sıcaklıkta, yaklaşık %60-80 nem orana sahip etüvde inkübe edildi.

Dört deney grubu oluşturuldu. Birinci grup kontrol grubu (20 denek). İkinci grup fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) verilen, üçüncü grup 0,01 µg/ml anti-bFGF-2 ve dördüncü grupta 0,1 µg/ml anti-bFGF-2 ile bloklama yapılan grup olarak oluşturuldu. İkinci üçüncü ve dördüncü gruplar içinde uygulama yapılan günlere göre E2 (2. gün), E4 (4. gün), E6 (6.gün), E8 (8. gün) olmak üzere 4 alt grup oluşturuldu. PBS verilen 2. grupta her alt grup için 5'er adet toplam 20 adet, anti-FGF-2 ile bloklama yapılan 3. ve 4. grupta her alt grupta 10'ar adet toplam 80 adet denek kullanıldı. Fertilize yumurtalar inkübatörde 15 gün süresince tutularak, 2., 4., 6. ve 8. günlerde umbilikal kord etrafına ameliyat mikroskobu yardımı ile 3.gruba 0,01 µg/ml anti-bFGF-2, dördüncü gruba 0,1 µg/ml anti-bFGF-2, sham grubuna da 0,1ml PBS verildi. Bütün gruplardaki denekler 15. gün sakrifiye edildi. Literatürde konu ile ilgili bilgilere göre FGF-2 dozu belirlenerek, 0,1 ve 0,01 µg/ml PBS içinde anti-bFGF-2 (Anti-b FGF Basic Neutralizing Antibody Purified Rabbit IgG R&D Systems cat no;AB-33-NA Minneapolis, MN) uygulandı (Tablo 3.1.1).

Tablo 3.1.1: Denek sayılarının gruplara göre dağılımı.

Denek Sayısı	KONTROL	SHAM (PBS)	anti-bFGF-2 (0,01 µg/ml)	anti-bFGF-2 (0,1 µg/ml)
E2	20	5	10	10
E4		5	10	10
E6		5	10	10
E8		5	10	10
Toplam : 120	20	20	40	40

Denekler Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Beyin Cerrahisi Tavuk embriyolojisi deneysel laboratuvarında bakıldı. Tavuk embriyoları sakrifiye edilir edilmez, sagittal ve frontal sütünü içerecek şekilde kemik örnekleri alındı (Şekil 3.1.2).



Şekil 3.1.2: Sakrifiye edildikten sonra kemik örnekleri alınan ve ölçüm için temizlenen örnek tavuk kraniumu.

3.2. Laboratuvar Koşulları

İnkübatör, 120 adet günlük-beyaz-fertil, 65 ± 5 gr. ağırlığında SPF yumurta, büyük cam kap, değişik boyutlarda petri kutuları, saat, camları ve pensetler, doku makası, gaz tampon, insülin enjektörü, 10 cc ve 20 cc enjektör, flaster, steril lateks eldiven, batikon, bistüri, lup, araştırılan etken maddenin istenilen dilüsyon oranının sağlanması için hassas otomatik pipet ve elde edilen embriyoların saklanması için %4'lük formol dolu cam şişe ile eppendorf kapları, önceki tavuk embriyo çalışmalarında da kullanılmış olan, standardizasyonu yapılmış inkübatör kullanıldı. SPF yumurtaları inkübatörde, $37,2\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ sabit ortam sıcaklığını sağlamak için 60Watt gücünde toplam 3 adet ampul ve bunların kesintisiz güç kaynağına takılı olduğu elektrik bir devre ile bağlı, hassas $0,5^{\circ}\text{C}$ ısıya duyarlı, dijital ekran göstergeli ENKA marka termostat sensörü, ortam sıcaklığını homojenize etmek için bir fan, havalandırma deliği ile 50 adet kapasiteli yumurta kabı mevcut olarak inkübe edildi. İnkübatör, istenen ideal ortam sıcaklığı olan $37,2\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ve nem oranı $\%60\pm 5$ oluncaya kadar 1 saat süreyle boş olarak çalıştırıldı (73). Daha sonra yumurtalar dikey düzleme 45° açı ile hepsi aynı yönde yerleştirilerek çalışma başlatıldı. Her 2 saatte bir yumurtaların hepsi sırayla ve hızla, bu dikey düzlemdeki açıları karşı yöne 45° olacak şekilde çevrildi.

3.3. Uygulama ve Örnekleme

Yumurtalar 2., 4., 6. ve 8. günlerde tek tek inkübatörden çıkarılarak çalışma masası üzerinde uygulama başlatıldı. Daha önceden hassas otomatik pipet yardımı ile yapılan ölçümlerle gruplara göre uygun dozlarda hazırlanmış anti-bFGF-2 etken maddesine sahip olan ve inkübatörde bekletilen solüsyonlar, insülin enjektörlerine çekildi. Künt kısmı yukarı gelecek şekilde bir eğim ile ele alınan yumurtaların ekvatorlarına yakın kısımlarından küçük bir delik açılarak lup altında embriyo diski görülünceye kadar hafifçe genişletildi. Embriyo umbilikal kordu etrafına, solüsyonlar insülin enjektörü ile enjekte edildi. Olası bir hava kabarcığı, embriyo diskini yumurtanın sarısından ayırarak embriyonun beslenmesini bozabileceğinden, bu aşamada enjektörde hiç hava kabarcığının olmamasına ve tüm deneklere eşit miktarda enjeksiyon yapılmasına özellikle dikkat edildi. Yumurtanın kabuğundaki açıklık, flaster ile sızdırmaz bir şekilde kapatıldı ve bu kısım aşağı gelecek şekilde yine dikey düzlemde 45° açı ile inkübatördeki yumurta kabına yerleştirildi. Yumurtalar, 15. gün sonunda tek tek inkübatörden çıkarılarak çalışma masası üzerinde embriyoların elde edilmesi işlemine başlandı. Yine künt ucu yukarıda ve eğimli bir şekilde elde tutulan yumurtanın kabuğu dikkatlice kırılarak yumurtanın akından bir miktar akıtıldı. Elde edilen örnekler Bouine solüsyonuna alınarak (Tablo 3.2.1) aynı gruba ait cam şişelere konuldu.

Tablo 3.2.1: Bouin takip protokolü.

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
A.TESPİT	BOUIN SOLÜSYONU	24-48SAAT
B.DEHİDRATASYON	%70 ALKOL	1 GECE
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%80ALKOL	1 SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C.ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL:KSİLEN (1:1)	2 SAAT
	KSİLEN	1GECE
	KSİLEN	1 SAAT
D.İN FİLTRASYON	KSİLEN-PARAFİN (1:1)	1 SAAT
	PARAFİN	3 SAAT
	PARAFİN	1GECE
E. GÖMME	PARAFİN	

3.4. Morfolojik Ölçüm

Sakrifiye edilen tavuk embriyolarının kafatasları yumuşak dokulardan temizlendikten sonra bir kompas yardımı ile ve Moss metoduna uygun olarak milimetrik morfolojik ölçümler yapıldı (74).

3.5. Parafin Bloklarda Histolojik İnceleme

Doku örnekleri fosfat tamponu içinde hazırlanmış %10 formalin (pH=7.0) çözeltisiyle tespit edildikten sonra distile su içindeki %10 EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) çözeltisinde oda sıcaklığında kontrollü olarak dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrası farklı dereceli alkollerden geçirilerek sabit vakum uygulamasıyla parafin bloklara gömüldü. Bouin tespit solüsyonunda tespit edildikten sonra embriyolar %70 alkolde 1 gece yıkanarak tespit solüsyonu uzaklaştırıldı. Daha sonra örnekler %70'den %95'e artan derecelerde etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 2 saat 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1'er saat iki değişim ksilene tabi tutuldu ve 60°C'lik etüv içersinde 1 saat 1:1 oranında ksilen-parafin 30 dakika uygulanıp 2 saat parafin ile immersiyonu

sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar (Tablo 3.1.3) içerisine gömüldü (12).

Tablo 3.5.1: Parafin doku takip protokolü.

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
A.TESPİT	%10 FORMALİN	24-48SAAT
	AKARSU	24SAAT
B.DEHİDRATASYON	%60 ALKOL	½ SAAT
	%70ALKOL	½ SAAT
	%80 ALKOL	½ SAAT
	%95 ALKOL	½ SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C.ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL:KSİLEN (1:1)	½ SAAT
	KSİLENI	1 SAAT
	KSİLENI	1 SAAT
D.İN FİLTRASYON	KSİLEN-PARAFİN(1:1)	½ SAAT
	PARAFİN-I	1 SAAT
	PARAFİN-II	1SAAT
E. GÖMME	PARAFİN	

3.5.2 Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyaması:

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5'er dakika akar su altında yıkandı. İki dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5'er dakika akar suda yıkanan kesitler 30 saniye eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5'er dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3.5.1).

Tablo 3.5.1: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLENI	30DAKİKA
	KSİLENI	30DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2DAKİKA
	%80 ALKOL	2DAKİKA
	%70 ALKOL	2DAKİKA
	%60 ALKOL	2DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5DAKİKA
	%80 ALKOL	1DAKİKA
	%95 ALKOL	1DAKİKA
KURUTMA	HAVADA VEYA ETÜVDE	
	KSİLEN	1SAAT
KAPAMA	ENTELLAN	

3.5.2. Mason Trikrom (MT) Boyaması:

Alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5'er dakika akar su altında yıkandı. Bouin solüsyonda 56°C'de 15 dakika mordantlama yapıldı ve ardından sarı renk gidinceye kadar akar suda yıkandı. Weigert demirli hematoksilen ile 10 dakika çekirdek boyaması yapıldı ve tekrar akar suda 10 dakika yıkama yapıldı. Daha sonra Biebrich Carlet asit fuksin solüsyonunda 5 dakika bekletilen kesitler kırmızı renk gidinceye kadar distile suda yıkandı. Fosfotungstik/fosfomolibdik asitte 5 dakika bekletildi ve ardından 5 dakika anilin mavisi ile boyanan örnekler %1'lik asetik asitte 2 dakika bekletildikten sonra 5 dakika distile suda yıkandı. Yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma

amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

3.5.3. Von Kossa (VK) Boyaması:

1. Deparafinize edildi (Kriyostat ile kesitleri alınan örnekler için bu basamak atlandı).

2. Yirmi dakika %5' lik AgNO₃ ile muamele edildi.

3. Saf su ile dikkatlice yıkandı.

4. İki dakika 5 gr. Na₂CO₃+75 mL saf su+25 mL formalin çözeltisi ile muamele edildi.

5. Saf su ile dikkatlice yıkandı.

6. İki dakika sodyumtiyosülfat ile fiksasyon yapıldı.

7. Saf su ile dikkatlice yıkandı.

8. İki-üç dakika hemotoksilen ile muamele edildi.

9. Saf su ile dikkatlice yıkandı.

10. Işık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

3.5.4. Alizarin Red (AR) Boyaması:

1. On dakika 40 mM (mili molar) AR-solution (AR-S) ile aksiyel karıştırıcı üzerinde bekletildi.

2. Boyanın fazlasını uzaklaştırmak amacıyla 5 defa su ile yıkandı.

3. Spesifik olmayan AR-S boyasını ortamdaki uzaklaştırmak için 15 dakika PBS ile yıkandı.

4. Işık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

Elde edilen histolojik kesitler boyandıktan sonra Leica marka DMR model ışık mikroskopunda değerlendirildi. Görüntüler DC 500 model Leica marka dijital kamera ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.5.5. Morfometrik skorlama:

Morfometrik skorlamada kemik oluşumunun sütün kapanması üzerine olan gelişimi H-E, MT ve AR ile değerlendirildi. H-E ile morfolojik değerlendirme, AR ile kalsiyum depolanması ve kemikleşme ve MT ile bağ dokusunun varlığı en az (+1) ile en çok (+5) arasında bağımsız bir gözlemci tarafından örnekler bilinmeden puan verildi.

3.6. Parafin Bloklarda İmmünohistokimyasal İnceleme:

3.6.1. İndirekt immünohistokimya

Alınan kesitler immünohistokimyasal boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan %0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. Üç defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar eNOS, iNOS ve anti-PCNA ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoruna (85-9043 Zymed Histostain kit, San Francisco, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dakika boyandı. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile ard alan boyaması sağlandıktan

sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler kapatma medyumu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı (Tablo 3.6.1).

Tablo 3.6.1: Avidin-Biyotin peroksidaz yöntemi ile indirek immünohistokimyasal boyama protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLENI	30DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLENIİ	30DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2DAKİKA
	%80 ALKOL	2DAKİKA
	%70 ALKOL	2DAKİKA
	%60 ALKOL	2DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLESU	10DAKİKA
	PBS	10DAKİKA
HAVUZCUK OLUSTURMA	DAKOPEN	
	TRİPSİN37°C etüvde	10DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
BLOKLAMA	Non-immünbloklamasolüsyonu	1SAAT
PRİMER ANTİKORLAR	anti- mTORC1,anti- mTORC2, anti- IGF1, anti- PI3K, anti-pAKT1/2/3,anti-ERK1,anti- pERK1/2.	18SAAT (+4°C nemli ortamda)
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
SEKONDERANTİKOR	BIYOTINLE İŞARETLİ SEKONDER	30DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
BOYAMA	DAB(Diamino benzidine)	10DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5DAKİKA
ARTALANBOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	
İNCELEME	OLYMPUSMARKAIŞIKMİKROSKOBU	

3.6.2. TUNEL Boyaması

TUNEL immunositokimyası: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection (Kit S7101, Millipore) kiti kullanıldı. Beş µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edildi. Ardından 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinize edildikten sonra azalan alkol serileri (%95, %80, %70, %60) ile 2'şer dakika rehidratasyon uygulanarak 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Daha sonra kesitler 20 µg/ml Proteinaz K ile 15 dakika 37°C'de muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkamayı takiben oda ısısında 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulaması yapıldı ve 5 dakika PBS ile yıkandı. Kesitler 5 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37°C'de 60 dakika plastik cover slipler kesitleri kapatacak şekilde bekletildi. Süre sonunda yıkama yapmadan Stop/Wash buffer ile 15 dakika inkübasyonun ardından 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Kesitlere 30 dakika oda ısısında anti-Digoxigenin Conjugate ile muamele edildi. Beş dakika PBS ile oda ısısında yıkandı ve ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı, birkaç kez distile su ile yıkama yapıldı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksilen'i ile yapıldıktan sonra tekrar distile su ile yıkama yapıldı. Sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi (Tablo 3.6.2).

Tablo 3.6.2: TUNEL yöntemi.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
Ksilen	30 dakika	
Rehidratasyon	%95 alkol	2 dakika
% 80 alkol	2 dakika	
% 70 alkol	2 dakika	
% 60 alkol	2 dakika	
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Proteinaz K solüsyonu	30 dakika	
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Tamponlama	Equilibration solüsyonu	10 dk
Tdt Labelling solüsyonu	5 dk	
Tdt Enzim solüsyonu	37°De 1 saat	
Stop-wash solüsyonu	5 dakika	
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Streptavidin HRP	10 dakika	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB boyası	10 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt boyama	Mayres's Hematoksilen	5 dakika
Rehidratasyon		
Kapama		
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece

İmmunositokimyasal boyamalarının bilgisayar ortamına aktarılan görüntüleri üzerinde yapılan değerlendirmelerde boyamanın yoğunluğu ve dağılımı baz alınarak skorlama yapıldı. Skorlamada kemik oluşumunun sütür

kapanması üzerine olan gelişimi çoğalma belirteci olan PCNA ile, oksidatif stress parametreleri açısından eNOS ve iNOS ile, apoptoz için ise TUNEL yöntemi ile değerlendirildi. Skorlama en az (+1) ile en çok (+5) arasında örnekleri bilmeyen bağımsız bir gözlemci tarafından puanlama yapılarak gerçekleştirildi.

3.7. İstatistiksel Yöntem

Deneklere ait tüm histolojik ve immünohistokimyasal veriler ile makroskopik kalvariyal ölçümlere ait veriler; PC bilgisayarda Graphpad (3.1, USA) istatistik programı ile değerlendirildi. Buna göre deney ve kontrol grupları arasındaki dağılımın farklılığı, Kruskal Wallis ve onun Posthoc testiyle değerlendirildi. Histolojik iyileşme sürecinin morfolojik ölçümlerle korelasyonu Spearman testiyle test edildi. Gruplar arası farklılık “p” değeri 0.05’ten küçük olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Tavuk Embriyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen bu deneysel araştırma için 2., 4., 6. ve 8. günlerde yine önceden tarif edildiği gibi uygun teknik ile umbilikal kord etrafına 0,1 ve 0,01 µg/ml PBS içinde anti-bFGF-2 bloklama antikoru Tuberkulin (PPD) enjektörleri ile verildi. Deney grupları birinci grup kontrol, 2. grup sadece PBS, 3. grup 0,01 µg/ml anti-FGF-2 ve 4. grup 0,1 µg/ml anti-bFGF-2 olacak şekilde 4 grup oluşturuldu. Uygulamalar sonrasında embriyolar 15. gün tamamlandığında sakrifiye edildi, Bouin solüsyonunda fiksasyonun ardından parafin ile bloklandılar. Bloklardan 5 µ'luk kesitler alındı ve H-E boyama yöntemiyle boyandı.

Makroskopik değerlendirmede bütün örneklerde belirgin bir patoloji saptanmadı. Az bir miktar yumurta içinde embriyo gelişmediği için değerlendirilmeye alınmadı (Şekil 4.1).



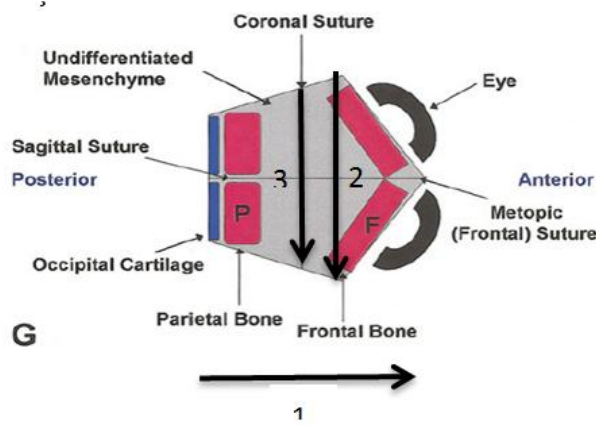
Şekil 4.1: Sakrifiye edildikten sonra kemik örnekleri alınan ve ölçüm için temizlenen 15 günlük piliç embriyo kraniumları.

Alınan örnekler Bouin fiksatifinde 48 saat bekletildikten sonra gözler ve medulla spinalis referans noktaları olacak şekilde alt yüzey ve gaga kısmı çıkartıldı. Kafa sütürlerini barındıran tas şeklindeki kafa kısmı enden en geniş

kısmı referans alınarak kesildi. Rutin bouin takip serisinden geçirildi. Takibin ardından kesitler kesilen yüzeyden kafa kemik kısmı 90 derece dik olacak şekilde parafin ile bloklandı ve 5 µ'luk kesitler alınarak histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalara hazırlandı.

4.2. Morfolojik Ölçümler

Deneklerin kafatasları ile ilgili ölçümler, derileri çıkarıldıktan sonra sutureler görünür hale getirilerek bir kompas yardımı ile Moss metoduna (55,74) uygun olarak morfolojik ölçümler yapıldı (Şekil 4.2.1).

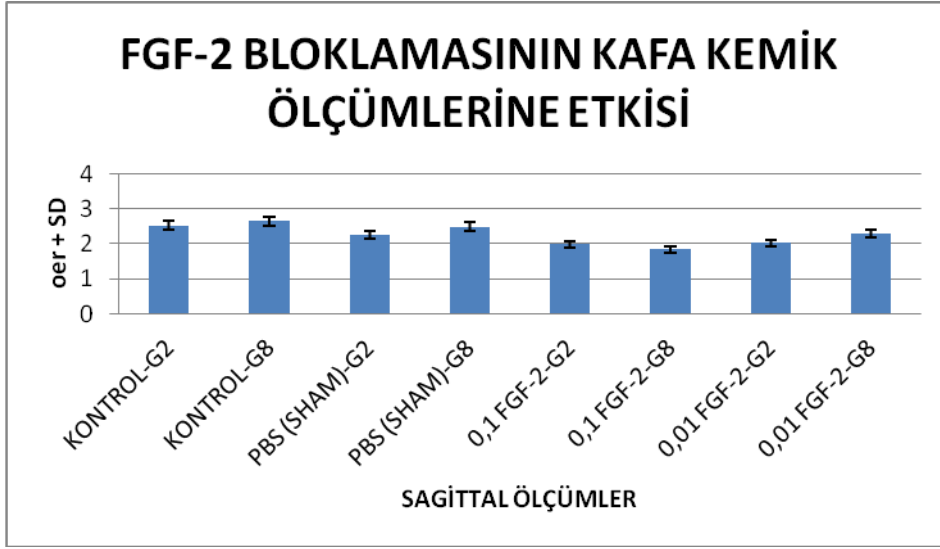


- 1) Saggital suture
- 2) Frontal bone
- 3) Coronal suture

Şekil 4.2.1: Makroskobik değerlendirmede suturelerin ölçümleri için kullanılan parametreler (55,74).

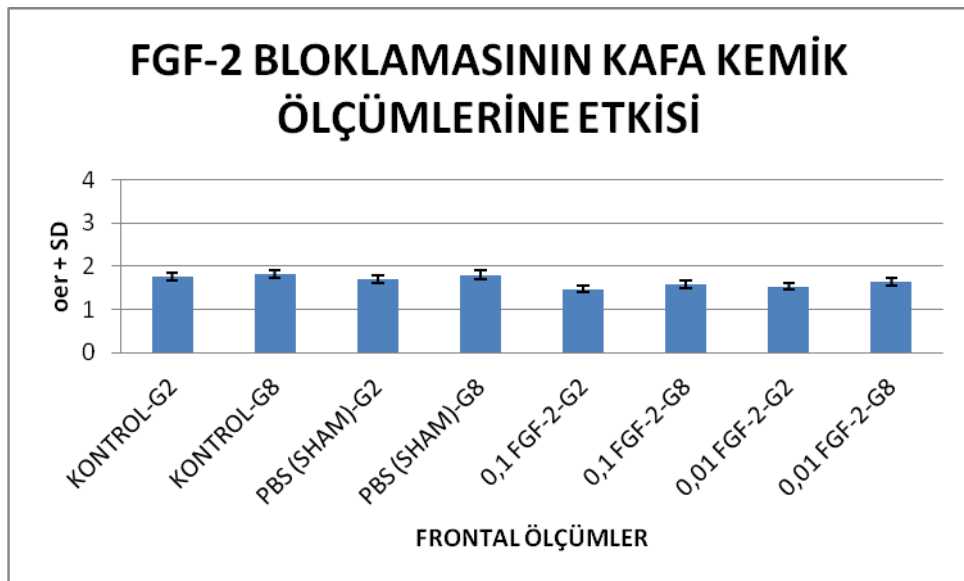
Tüm gruplar için elde edilmiş morfolojik ölçüm değerleri sonucunda kontrol ile karşılaştırıldığında suture ölçümlerinin sham grubunda biraz daha az olduğu ancak anlamlı bir fark izlenmediği ($p>0,05$), deney gruplarında ise 0,1 µg/ml anti-bFGF-2 verilen grupta kafa çaplarında anlamlı ($p<0,05$) bir azalma olduğu ancak antikor dilüsyonu ile bu azalmanın sham grubuna kadar gerilediği görüldü (Tablo 4.2.1).

Tablo 4.2.1: Sagittal kafa çaplarının değerlendirilmesi.



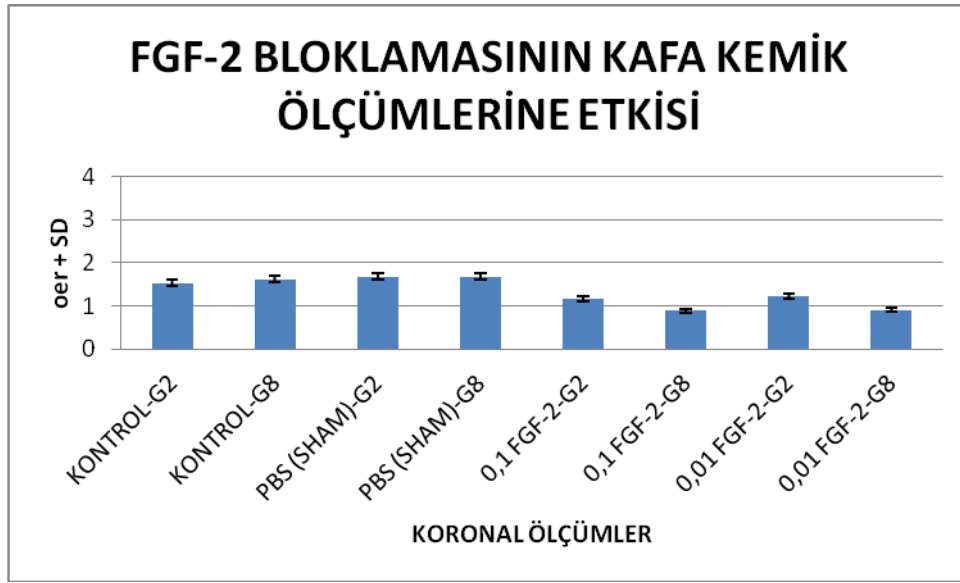
Tüm gruplar için elde edilmiş morfolojik ölçüm değerleri sonucunda sagittal ile karşılaştırıldığında daha az olan frontal ölçümler için, kontrol ile karşılaştırıldığında sütür ölçümlerinin sham grubu ile benzer olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu ($p>0,05$), deney gruplarında ise 0,1 $\mu\text{g/ml}$ anti-bFGF-2 verilen grupta az anlamlı şekilde kafa çaplarında azalma olduğu ancak antikor dilüsyonu ile bu azalmanın değişmediği görüldü (Tablo 4.2.2).

Tablo 4.2.2: Frontal kafa çaplarının değerlendirilmesi.



Sagital ve frontal ile karşılaştırıldığında daha az olan koronal ölçümler için, kontrol ile karşılaştırıldığında sütür ölçümlerinin sham grubu ile benzer olduğu ve farkın anlamsız olduğu ($p>0,05$), deney gruplarında ise 0,1 $\mu\text{g/ml}$ anti-bFGF-2 verilen grupta belirgin ve anlamlı şekilde ($p<0,05$) kafa çaplarında azalma olduğu ancak antikor dilüsyonu ile bu azalmanın değişmediği ancak erken dönemde daha etkili olduğu bulundu (Tablo 4.2.3).

Tablo 4.2.3: Koronal kafa çaplarının değerlendirilmesi.



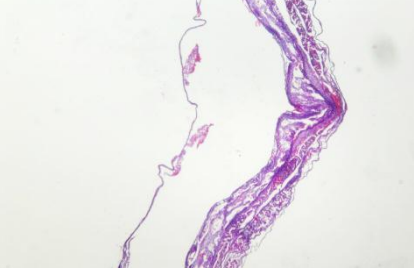
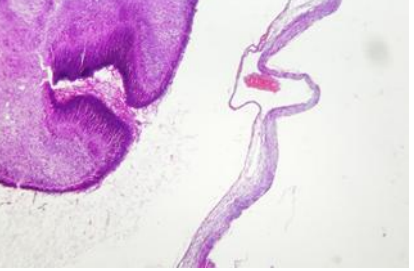


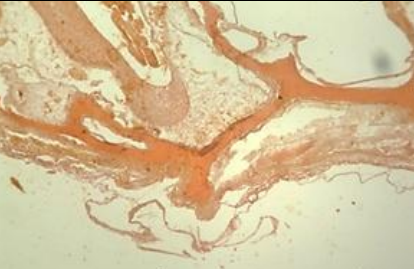
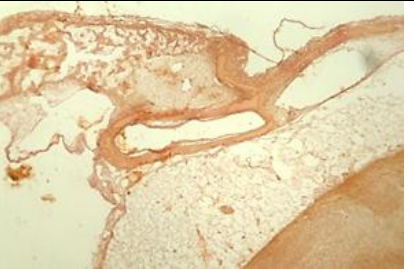


4.3. Histolojik Bulgular

FGF-2 bloklama yapılan, kontrol ve sham (PBS) gruplarından elde edilen E15 histolojik kesitleri H-E, MT ve AR ile boyandı. Bloklama yapılan grubun 2. ve 4. gün denekleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kraniosinostoz deneyi için 4 gün süre ile inkübe edilen tavuk embriyosuna yapılan 0,1 $\mu\text{g/ml}$ anti-bFGF-2 uygulaması sonrasında 11 gün daha inkübe edilerek 15 günlük embriyo olması sağlanan örneklerde bouin takibi ile parafin gömme H-E, MT ve AR boyamaları yapılarak alınan sagital kesitlerde göz seviyesine kemik dokunun etrafında sütür alanlarının varlığı küçük büyütmede görüldü. E4 PBS uygulamasında dorsal kafa kemiklerinde trabeküler kemik oluşumları ve kemikler arasındaki sütür alanının dar olduğu

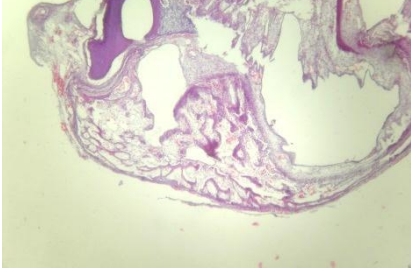
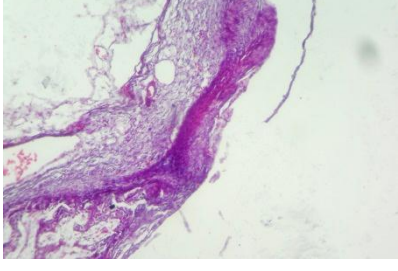
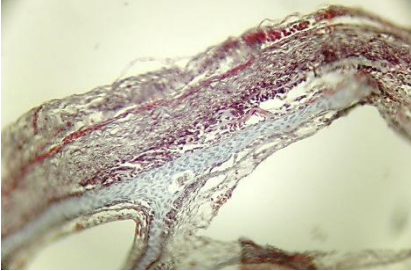
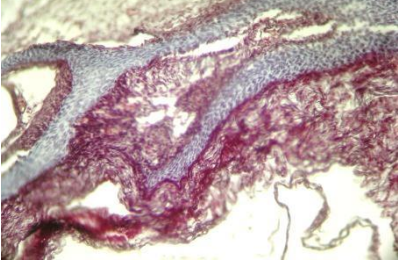
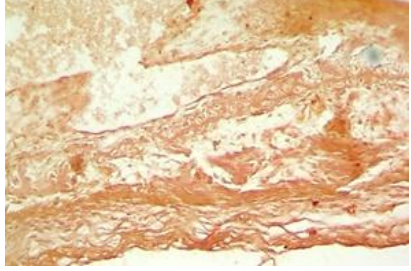
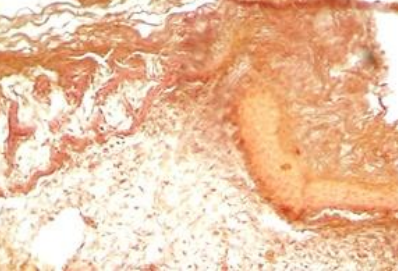
H-E boyamasında gözlendi. MT boyamasında da trabeküler kemik oluşumları ve etrafındaki bağ doku elemanlarının varlığı gözlendi ayrıca kemik doku içerisinde kıkırdağa ait bağ doku alanları gözlenmedi. AR boyamasında PBS grubunda kemik oluşumunun gerçekleştiği ve kemik doku içerisinde kalsiyum birikintilerinin varlığı gözlendi. E4'te anti-bFGF-2 verilen grupta ise H-E boyamasında dorsal kemiklerde trabeküler kemik oluşumunun daha az olduğu ve sütür alanlarında açıklığın ileri derecede geniş olduğu gözlendi. MT boyamasında kemik oluşması gereken alanlarda bağ doku elemanlarının varlığı saptandı. AR boyamalarında trabeküler kemik alanlarında kalsiyum birikiminin kontrol ve PBS grubuna göre azlığı fark edildi (Tablo 4.3.1).

Tablo 4.3.1: E4 deneklerinde PBS ve anti-bFGF-2 uygulamaları sonrasında E15 morfolojik ve histolojik küçük büyütme görüntüleri.

E4 Anti-bFGF-2 UYGULAMASININ E15 HİSTOKİMYA BULGULARI		
	E4 PBS	E4 0,1 µg/ml anti-bFGF-2
MM X10		
HE X40		
MT X40		
AR X40		

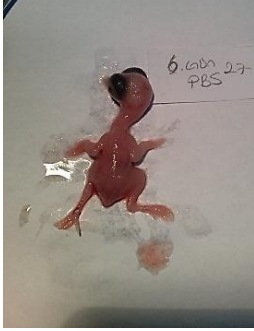

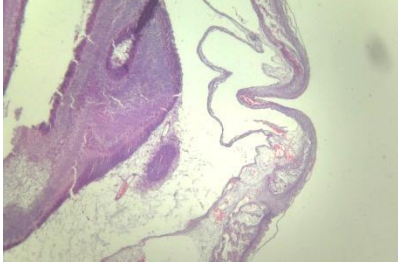
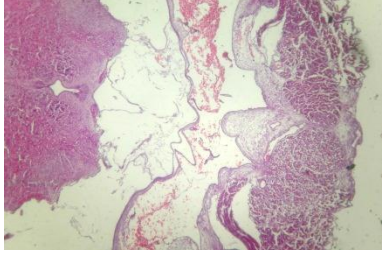
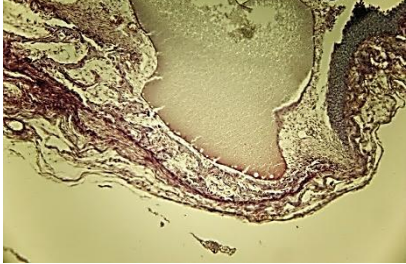
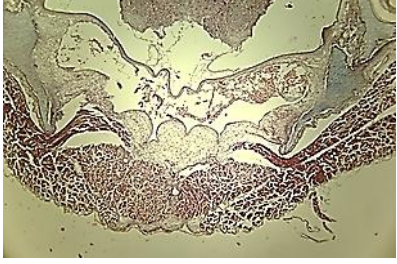

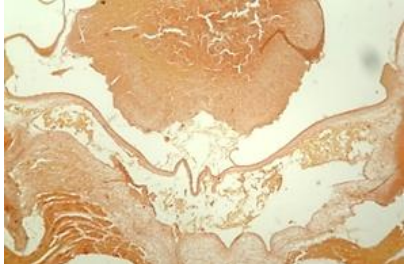
PBS uygulaması yapılan E4 örneklerin X100 büyütmelerinde H-E, MT ve AR boyamalarında dorsal kafa kemiklerinde trabeküler kemik oluşumları ve kemikler arasındaki sütür alanının dar olduğu gözlenmektedir. PBS grubunda oluşan trabeküler kemikler içerisinde kemik iliği alanlarının varlığı görülmektedir. PBS grubu MT boyamasında da trabeküler kemik oluşumları ve etrafındaki bağ doku elemanlarının varlığı gözlenirken, ayrıca kemik doku içerisinde kırıkdağa ait bağ doku alanları gözlenmektedir. E4 anti-bFGF-2 uygulanan grupta MT boyamasında kırıkdağ alanların yoğunluğu bu alanlar içerisinde oluşması beklenen trabeküler kemiklerin azlığı ve kemik iliği alanlarının azlığı gözlenmektedir. AR boyamasında PBS grubunda kemik oluşumunun gerçekleştiği ve kemik doku içerisinde kalsiyum birikintilerinin varlığı gözlenmektedir. E4 için anti-bFGF-2 verilen grupta ise AR boyamasında dorsal kemiklerde trabeküler kemik oluşumunun daha az olduğu ve kemik doku içerisinde kalsiyum biriken alanların daha az olduğu gözlemlenmektedir (Tablo 4.3.2).

Tablo 4.3.2: E4 deneklerinde PBS ve anti-bFGF-2 uygulamaları sonrasında E15 morfolojik ve histolojik büyük büyütme görüntüleri.

E4 Anti-bFGF-2 UYGULAMASININ E15 HİSTOKİMYA BULGULARI		
	E4 PBS	E4 0,1 µg/ml anti-bFGF-2
HE X100		
MT X100		
VK X100		

PBS uygulaması yapılan E6 örneklerin X40 büyütmelelerinde H-E, MT ve AR boyamalarında dorsal kafa kemiklerinde trabeküler kemik oluşumları ve kemikler arasındaki sütür alanlarının olduğu gözlenmektedir. PBS grubunda oluşan trabeküler kemikler içerisinde kemik iliği alanlarının artmış varlığı görülmektedir. PBS grubu MT boyamasında da trabeküler kemik oluşumları ve etrafındaki bağ doku elemanlarının olağan varlığı gözlenmektedir. PBS grubunun AR boyamalarında trabeküler kemik alanları ve kemik içerisinde bulunan kalsiyum birikintileri görülmektedir. E6 anti-bFGF-2 uygulanan grupta H-E boyamasında dorsal kemiklerin olağan kemik oluşumuna göre daha ince olduğu ve sütür alanlarının açıklığı gözlenmektedir. MT boyamasında kırıldak alanların yoğunluğu, kemik iliği alanlarının azlığı gözlenmektedir. AR boyamasında PBS grubunda kemik oluşumunun gerçekleştiği ve kemik doku içerisinde kalsiyum birikintilerinin varlığı gözlenmektedir. E6 da anti-bFGF-2 verilen grupta ise AR boyamasında dorsal kemiklerde trabeküler kemik oluşumunun azlığı ve kemik doku içerisinde kalsiyum biriken alanların daha az olduğu gözlenmektedir (Tablo 4.3.3).

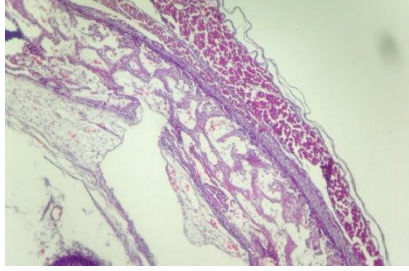
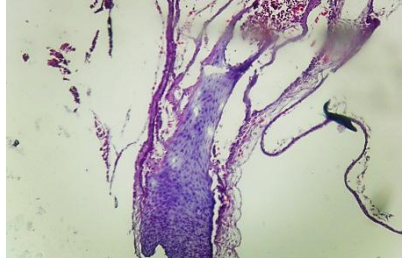
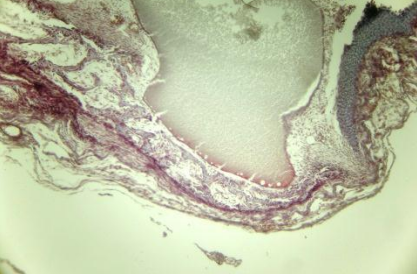
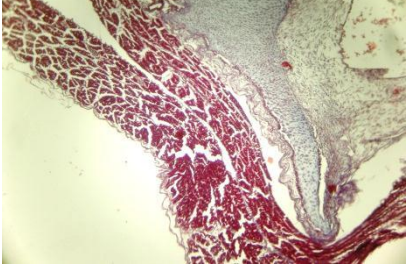
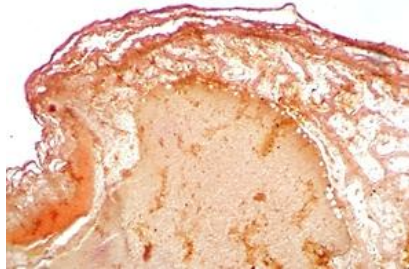
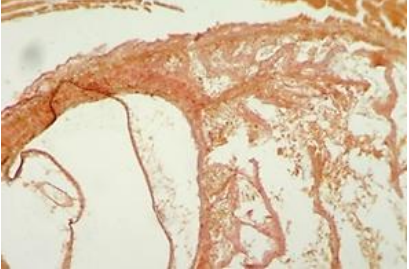
Tablo 4.3.3: E6 deneklerinde PBS ve anti-bFGF-2 uygulamaları sonrasında E15 morfolojik ve histolojik küçük büyütme görüntüleri.

E6 Anti-bFGF UYGULAMASININ E15 HİSTOKİMYA BULGULARI		
	E6 PBS	E6 0,1 µg/ml anti-bFGF-2
MM X10		
HE X40		
MT X40		
AR X40		

PBS uygulaması yapılan E6 örneklerin büyük büyütmelerinde H-E, MT ve AR boyamalarında dorsal kafa kemiklerinde trabeküler kemik oluşumları ve kemikler arasındaki sütür alanlarında kıkırdak dokunun varlığı ve sütür alanlarının kapanmış olduğu gözlenmektedir. PBS grubun H-E boyamasında



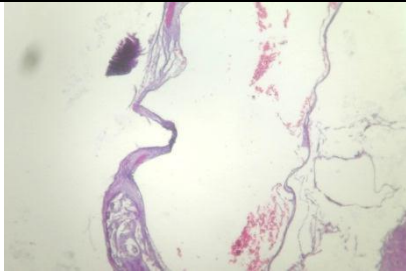
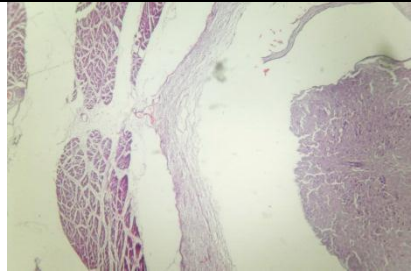

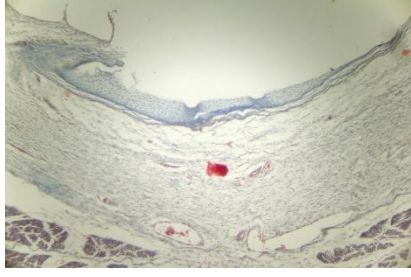
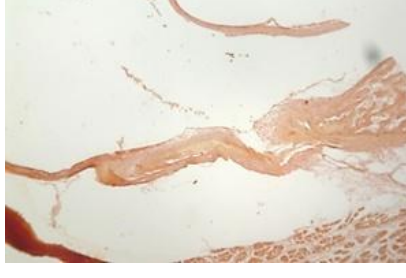
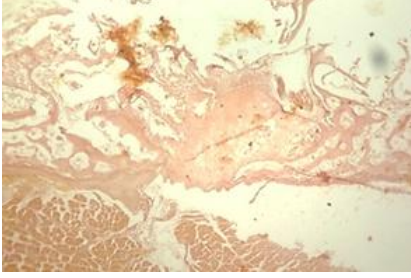
oluşan trabeküler kemikler içerisinde kemik iliği alanlarının varlığı görülmektedir. PBS grubu MT boyamasında da trabeküler kemik oluşumları ve etrafındaki bağ doku elemanlarının varlığı gözlenirken, ayrıca kemik doku içerisinde kıkırdağa ait bağ doku alanları gözlenmektedir. E6 anti-bFGF-2 uygulanan grupta H-E boyamasında kıkırdak alanların yoğunluğu bu alanlar içerisinde oluşması beklenen trabeküler kemiklerin azlığı ve kemik iliği alanlarının azlığı gözlenmektedir. E6 MT boyamasında bağ doku alanlarının genişliği ve kıkırdak dokusu gözlenmektedir. AR boyamasında PBS grubunda kemik oluşumunun gerçekleştiği ve kemik doku içerisinde kalsiyum birikintilerinin varlığı gözlenmektedir (Tablo 4.3.4).

Tablo 4.3.4: E6 deneklerinde PBS ve anti-bFGF-2 uygulamaları sonrasında E15 morfolojik ve histolojik büyük büyütme görüntüleri.

E6 Anti-bFGF-2 UYGULAMASININ E15 HİSTOKİMYA BULGULARI		
	E6 PBS	E6 0,1 µg/ml anti-bFGF-2
HE X100		
MT X100		
AR X100		

PBS uygulaması yapılan E8 örneklerin küçük büyütmelerinde H-E, MT ve AR boyamalarında dorsal kafa kemiklerinde trabeküler kemik oluşumları ve kemikler arasındaki sütür alanlarının kapanmış olduğu gözlenmektedir. PBS grubun H-E boyamasında oluşan trabeküler kemikler içerisinde kemik iliği alanlarının varlığı görülmektedir. PBS grubu MT boyamasında da trabeküler kemik oluşumları ve etrafındaki bağ doku elemanlarının varlığı gözlenirken, ayrıca kemik doku içerisinde kırırdağa ait bağ doku alanları gözlenmektedir. E8 anti-bFGF-2 uygulanan grupta H-E boyamasında kırırdağ alanlarının varlığı ve bu alanlar içerisinde trabeküler kemiklerin oluştuğu gözlenmektedir. E8 MT boyamasında bağ doku alanlarının ve kırırdağ dokusunun yerini kemiğe bırakmaya başladığı gözlenmektedir. AR boyamasında E8 anti-bFGF grubunda kemik oluşumunun gerçekleştiği ve kemik doku içerisinde kalsiyum birikintilerinin varlığı gözlenmektedir (Tablo 4.3.5).

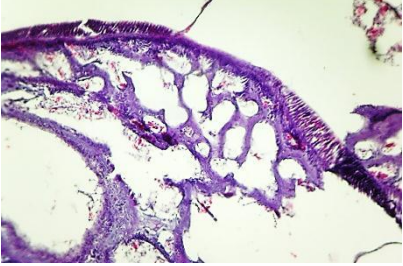
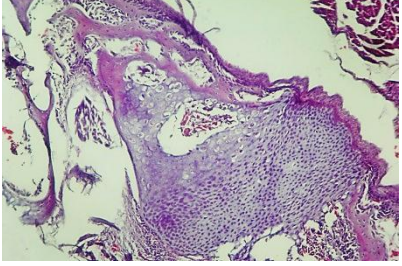
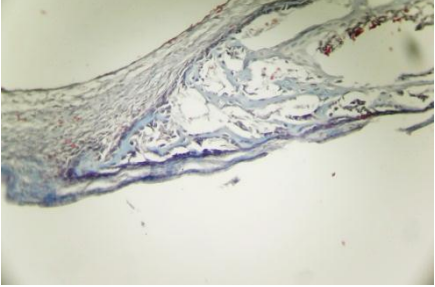
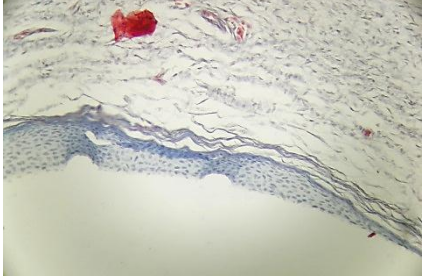
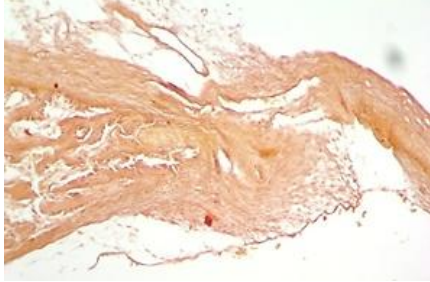
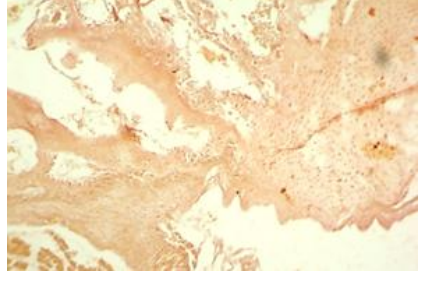
Tablo 4.3.5: E8 deneklerinde PBS ve anti-bFGF-2 uygulamaları sonrasında E15 morfolojik ve histolojik küçük büyütme görüntüleri.

E8 Anti-bFGF-2 UYGULAMASININ E15 HİSTOKİMYA BULGULARI		
	E8 PBS	E8 0,1 µg/ml anti-bFGF-2
MM X10		
HE X40		
MT X40		
AR X40		

PBS uygulaması yapılan E8 örneklerin büyük büyütmelerinde H-E, MT ve AR boyamalarında dorsal kafa kemiklerinde trabeküler kemik oluşumları ve kemikler arasındaki sütür alanlarının kapanmış olduğu gözlenmektedir. PBS grubun H-E boyamasında oluşan trabeküler kemikler içerisinde kemik iliği alanlarının varlığı görülmektedir. PBS grubu MT boyamasında da




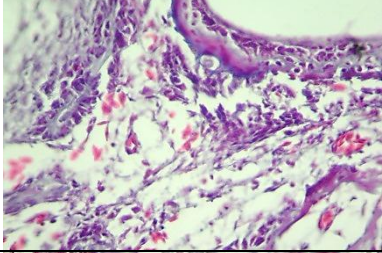

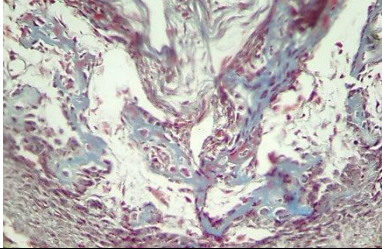
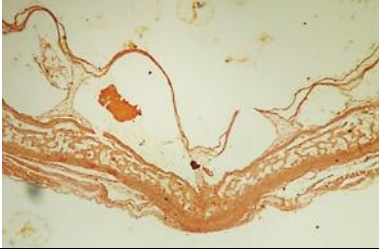
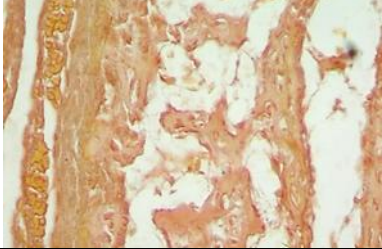
trabeküler kemik oluşumları ve etrafındaki bağ doku elemanlarının olağan varlığı gözlenirken, ayrıca kemik doku içerisinde kırıkdağa ait bağ doku alanları gözlenmektedir. AR boyamasında PBS grubunda oluşan kemiklerin kalsiyum birikintilerinin normal olduğu gözlenmektedir. E8 anti-bFGF-2 uygulanan grupta H-E boyamasında dorsal kemiklerde trabeküler kemik alanları arasında görülen sütür aralığında kırıkdağ oluşumunun tamamlandığı görülmektedir. E8 MT boyamasında sütür aralığında görülen bağ dokunun yerini kırıkdağ dokunun aldığı ve kemikleşmenin arttığı görülmektedir. AR boyamasında E8 anti-bFGF-2 grubunda kemik oluşumunun gerçekleştiği ve kırıkdağ doku içerisinde kalsiyum birikintilerinin varlığı görülmektedir (Tablo 4.3.6).

Tablo 4.3.6: E8 deneklerinde PBS ve anti-bFGF-2 uygulamaları sonrasında E15 morfolojik ve histolojik büyük büyütme görüntüleri.

E8 Anti-bFGF-2 UYGULAMASININ E15 HİSTOKİMYA BULGULARI		
	E8 PBS	E8 0,1 µg/ml anti-bFGF-2
HE X100		
MT X100		
AR X100		

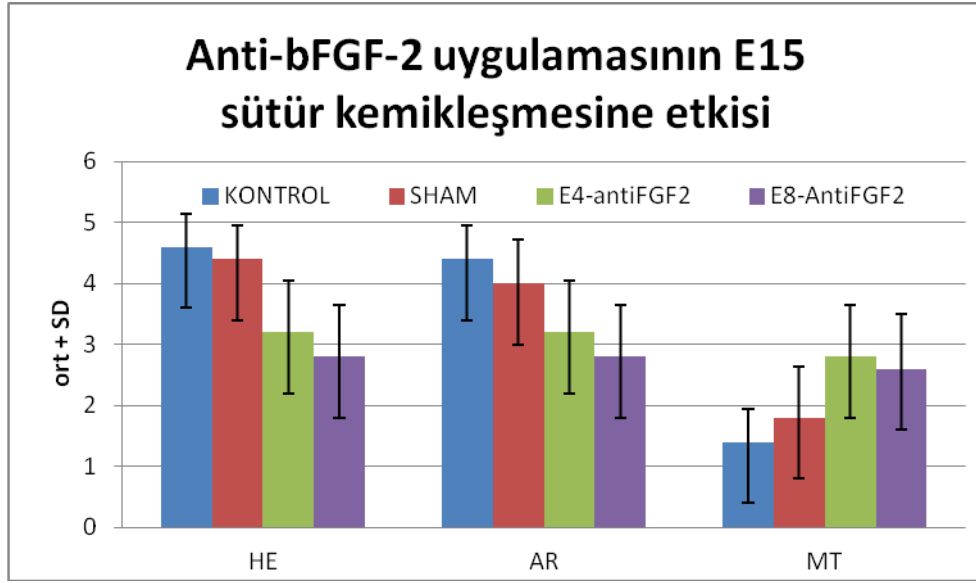
E15 uygulama yapılmayan kontrol grubunda H-E boyamasında kafa dorsal kemikleri arasındaki sütürlerin tamamen kapandığı ve trabeküler kemik oluşumunun tamamlandığı görülmektedir. MT boyamasında oluşan trabeküler kemik içerisinde kemik iliği alanlarının varlığı ve hücresel elemanların yoğunluğu izlenmektedir. Kemik etrafında yer alan bağ doku elemanlarının varlığı gözlenmektedir. AR boyamasında oluşumu tamamlanmış trabeküler kemik içerisinde kemik iliği alanları, kemik alanlarında kalsiyum birikiminin varlığı gözlenmektedir (Tablo 4.3.7).

Tablo 4.3.7: Hiçbir işlem yapılmamış kontrol grubunun E15 morfolojik ve histolojik küçük ve büyük büyütme görüntüleri.

KONTROL GRUBUNUN E15 HİSTOKİMYA BULGULARI		
MM X10		
	X 40	X 400
H-E		
MT		
AR		

Yapılan morfometrik skorlama sonucunda kemikleşme aşamasında sütürlerin histokimyasal olarak incelemesi yapıldı (Tablo 4.3.8).


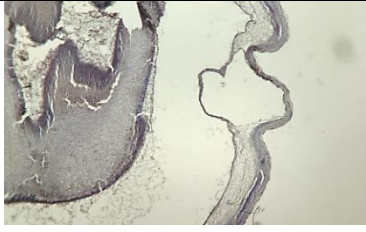
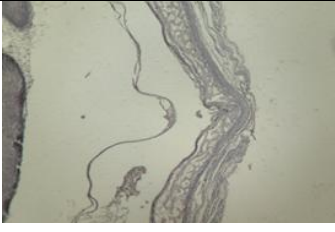

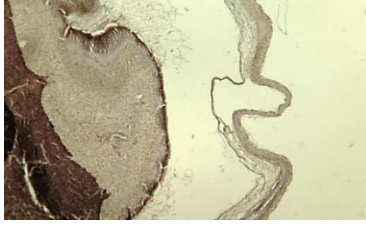
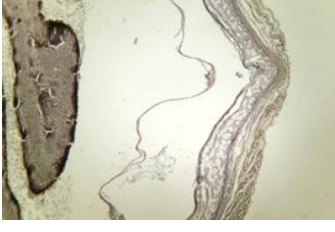
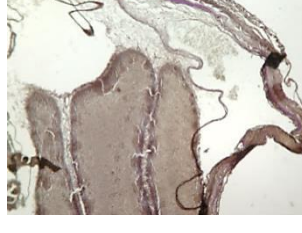
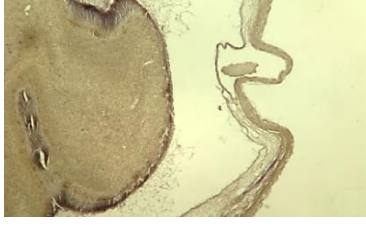

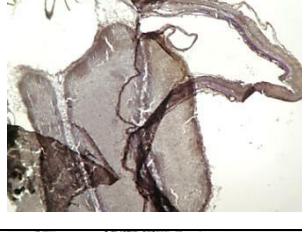
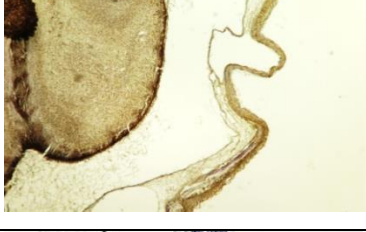
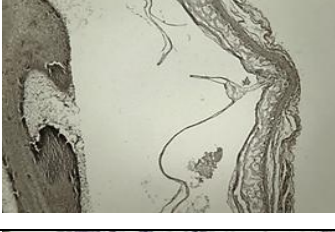
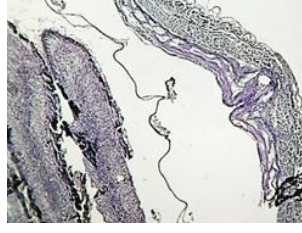

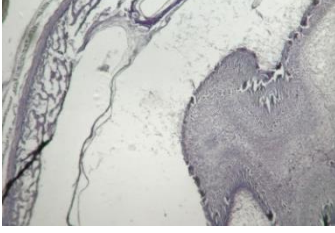
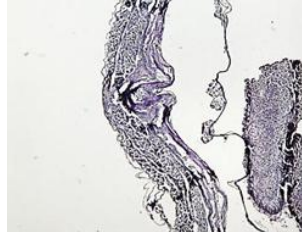

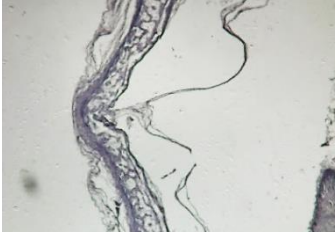
Tablo 4.3.8: Sitokimyasal Bulguların Skorlama Analizleri.



4.4. İmmunositokimyasal Bulgular

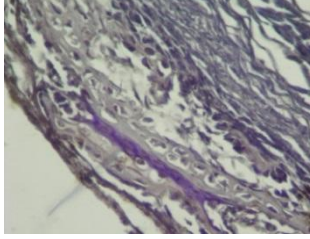
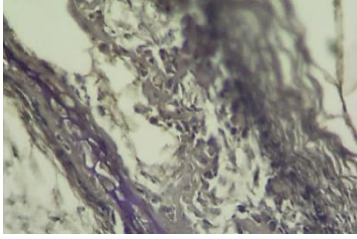
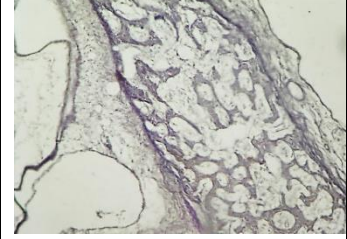
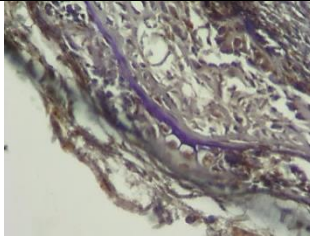
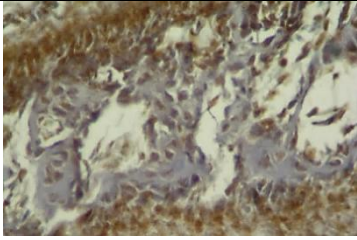
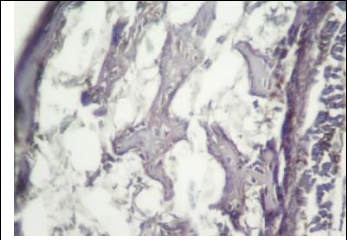
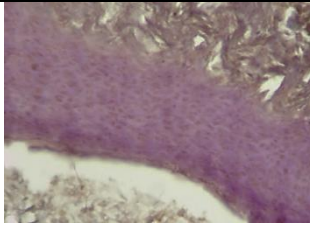

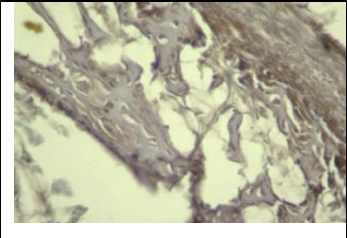

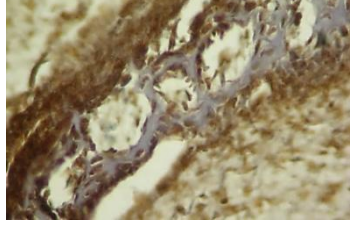
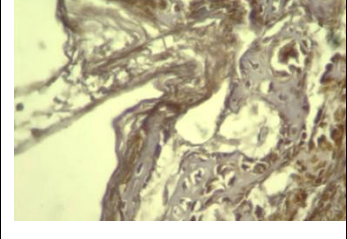
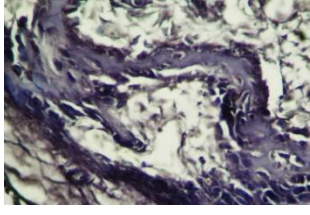
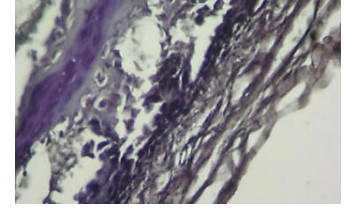
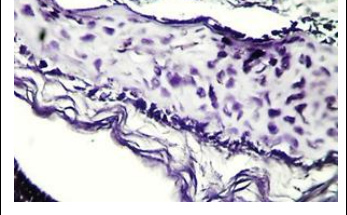
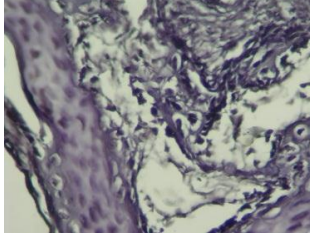
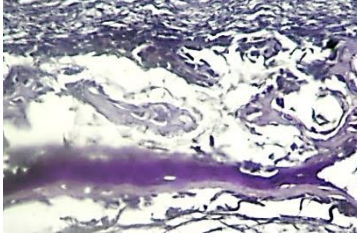
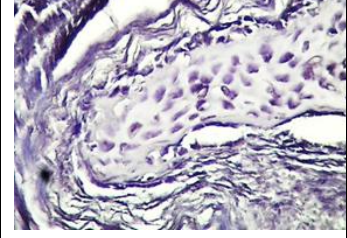
E15 örneklerinde yapılan immun boyamalarda, kontrol grubu olarak primer antikor yerine PBS konmuş boyamalarda arka planda yıkamadan kalan boyamaların dışında özgün boyanma izlenmedi ve yapılan immunositokimya boyamalarının özgün boyamalar olduğu görüldü. Kullanılan parametrelerde PCNA, iNOS, eNOS ve TUNEL boyamalarında tüm boyamalar için bazal bir seviyenin var olduğu ancak bloklama yapılmış örneklerde artmış NOS boyamalarına paralel TUNEL immun pozitifliği izlendi (Tablo 4.4.1).

Tablo 4.4.1: E4 örneklerinde yapılan uygulamaların gruplar arasında karşılaştırmaları açısından E15 immunositokimyasal küçük büyütme görüntüleri.

E4 Anti-bFGF-2 UYGULAMASININ E15 İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI			
	E4 PBS	E4 0,1 µg/ml anti-bFGF-2	KONTROL
KNT X40			
PCNA X40			
ENOS X40			
İNOS X40			
TNL KNT X40			
TNL X40			

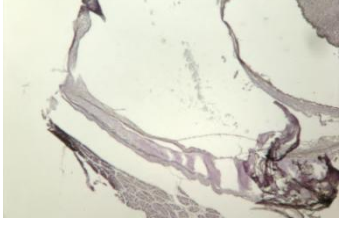
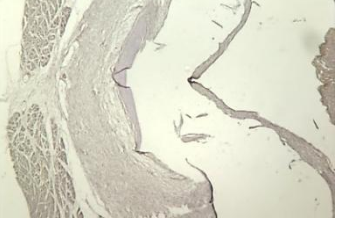
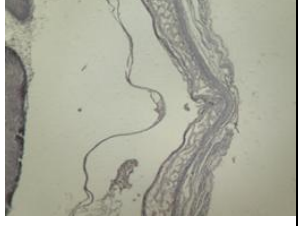
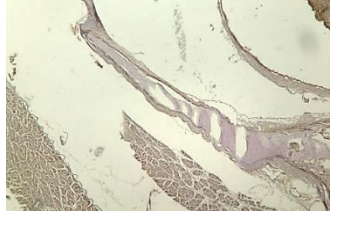
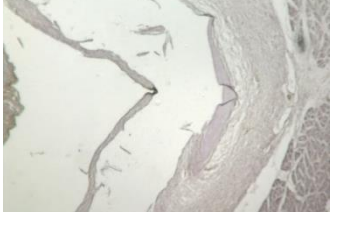
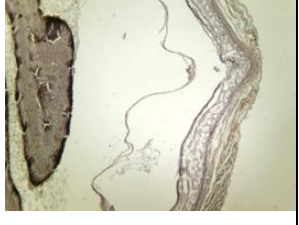

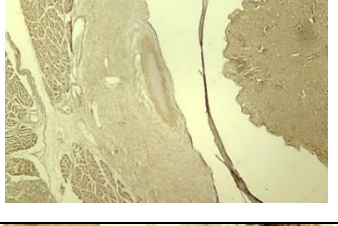

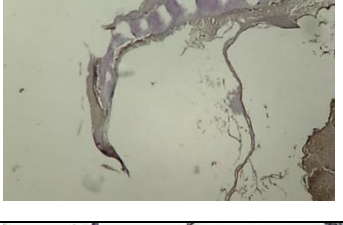

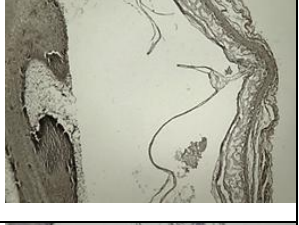
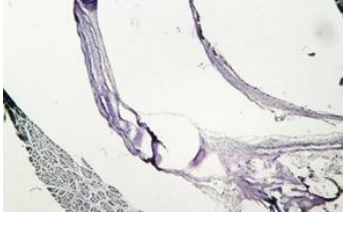
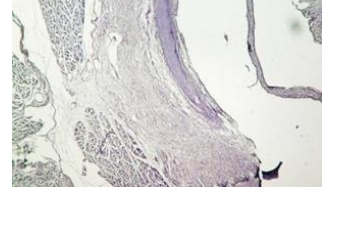
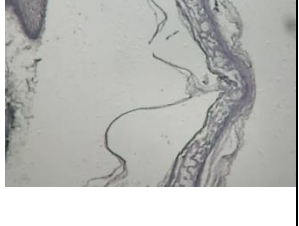
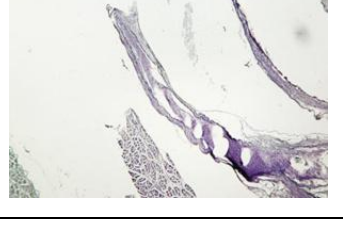
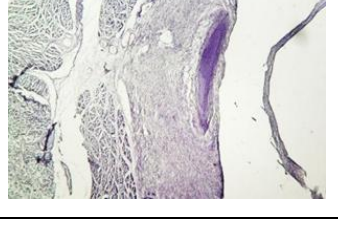
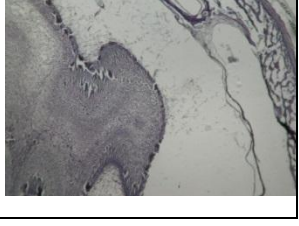
E15 örneklerinde yapılan immun boyamaların büyük büyütmelerinde kontrol grubu olarak primer antikor yerine PBS konmuş boyamalarda arka planda yıkamadan kalan boyamaların dışında özgün boyanma olmadığı daha net olarak izlendi. Kontrol amaçlı boyamalar ile karşılaştırıldığında primer antikor boyamalarının özgün olduğuna karar verildi. Büyük büyütmelerde boyamaların incelenen parametrelerde PCNA, iNOS, eNOS ve TUNEL boyamalarında nükleer boyamalar olduğu saptandı. Ayrıca yine tüm boyamalar için bazal bir seviyenin var olduğu görüldü. Bu bazal seviyenin bloklama yapılmış örneklerde arttığı bulundu. Artmış NOS boyamalarına paralel TUNEL immun pozitifliği artmış oksidatif strese cevap olarak apoptotik hücre ölümünün varlığı izlendi (Tablo 4.4.2).

Tablo 4.4.2: E4 örneklerinde yapılan uygulamaların gruplar arasında karşılaştırmaları açısından E15 immunositokimyasal büyük büyütme görüntüleri

E4 Anti-bFGF-2 UYGULAMASININ E15 İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI			
	E4 PBS	E4 0,1 µg/ml anti-bFGF-2	KONTROL
KNT X100			
PCNA X100			
ENOS X100			
İNOS X100			
TNL KNT 400			
TNL X400			

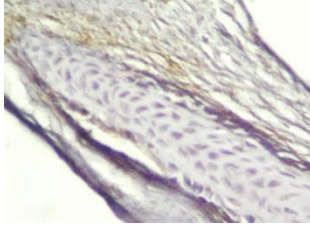
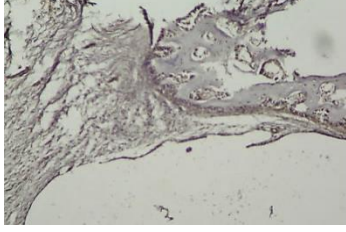
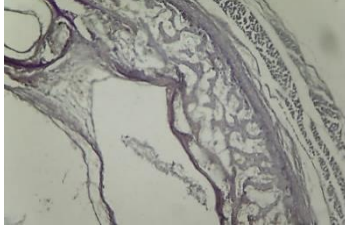
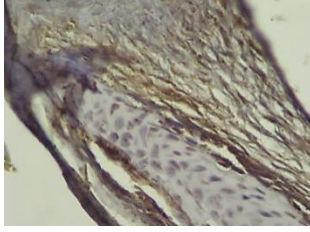
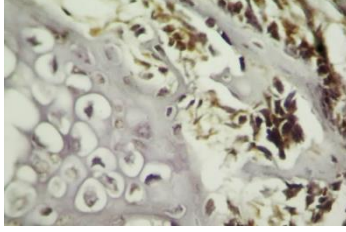
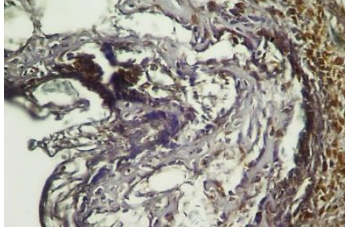
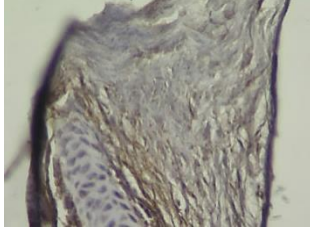
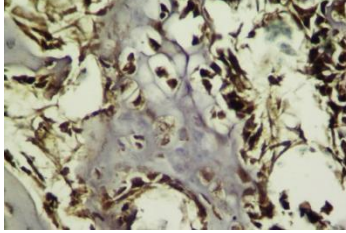
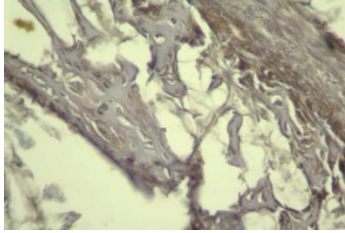
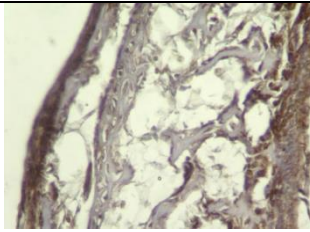
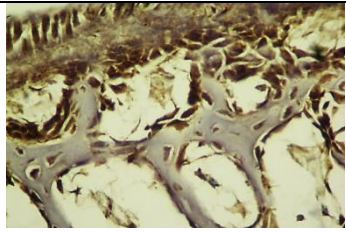
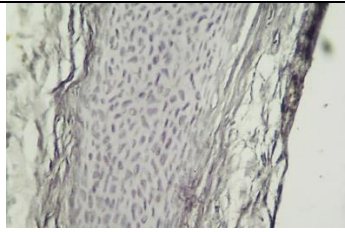
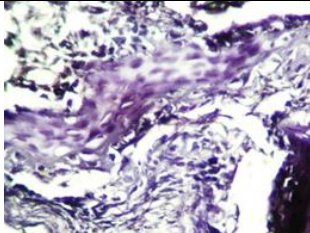
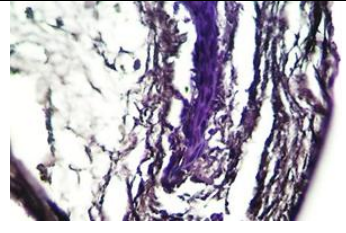
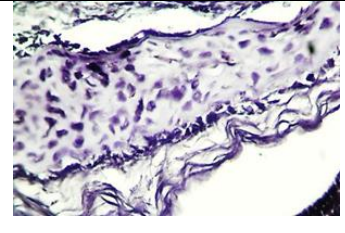
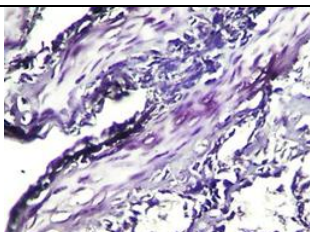
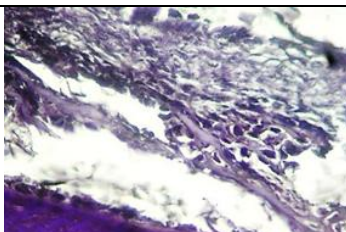
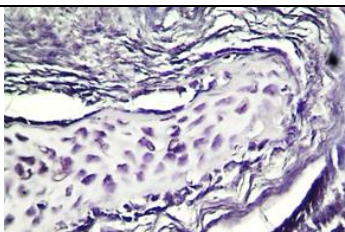
E8 uygulama yapılmış deneklerin E15 örneklerinde yapılan immun boyamalarda, kontrol grubu olarak primer antikor yerine PBS konmuş boyamalarda arka planda yıkamadan kalan boyamaların dışında özgün boyanma izlenmedi ve yapılan immunositokimya boyamalarının özgün boyamalar olduğu görüldü. Kullanılan parametrelerde PCNA, iNOS, eNOS ve TUNEL boyamalarında tüm boyamalar için bazal bir seviyenin var olduğu ancak bloklama yapılmış örneklerde artmış NOS boyamalarına paralel TUNEL immun pozitifliği izlendi. Bu bazal seviyenin bloklama yapılmış örneklerde arttığı bulundu. Artmış NOS boyamalarına paralel TUNEL immun pozitifliği artmış oksidatif strese cevap olarak apoptotik hücre ölümünün varlığı izlendi (Tablo 4.4.3).

Tablo 4.4.3: E8 örneklerinde yapılan uygulamaların gruplar arasında karşılaştırmaları açısından E15 immunositokimyasal küçük büyütme görüntüleri.

E8 Anti-bFGF-2 UYGULAMASININ E15 İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI			
	E8 PBS	E8 0,1 µg/ml anti-bFGF-2	KONTROL
KNT X40			
PCNA X40			
ENOS X40			
İNOS X40			
TNL KNT X40			
TNL X40			

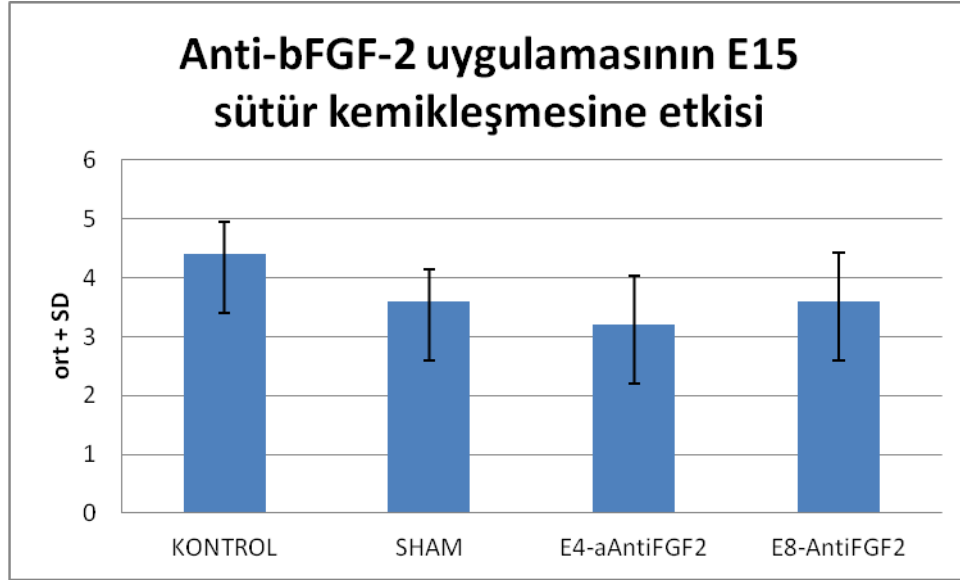
E8 uygulama yapılmış deneklerin E15 örneklerinde yapılan immun boyamalarda, kontrol grubu olarak primer antikor yerine PBS konmuş boyamalarda arka planda yıkamadan kalan boyamaların dışında özgün boyanma izlenmedi ve yapılan immunositokimya boyamalarının özgün boyamalar olduğu görüldü. Kullanılan parametrelerde PCNA, iNOS, eNOS ve TUNEL boyamalarında tüm boyamalar için bazal bir seviyenin var olduğu ancak bloklama yapılmış örneklerde artmış NOS boyamalarına paralel TUNEL immun pozitifliği izlendi. Bu bazal seviyenin bloklama yapılmış örneklerde arttığı bulundu. Artmış NOS boyamalarına paralel TUNEL immun pozitifliği artmış oksidatif strese cevap olarak apoptotik hücre ölümünün varlığı izlendi (Tablo 4.4.4).

Tablo 4.4.4: E8 örneklerinde yapılan uygulamaların gruplar arasında karşılaştırmaları açısından E15 immunositokimyasal büyük büyütme görüntüleri.

E8 anti-bFGF-2 UYGULAMASININ E15 İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI			
	E8 PBS	E8 0,1 µg/ml anti-bFGF-2	KONTROL
KNT X100			
PCNA X100			
ENOS X100			
INOS X100			
TNL KNT X400			
TNL X400			

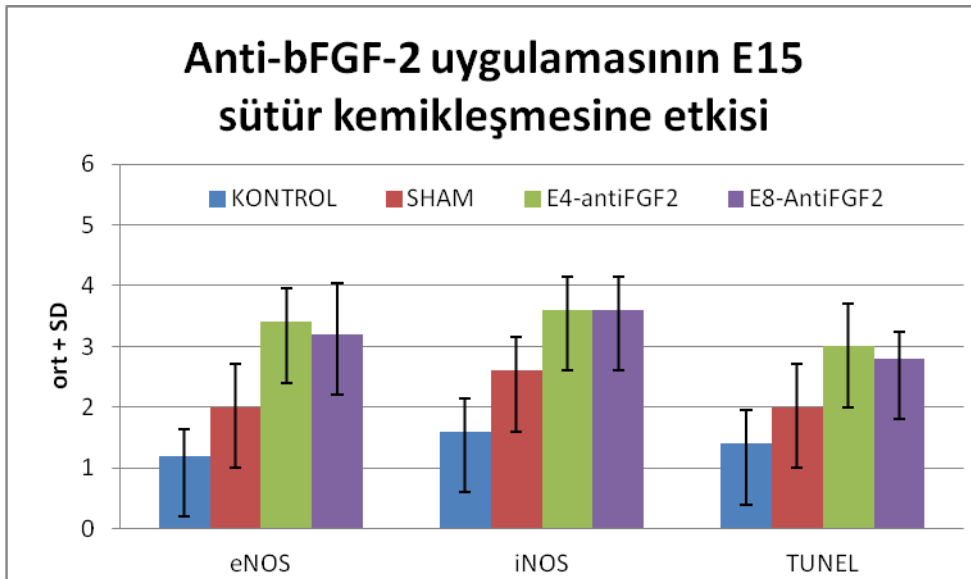
Yapılan morfometrik skorlama sonucunda kemikleşme aşamasında sütürlerin immunositokimyasal olarak çoğalmaları açısından PCNA ile incelemesi yapıldı (Tablo 4.4.5).

Tablo 4.4.5: İmmunositokimyasal bulguların çoğalma belirteci PCNA için skorlama analizleri.



Yapılan morfometrik skorlama sonucunda kemikleşme aşamasında sütürlerin immunohistokimyasal olarak incelemesi yapıldı (Tablo 4.4.6).

Tablo 4.4.6: Bulguların skorlama analizleri.



5. TARTIŞMA

Bu çalışmada anti-bFGF-2 antikor bloklaması kullanılarak, kontrol ve sham (PBS) ile karşılaştırıldığında özellikle E8 tavuk embriyolarında yüksek dozda yapılan uygulamada önemli bir fark saptandı. E15 tavuk embriyolarının sütürleri morfolojik, histolojik ve protein düzeyinde incelendiğinde beklenen sütür kapanmasında erkenleşmenin aksine gecikmenin olduğu önemli bir bulgu olarak ortaya kondu. Bu bulgunun FGF düzenlemesinde sütür kapanmasındaki rolünü ortaya koymakla kalmayıp doz farklılığının değişik etkiler oluşturduğuna işaret etti. Bu bulguların klinik anlamlılığı ileri çalışmalar ile ortaya konabilecek ve mağdur olan hastalar için tedavi açısından önemli bilgiler kazanılmasını sağlayacaktır.

Kraniyosinostoz klinik olarak kolayca tanınabilen, radyoloji ile ortaya konulan ancak mekanizması tam olarak anlaşılamamış bir sendromdur. Fetal kraniumda, intramembranöz kemikleşme kemiklerin merkezinden periferde doğru radyal şekilde ilerler ve osteojenik kenarlar zaman içinde birbirlerine yaklaşır. Osteojenik kenarlar diferansiye olmamış hücreler ve preosteoblastlardan oluşur. Zaman içinde karşı karşıya gelen kenarlardan kranial sütürler oluşur. Beyin büyümesi devam ederken osteojenik kenarlardan kemik yapımı da devam eder; ancak komşu kemikle herhangi bir temas veya kaynama olmaz. Bir teoriye göre karşı karşıya gelen osteojenik kenar hücrelerinde apoptoz veya programlı hücre ölümü gerçekleşmesi bu teması engellemektedir (75). Dura materin, kranial sütürlerin biyolojisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Duranın bu etkisini, üstteki sütürlere sıkıca bağlı olduğu fibröz ligamanlarla veya büyüme faktörleri yoluyla ilettiği şeklinde çeşitli görüşler mevcuttur. Sütür biyolojisini etkileyen büyüme faktörlerinin internal periost gibi davranan duradan kaynaklanarak etki ettiği

düşünülmektedir (76). Fiziksel kuvvetlerin ortada olmadığı bir doku kültürü çalışmasında sütür ve dura arasındaki bilgi alışverişi veya işaretleşmenin, parakrin yolla bazı büyüme faktörleri tarafından sağlandığı gösterilmiştir (77). Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da, büyüme faktörlerinin kranial sütürlerin kapanmasını düzenleyici, parakrin bir etkileri olduğu gösterilmiştir (47,64,78). Yapılan çalışmalarda fibroblast kökenli büyüme faktörlerinin kranial sütürlerin açık kalmasını sağlayan sütür-dura arası iletişimi sağlayan maddeler olduğunu ve kranial kaide kuvvetlerinden bağımsız olarak fetal sütür morfogenezinde etkili olduklarını ileri sürmüşlerdir (76,77). Ayrıca bu faktörlerin kranial sütürlerdeki gelişim patolojilerine bağlı olarak, kraniofasial anomalilerde de rol oynadığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda gözlenen bulgular yapılan çalışmalar ile uyumlu olup, FGF'ün kafa kemiklerinin gelişimi sırasında önemli rol oynadığına işaret etmektedir.

Vertebralıların kafatası üç bileşkeden meydana gelen modüler bir yapıya sahiptir. Kranial çatı çoğunlukla nöral krest kökenli ektomezenkimal hücrelerden oluşmaktadır. Bu nöral krest kökeni sadece osteojenik hücreleri içermemekte kranial çatı dışındaki sütürlerde de özellikle büyüme zonlarında bulunmaktadır. Kranial çatının normal gelişimi osteoblasta farklılaşan hücreler ile osteojenik prekürsörlerin çoğalmasındaki dengeye bağlıdır. Bölgeye, yaşa ve sağlığa bağlı olarak sütürler açık kalmakta ve kranial çatının büyüyen beyin ile uyumlu ilişkisi sağlanmaktadır. Bu çoğalma ile farklılaşma arasındaki dengeyi etkileyen bir diğer faktörde altta yatan duradır (61,62,63). Bu büyüme ile farklılaşma arasındaki ilişki sütürler için de önemli olup normal kafatası gelişimini yönlendirmektedir. Bu ilişkileri yönlendiren bir diğer faktör de rostral beyinde bulunan FGF ailesinin 8, 18 ve 14 numaralı üyeleridir. Özellikle orta beyin gelişiminde FGF-8 ve FGF-18'in rolü daha da önemli gözükmektedir. FGF-13'de burada yer almaktadır (54). Bizim uygulamamızda FGF-2 hedef olarak kullanıldı ve anlamlı farklılık oluşması sağlandı. E2, E4, E6 ve E8 gibi diğer gruplarda da oluşan farklılığın devam ettiğini gördük. Bu sonuçlar ile tavuk embriyo gelişiminin geç evrelerinde daha da belirginleşen doza bağımlı bir etkinin oluştuğunu saptadık.

FGF reseptör mutasyonları Apert, Crouzon, Pfeiffer ve daha nadir görülen birçok kraniyosinostoz sendromlarındaki temel sebeptir. Mutasyonların önemli bir kısmı FGFR2'den kaynaklanmakta, daha az bir kısmı FGFR3'ten, bir tanesi de FGFR-1'den köken almaktadır (11). FGFR-4 kaynaklı bir mutasyon henüz gösterilememiştir. Prostaglandinler humoral bir mekanizma ile artrit, periodontal hastalıklar, osteomyelit ve kırık gibi kemik rahatsızlıklarında lokal kemik rezorbsiyonuna veya oluşumuna etki etmektedirler (79). Genetik olarak modellenen kraniyosinostoz karmaşıklığı ve etkinin oluşmasındaki farklılıklar nedeni ile daha zor çalışılmakta bu nedenle protein veya reseptör düzeyinde yapılan modellemelerde daha kolay çalışılarak temel mekanizmalar anlaşılmaya çalışılmaktadır (55). Bu çalışmada bu nedenle hedef olarak seçilen FGF-2 proteini antikör yardımı ile bloklandı ve oluşan etki incelendi. Moore ve ark. nın yaptığı benzer bir çalışmada hem kafa sütürlerinin hem de ekstremitelerin gelişimi incelenmiş ve bizim bulgularımızla çelişen bir kraniyosinostoz durumu ortaya konmuştur (55). Kendi çalışmalarında kafa kemikleri ile ekstremiteler arasında da benzer çelişkiyi yazarlar farklı düzeyde etkiye ve buna bağlı reseptör cevabı ile açıklamışlardır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da farklı konsantrasyonlarda yapılan bloklamanın farklı etki gösterdiği ortaya çıkmış ve bunun açıklamasında yer alacağı düşünülmüştür. Kranial sütürlerin gelişiminde FGF için gerçekleşen rol iki farklı biçimde olabilir. Düşük dozda farklılaşmaya yönlendiren FGF yüksek dozda çoğalmayı stimüle etmektedir. Bizim çalışmamızda da bu etki düşük doz etkisine benzer gözükmektedir. Bu nedenle bizim çalışmamızda kraniyosinostoz bulgularından ziyade kırık daklaşma hâkimiyeti görüldü. Bu da Moore ve arkadaşlarının yaptığı benzer çalışmada yapılan açıklama ile uyumlu bulundu (55).

TGF- β , IGF-2, FGF gibi büyüme faktörlerinin, kranial sütürlerin ve kranial defektlerin kapanmasında parakrin yolla düzenleyici bir rolü olduğu bilinmektedir. Kapanmakta olan kranial sütürlerde, TGF- β immünreaktivitesinin arttığı, açık sütürlerde ise işaretlenmenin az olduğu veya olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca kraniumda cilt altı dokuya verilen TGF- β 'nin periost tabakasında proliferasyon ve yeni kemik yapımına yol açtığı da

gösterilmiştir (11,62). Bir çalışmada TGF- β işaretlenmesinin, deney ve kontrol gruplarında frontal sütürün aktif kemikleşme sürecinde olduğu onbeşinci günde; sagittal sütürde ise aktif sürecin devam ettiği onbeşinci ve otuzuncu günlerde, bağ dokusundaki fibroblastlar ve yeni kemik matriksini sentezlemekte olan osteoblast gruplarında arttığı izlenmiştir (12). Diğer büyüme faktörlerinin etkisi bizim bulgularımız açısından da önem taşımaktadır. Bloklama ile diğer büyüme faktörlerinin nasıl etkilendiği veya kompanze etmek amaçlı nasıl bir organizasyona gittiği bilinmemektedir. Yapılan bu çalışmalardan çıkan sonuç göz önüne alındığında diğer faktörler ve özellikle TGF- β 'nin FGF ile uyumundaki bozulmanın, doz bağımlı bir şekilde kemikleşme sürecini etkilediğini göstermektedir. Yapılacak bir çalışmada FGF blokması sonrasında çift işaretlemeli bir immunohistokimya çalışması ile TGF dağılımı ve aynı zamanda PCR çalışması ile bu proteinin mRNA düzeyinde regülasyonu bu soruların cevaplandırılmasında önemli bilgiler verecektir.

Dışardan verilen bFGF'nin osteogenezi hızlandırdığı, kemik oluşumu ve kırık iyileşmesi sırasında da FGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (62). FGF reseptör mutasyonlarının ise kraniyosinostoz sendromlarının etyolojisinde önemli bir yeri vardır. Özellikle FGFR1 ve FGFR2'deki mutasyonlar Apert, Crouzon, Pfeiffer ve daha nadir görülen bazı sendromik kraniyosinostozların sebebidir. Mutasyona uğramış FGF reseptörleri devamlı aktif kalmakta ve aşırı fonksiyon sergilemektedir. Sendromik kraniyosinostozlardaki patolojik sütür kapanması bu mekanizma ile açıklanmaktadır. Kapanmakta olan kranial sütürlerde görülen artmış FGF immün boyanması da bu mekanizma ile uyumluluk göstermektedir (62,65,80). Tunçbilek'in fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada TGF- β 1 ve FGF-2 immunositokimyasal ekspresyonları, iloprost uygulanan gruplarda gerek frontal sütürde, gerekse de sagittal sütürde artmış olarak izlendi. İmmünohistokimyasal incelemeler sonucunda elde edilen sonuçlar sütür kapanması sürecinde beklenen TGF- β 1 ve FGF-2 ekspresyonlarındaki artış eğilimine uygun bulunmuş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır (12). Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki sonuçlar ile tam aksi

yönde olmakta ancak hem farkın anlamlı olmaması hem de mekanizmasının tam olarak açıklanamaması karşılaştırma yapmamıza olanak vermemektedir. Ayrıca fare ile tavuk kafa kemiklerinin gelişimlerinin karşılaştırılmaması da dezavantaj olmaktadır. Bununla birlikte benzer uygulamanın hem daha ucuz hem de takibi daha kolay olan tavuk embriyolarında denenmesi önemli bilgiler verecektir. Tavukta embriyoya etki daha güvenilir ve kolay bir yol ile gerçekleşmektedir.

FGF ligandlarının kranial kemiksel farklılaşmadaki rolleri retroviral yolla yapılan mutasyonlar sonucunda FGFR2 için FGF-3 ve FGF-4 genlerinde saptanmış ve bu örneklerde Crouzen sendromunun bulguları görülmüştür (81,82). Yapılan başka çalışmalarda da FGFR2'nin mutasyonu ile fare karaniyal sütürlerinde ektopik osteopontin tanımlaması saptanmış osteojenik farklılaşmanın erken faktörü olan bu belirtecin FGF-2'nin azalması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (70,71,83,84). Daha da önemlisi FGF-2'nin nöral krest hücrelerini çoğalmaya götürmekle kalmayıp kıkırdak ve kemik yapımına yönlendirmektedir (72). Yapılan bir seri çalışmada tavuk embriyonik kafatasına endojen FGF-2 düzeyini değiştirmek amaçlı implantasyon yapılmış ve endojen FGF-2 nin azalmasına bağlı olarak kafa çatısının kemikleşecek hücreleri farklılaşmadan çoğalmaya yönelmiştir (55,70,71,72). Bu çalışmanın bulguları bizim çalışmamızda bulunan bulguların açıklaması için bir başka kanıt olmaktadır. Hücrelerin kemikleşme yerine PCNA ile gösterilen çoğalmaya yönelmesinde endojen FGF azalması suçlanmaktadır (85). Bizim FGF bloklamamız da benzer bir durum ortaya çıkararak aynı şekilde etki etmiş ve hücreleri kemik farklılaşması yerine çoğalmaya yönlendirerek kıkırdak dokusunun hakim olmasını sağlamış olabilir. Bu durumda kullanılan bloklayıcı antikorunun düzeyinin önemi ve etkinliği de bu çalışmada görülen sonuçlar ile açıklanabilir. Çünkü bu çalışmada endojen FGF-2'nin azaltılması daha ileri aşamaya götürülürse hem çoğalma hem farklılaşma bozulmaktadır. Birçok çalışma ile bu bulgu gösterilmiştir. Daha da önemlisi bu çalışmalar ile FGFR genlerindeki mutasyona bağlı ortaya çıkan kraniyosinostozda asıl nedenin reseptör aktivasyonu ve sinyal yolağındaki artış olduğu düşünülmüştür. FGF'nin reseptörleri ile bu değişik ilişkisi

Crouzon ile diğer sendromlar arasındaki farkların açıklaması da olabilir. Özellikle reseptörlerde gözlenebilen alternatif genetik modifikasyon görülen farklı sonuçların da nedeni olabilir (86). Bu bulgular ışığında FGF-2 blokması ile elde edilen erken kemikleşme ve sütür kapanması yerine kıkırdaklaşmada kalınması ve kapanmanın gecikmesi mekanizmasal olarak da açıklanabilir bulgular olarak ortaya konmaktadır.

Bizim çalışmamızda ortaya konan bir diğer bulgu bloklama ile ortaya çıkan oksidatif stress ve onun yönlendirdiği apoptotik ölüm mekanizmasıdır. Sham grubu ile sadece PBS verilen uygulamalar karşılaştırıldığında antikor ile bloklamada görülen belirgin bir serbest radikal artışı FGF proteinlerin gelişim sırasında dengeyi sağladığını ve oksidatif stress oluşumunu belirli bir düzeyde tuttuğunu göstermektedir. Yine gelişim sürecinde belirli bir düzeyde var olan apoptoz doğru yerde doğru sayıda hücre olmasını sağlamak amaçlı olarak gerçekleşmektedir. Bu doğal mekanizmayı aşan bir hücre ölümü direk olarak gösterilemese de oluşan oksidatif stres ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Birçok çalışmada oksidatif stres ve apoptoz ilişkisinin ortaya konmuş olması (87,88,89,90) bizim çalışmadaki bulgulardan FGF blokması ile ilgili bir mekanizmanın varlığına işaret etmektedir. Bu konuda yapılması gereken bir başka önemli çalışma ise FGF bloklama yerine dışarıdan FGF verilerek kranial sütürler üzerine yapacağı etkilerin incelenmesi olabilir. Yapılacak böyle bir çalışma mevcut çalışmadan çıkan bulguların açıklanmasında önemli rol oynayacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kontrol, sham ve bloklama gruplarından elde edilen morfolojik ölçüm sonuçları karşılaştırıldığında özellikle sagittal ve koronal sütürlerde anlamlı bir farklılığın olduğu saptandı.

Histolojik incelemelerde H-E, AR ve MT ile saptanan sütürlerin tam olarak kapanmadığı, kapanmanın kontrol gruplarına göre geciktiği ve kemikleşmenin kontrol gruplarına oranla daha geri aşamalarda olduğu gösterildi.

İmmunohistokimyasal değerlendirmelerinde PCNA ile çoğalmanın özellikle E8 deneklerde ve yüksek konsantrasyon FGF-2 bloklamasında gerçekleştiği izlendi.

FGF-2'nin bir büyüme faktörü olarak kafa kemiklerinin gelişiminde önemli rol oynadığı bloklama ile gösterildi ve diğer büyüme faktörlerinin sütürler üzerindeki düzenleyici rollerini etkileyebileceği düşünülerek kafa kemiklerinde sütürlerin kapanmasının karmaşık mekanizmaların birleştiği bir süreç ile gerçekleştiğine işaret etti. Bu çalışmada ortaya konan bulgular ile FGF-2 bloklamasının tavuk embriyolarının kemikleşme sürecinde doz bağımlı bir biçimde sütür kapanmasında gecikmeye neden olduğu ortaya kondu. Bunun bir anlamı, embriyonik dokulardaki endojen FGF düzeylerinin kranial iskelet dokularındaki gelişimi farklı biçimlerde yönlendirdiği düşünülmektedir. Bu etkiye diğer büyüme faktörlerinin çoğalma ve farklılaşmayı yönlendiren etkenlerin katkısı sütürlerin kapanmasında rol oynayan mekanizmaların daha da karmaşık olmasını sağlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Hollway GE, Phillips H.A, Ades LC, Haan EA, Mulley JC. Localization of craniosynostosis Adelaide type to 4p16. *Hum Mol Genet.* 1995;Apr4(4):681-683.
2. Wilkins RH. *Neurosurgical Classics.* American Association of Neurological Surgeons U.S.A. 1992.
3. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology,* Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
4. Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome, *Nat Genet.* 1995;Feb9(2):165-172.
5. de Jong T, Bannink N, Bredero-Boelhouwer HH, van Veelen ML, Bartels MC, Hoeve LJ, Hoogeboom AJ, Wolvius EB, Lequin MH, van der Meulen JJ, van Adrichem LN, Vaandrager JM, Ongkosuwito EM, Joosten KF, Mathijssen IM. Long-term functional outcome in 167 patients with syndromic craniosynostosis; defining a syndrome-specific risk profile. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;Oct63(10):1635-41.
6. Rijken BF, Lequin MH, de Rooi JJ, van Veelen ML, Mathijssen IM. Foramen magnum size and involvement of its intraoccipital synchondroses in Crouzon syndrome. *Plast Reconstr Surg,* 2013;Dec132(6):993e-1000e.
7. Driessen C, Plomp RG, van der Spek PJ, Ince C, Kulik W, Mathijssen IM, Joosten KF. Is there an effect of obstructive sleep apnea syndrome on oxidative stress and inflammatory parameters in patients with craniofacial anomalies. *J Craniofac Surg.* 2013;Nov24(6):1908-1913.
8. Florisson JM, Mathijssen IM, Dumee B, Hoogeboom JA, Poddighe PJ, Oostra BA, Frijns JP, Koster L, de Klein A, Eussen B, de Vries BB, Swagemakers S, van der Spek PJ, Verkerk AJ. Complex

craniosynostosis is associated with the 2p15p16.1 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;Feb161A(2):244-253.

9. Bemmell V, *Craniosynostosis: Clinical And Fundamental Aspects*, 2000.
10. Kokich VG. *Biology of suture*, "Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation and Management" (Ed. M. M., Cohen)'de Raven Press, New York. 1986;s. 81-103.
11. Cohen MM Jr. *Sütürel Pathology*, "Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation and Management" (Ed. M. M. Cohen and R.E. MacLean)'de, New York-Oxford University Press, New York-Oxford. 2000;s.51-68.
12. Tunçbilek MG, *Prostasiklinin rat kranial sutureleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi*. Hacettepe Üniversitesi. 2006.
13. Kimonis V, Gold JA, Hoffman TL, Panchal J, Boyadjiev SA. Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol*. 2007;Sep14(3):150–161.
14. Virchow R. *Über den Cvertinismus, namentlich in Franken, und Über Pathologische Schädelformen*. *Verb Phys Med Gesell Würzburg*. 1851;2:230-256.
15. Kapp-Simon KA, Speltz ML, Cunningham ML, Patel PK, Tomita T. Neurodevelopment of children with single suture craniosynostosis: a review. *Childs Nerv Syst*. 2007;Mar23(3):269–281.
16. Persing JA. MOC-PS(SM) CME article: Management considerations in the treatment of craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg*. 2008;Apr121(4 Suppl):1–11.
17. Alderman BW, Fernbach SK, Greene C, Mangione EJ, Ferguson SW. Diagnostic practice and the estimated prevalence of craniosynostosis in Colorado. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1997;Feb151(2):159-164.
18. Dhellemmes P, Pellerin P, Lejeune JP, Lepoutre F. Surgical treatment of trigonocephaly. Experience with 30 cases. *Childs Nerv Syst*. 1986;2(5): 228-232.
19. DiRocco C, Caldarelli M, Ceddia A, Iannelli A, Velardi F. Craniostenosis. Analysis of 161 cases surgically treated during the first year of life. *Minerva Pediatr*. 1989;Aug41(8):393-404.

20. Panchal J, Uttchin V. Management of craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg.* 2003;May111(6):2032–2048.
21. Friede H, Alberius P, Lilja J, Lauritzen C. Trigenocephaly: Clinical and cephalometric assessment of craniofacial morphology in operated and nontreated patients. *Cleft Palate J.* 1990;Oct27(4):362-367.
22. Genitori L, Cavalheiro S, Lena G, Dollo C, Choux M. Skull base in trigonocephaly. *Pediatr Neurosurg.* 1991-1992;17(4):175-181.
23. Emmez H, Küçüködük I, Börcek AO, Kale A, Seçen E, Erbaş G, Yavuzer R, Baykaner MK. Effectiveness of skull models and surgical simulation: Comparison of outcome between different surgical techniques in patients with isolated brachycephaly. *Childs Nerv Syst.* 2009;Dec25(12):1605-1612.
24. Gorlin R.J, Cohen MMJr, Levin LS. *Syndromes of the head and the neck, III.* Baskı, Oxford University Press, New York. 1990.
25. Lajeuni E, Heuertz S, El Ggouzzi V, Martinovic J, Renier D, Le Merrer M, BonaventureJ. Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent FGFR2 mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome. *Eur J Hum. Genet.* 2006;Mar14(3):289-298.
26. Renier D, Lajeunie E, Arnaud E, Marchac D. Management of craniosynostoses. *Childs Nerv Syst.* 2000;Nov16(10-11):645-658.
27. Carinci F, Pezzetti F, Locci P, Becchetti E, Carls F, Avantaggiato A, Becchetti A, Carinci P, Baroni T, Bodo M. Apert and Crouzon Syndromes: Clinical Findings, Genes and Extracellular Matrix. *J Craniofac Surg.* 2005;May16(3):361-368.
28. Hoefkens M.F, Vermeij-Keers C, Vaandrager JM. Crouzon syndrome: phenotypic signs and symptoms of the postnatally expressed subtype. *J Craniofac Surg.* 2004;Mar15(2):233-240.
29. Sher S, Cole P, Kaufman Y, Hatef DA, Hollier L. Craniosynostotic variations in syndromic, identical twins. *Ann Plast Surg.* 2008;Sep61(3):290-293.

30. Vogels A, Fryns JP. Pfeiffer syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;Jun1;1:19.
31. Pfeiffer RA. Dominant hereditary acrocephalosyndactylia. *Z Kinderheilkd.* 1964;Sep16;90:301-320.
32. Cohen MM Jr. Sütürel biology and the correlates of craniosynostosis. *Am J Med Genet.* 1993;Oct1;47(5):581-616.
33. Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 2002;Jun15;16(12):1446-1465.
34. Tamburrini G, Caldarelli M, Massimi L, Santini P, Di Rocco C. Intracranial pressure monitoring in children with single sütüre and complex craniosynostosis: a review. *Childs Nerv Syst.* 2005;Oct21(10):913-921.
35. Bannink N, Joosten KF, van Veelen ML, Bartels MC, Tasker RC, van Adrichem LN, van der Meulen JJ, Vaandrager JM, de Jong TH, Mathijssen IM. Papilledema in patients with Apert, Crouzon, and Pfeiffer syndrome: prevalence, efficacy of treatment, and risk factors. *J Craniofac Surg.* 2008;Jan19(1):121-127.
36. Marucci DD, Dunaway DJ, Jones BM, Hayward RD. Raised intracranial pressure in Apert syndrome. *Plast Reconstr Surg.* 2008;Oct122(4):1162-1168.
37. Tuite GF, Chong WK, Evanson J, Narita A, Taylor D, Harkness WF, Jones BM, Hayward RD. The effectiveness of papilledema as an indicator of raised intracranial pressure in children with craniosynostosis. *Neurosurgery.* 1996;Feb38(2):272-278.
38. Raybaud C, Di Rocco C. Brain malformation in syndromic craniosynostoses, a primary disorder of white matter: a review. *Childs Nerv Syst.* 2007;Dec23(12):1379-1388.
39. Rawlins JT, Fernandez CR, Cozby ME, Opperman LA. Timing of Egf treatment differentially affects Tgf-beta2 induced cranial sütüre closure. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;Dec233(12):1518-1526.

40. Slater BJ, Kwan MD, Gupta DM, Amasha RR, Wan DC, Longaker MT. Dissecting the influence of regional dura mater on cranial suture biology. *Plast Reconstr Surg.* 2008;Jul122(1):77-84.
41. Ciurea AV, Toader C. Genetics of craniosynostosis: review of the literature. *J Med Life.* 2009;Jan-Mar2(1):5-17.
42. Grova M, Lo DD, Montoro D, Hyun JS, Chung MT, Wan DC, Longaker MT. Models of cranial suture biology. *J Craniofac Surg.* 2012;Nov23(7 Suppl 1):1954-1958.
43. Holmes G. The role of vertebrate models in understanding craniosynostosis. *Childs Nerv Syst.* 2012;Sep28(9):1471-1481.
44. Lattanzi W, Bukvic N, Barba M, Tamburrini G, Bernardini C, Michetti F, Di Rocco C. Genetic basis of single-suture synostoses: genes, chromosomes and clinical implications. *Childs Nerv Syst.* 2012;Sep28(9):1301-1310.
45. Levi B, Wan DC, Wong VW, Nelson E, Hyun J, Longaker MT. Cranial suture biology: from pathways to patient care. *J Craniofac Surg.* 2012;Jan23(1):13-19.
46. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor- β gene family members and bone. *Endocr Rev.* 1994;Feb15(1):27-39.
47. Roth DA, Longaker MT, McCarthy JG, Rosen DM, McMullen HF, Levine JP, Sung J, Gold LI. Studies in cranial suture biology. Part I: Increased immunoreactivity for TGF isoforms (β 1, β 2, β 3) during rat cranial suture fusion. *J Bone Miner Res.* 1997;Mar12(3):311- 321.
48. Cohen MM Jr. Transforming growth factor β s and fibroblast growth factors and their receptors: Role in suture biology and craniosynostosis. *J Bone Miner Res.* 1997;Mar12(3):322-331.
49. Burgess WH, and Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:575-606.
50. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2(3):reviews3005.

51. Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on FGF7, FGF10, FGF-22 orthologs and identification of FGF-25. *Int J Mol Med.* 2005;Oct16(4):767-770.
52. Reuss B, Bohlen HO, Halbach O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.*2003;Aug313(2):139-157.
53. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer.* 2000;7(3):165-197.
54. Karabagli H, Karabagli P, Ladher RK, Schoenwolf GC. Survey of fibroblast growth factor expression during chick organogenesis. *Anat Rec.* 2002;Sep1;268(1):1-6.
55. Moore R, Ferretti P, Copp A, Thorogood P. Blocking endogenous FGF-2 activity prevents cranial osteogenesis. *Dev Biol.* 2002;Mar1;243(1):99-114.
56. Mathijssen IM, van Leeuwen H, Vermeij-Keers C, Vaandrager JM. FGF-4 or FGF-2 administration induces apoptosis, collagen type I expression, and mineralization in the developing coronal suture. *J Craniofac Surg.* 2001;Jul12(4):399-400.
57. Mathijssen IM, van Leeuwen JP, Vermeij-Keers C. Simultaneous induction of apoptosis, collagen type I expression and mineralization in the developing coronal suture following FGF4 and FGF-2 application. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 2000;Jul-Sep20(3):127-136.
58. Kingyin Michael AL. Fgf And Tgfbeta Signalling In An In-Vitro Model Of Craniosynostosis. Developmental Biology Unit Institute of Child Health University College London. 2009.
59. Hanken J, Thorogood P. Evolution and development of the vertebrate skull: The role of pattern formation. *Trends Ecol Evol.* 1993;Jan8(1):9-15.
60. Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development.* 1993;Feb117(2):409-429.

61. Levine JP, Bradley JP, Roth DA, McCarthy JG, Longaker MT. Studies in cranial suture biology: regional dura mater determines overlying suture biology. *Plast Reconstr Surg*. 1998;May101(6):1441-1447.
62. Mehrara BJ, Most D, Chang J, Bresnick S, Turk A, Schendel SA, Gittes GK, Longaker MT. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1 expression in the developing dura mater correlates with calvarial bone formation. *Plast Reconstr Surg*. 1999;Aug104(2):435-444.
63. Opperman LA. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn*. 2000;Dec219(4):472-485.
64. Opperman LA, Sweeney TM, Redmon J, Persing JA, and Ogle RC. Tissue interactions with underlying dura mater inhibit osseous obliteration of developing cranial sutures. *Dev Dyn*. 1993;Dec198(4):312-322.
65. Yu K, Xu J, Liu Z, Sosic D, Shao J, Olson EN, Towler DA, Ornitz DM. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development*. 2003;Jul130(13):3063-3074.
66. Cohen MM Jr. Sutural biology and the correlates of craniosynostosis. *Am J Med Genet*. 1993;Oct1;47(5):581-616.
67. Reardon W, Winter RM, Rutland P, Pulleyn LJ, Jones BM, Malcolm S. Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet*. 1994;Sep8(1):98-103.
68. Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A, Pulleyn LJ, Rutland P, Reardon W, Malcolm S. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet*. 1994;Nov8(3):269-274.
69. Wilkie AO, Morriss-Kay GM, Jones EY, Heath JK. Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr Biol*. 1995;May1;5(5):500-507.
70. Iseki S, Wilkie AO, Heath JK, Ishimaru T, Eto K, Morriss-Kay GM. Fgfr2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF-2. *Development*. 1997;Sep124(17):3375-3384.

71. Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development*. 1999;Dec126(24):5611-5620.
72. Sarkar S, Petiot A, Copp A, Ferretti P, Thorogood P. FGF-2 promotes skeletogenic differentiation of cranial neural crest cells. *Development*. 2001;Jun128(11):2143-2152.
73. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo.1951. *Dev Dyn*. 1992;195(4):231-272.
74. Moss ML, Growth of the calvaria in the rat;the determination of osseous morphology. *Am J Anat*. 1954;May94(3):333-361.
75. Furtwangler JA, Hall SH, Koskinen-Moffet LK. Sutural morphogenesis in the mouse calvaria: The role of apoptosis. *Acta Anat (Basel)*. 1985;124(1-2):74-80.
76. Levine JP, Bradley JP, Roth DA, McCarthy JG, Longaker MT. Studies in cranial suture biology: Regional dura mater determines overlying suture biology. *Plast Reconstr Surg*. 1998;May101(6):1441-1447.
77. Opperman LA, Passarelli RW, Morgan EP, Reintjes M, Ogle RC. Cranial sutures require tissue interactions with dura mater to resist osseous obliteration in vitro. *J Bone Miner Res*. 1995;Dec10(12):1978-1987.
78. Beck LS, Amento EP, Xu Y, Lee WP, Nguyen T, Gillett NA. TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1. *J Bone Miner Res*. 1993;Jun8(6):753-761.
79. Ueno K, Haba T, Woodbury D, Price P, Anderson R, Jee WSS. The effects of prostaglandin E2 in rapidly growing rats: Depressed longitudinal and radial growth and increased metaphyseal hard tissue mass. *Bone*. 1985;6(2):79-86.
80. Mehrara BJ, Mackool RJ, McCarthy JG, Gittes GK, Longaker MT. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 and receptor-2 in rat cranial sutures. *Plast Reconstr Surg*. 1998;Nov102(6):1805-1817.

81. Carlton MB, Colledge WH, Evans MJ. Crouzon-like craniofacial dysmorphology in the mouse is caused by an insertional mutation at the Fgf3/Fgf4 locus. *Dev Dyn*. 1998;Jun212(2):242-249.
82. Passos-Bueno MR, Serti Eacute AE, Jehee FS, Fanganiello R, Yeh E. Genetics of craniosynostosis: genes, syndromes, mutations and genotype-phenotype correlations. *Front Oral Biol*. 2008;12:107-143.
83. Moursi AM, Winnard PL, Winnard AV, Rubenstrunk JM, Mooney MP. Fibroblast growth factor 2 induces increased calvarial osteoblast proliferation and cranial suture fusion. *Cleft Palate Craniofac J*. 2002;Sep39(5):487-496.
84. Shen K, Krakora SM, Cunningham M, Singh M, Wang X, Hu FZ, Post JC, Ehrlich GD. Medical treatment of craniosynostosis: recombinant Noggin inhibits coronal suture closure in the rat craniosynostosis model. *Orthod Craniofac Res*. 2009;Aug12(3):254-262.
85. Greenwald JA, Mehrara BJ, Spector JA, Warren SM, Crisera FE, Fagenholz PJ, Bouletreau PJ, Longaker MT. Regional differentiation of cranial suture-associated dura mater in vivo and in vitro: implications for suture fusion and patency. *J Bone Miner Re*. 2000;Dec15(12):2413-2430.
86. Britto JA, Chan JC, Evans RD, Hayward RD, Thorogood P, Jones BM. Fibroblast growth factor receptors are expressed in craniosynostotic sutures. *Plast Reconstr Surg*. 1998;Feb101(2):540-543.
87. Alaqeel SM, Hinton RJ, Opperman LA. Cellular response to force application at craniofacial sutures. *Orthod Craniofac Res*. 2006;Aug9(3):111-122.
88. Agresti M, Gosain AK. Detection of apoptosis in fusing versus nonfusing mouse cranial sutures. *J Craniofac Surg*. 2005;Jul16(4):572-578.
89. Fromigue O, Modrowski D, Marie PJ. Apoptosis in membranous bone formation: role of fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein signaling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2005;15(1):75-92.

90. Cui H, Lee JH, Kim JY, Koo BN, Lee JE. The neuroprotective effect of agmatine after focal cerebral ischemia in diabetic rats. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2012;Jan24(1):39-50.