

# Pre ve Postnatal Dönemlerin Farklı Evrelerinde Olan Ratlarda (*Rattus Norvegicus*) Epifiz Kıkırdağının Gelişimi ve Enzimatik Aktivitesi Üzerine Bir Çalışma\*

A STUDY ON DEVELOPMENT OF EPIPHYSEAL CARTILAGE AND ITS ENZYMATIC ACTIVITIES IN RATS (*RATTUS NORVEGICUS*) AT VARIOUS STAGES OF PRE AND POSTNATAL PERIODS

Dr.İsmail ÜSTÜNEL, Prof.Dr.Ramazan DEMİR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi I Histoloji-Embriyoloji BD, ANTALYA

## ÖZET

Bu çalışmada, prenatal dönemin 15, 17,19, 20 ve postnatal dönemin 1, 10, 20, 30, 40, 60. günlerinde olan ratlarda epifiz kıkırdağının gelişimi ve enzimatik aktivitesi (alkalin fosfataz, asit fosfataz, ATP az ve 5'Nükleotidaz) ışık mikroskopu düzeyinde araştırıldı. Embriyonal dönemde, ilk ekstremit-ekondral modellerinin 15. günden önce oluştuğu, 15. günden itibaren epifiz kıkırdağında enzimatik aktivitenin, 17. günden itibaren de perikondral alanlarda ossifikasyonun oluştuğu belirlendi. Postnatal dönemde, 10. günden itibaren sekonder ossifikasyon merkezinin oluştuğu gözlemlendi. Alkalin fosfataz, ATP az ve 5'-Nükleotidaz enzimleri, osteoblastların siloplazmasında ve periosteum matriksinde çok kuvvetli aktiviteye sahipti. Asit fosfataz ise kondroklast ve osteoklastlar içinde kuvvetli aktivite gösterdi. Çalışılan enzimlerin epifiz kıkırdağındaki aktiviteleri, gelişme yaşına bağlı olarak artış gösterdiler.

**Anahtar Kelimeler:** Enzimler, Epifiz kıkırdağı, Artikular kıkırdak, Ossifikasyon.

T Klin Araştırma 1991, 9:233-240

Geliş Tarihi: 23.2.1989

Kabul Tarihi: 15.10.1989

Yazışma Adresi: Dr.İsmail ÜSTÜNEL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi I Histoloji-Embriyoloji BD, ANTALYA

\*Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiş yüksek lisans tezi özettir.

## SUMMARY

In this study, the development of epiphyseal cartilage and its some enzymatic activities (alkaline phosphatase, acid phosphatase, ATPase, 5'Nucleotidase) were studied in the rats embryos ranging from day 15 post copulation (p.c) until day 20 p.c and in the offsprings aged 1, 10, 20, 30, 40 and 60 days of postnatal period with light microscope.

During embryonic period, it was determined that cartilagenous models of extremities developed prior to day 15 th p.c, the enzymatic activities in epiphyseal cartilage begins after than this embryonic age and by the day 17 p.c. the condral ossification occurred in perikondral areas. It was observed that the secondary ossification centers occurred by day 10 during the postnatal period.

Alkaline phosphatase, ATPase and 5'-Nucleotidase enzymes had very high activities in the cytoplasm of osteoblasts and in the periosteal matrix but acid phosphatase showed a strong activity in chondroclasts and osteoclasts.

The activities of all enzymes showed in increasing according to the developmental age.

**KeyWords:** Enzymes, Epiphyseal cartilage, Articular cartilage, Ossification.

Turk J Resc Med Sci 1991, 9:233-240

Embriyonal hayatın belli evrelerinde oluşmaya başlayan kemik dokusunun gelişimi sürecinde birçok metabolik olaylar zinciri vardır. Ossifikasyonun gerçekleşebilmesi için bir seri hidrolitik ve katalizan enzim devreye girer (11,14,16,26,34,38). Daha önce yapılan çalışmalarda, kemiğin büyüyen kısımlarında, yeterli miktarda

alkalin fosfataz, asit fosfataz, \*ATPaz ve 5'-Nükleotidaz enzimlerinin bulunduğu ve bu enzimlerin yaşla birlikte değişik aktiviteler gösterdiği bildirilmiştir (13,16,24,30,32,35).

Epifiz kıkırdağında farklı yöntemlerle saptanabilen enzim türleri üzerinde daha önce yapılmış birçok araştırma vardır (15,20,36,37). Ancak, sözü edilen bu enzimlerin prenatal dönemden başlayarak erginlik evreye kadar olan dönemlerde ilk olarak hangi dönemlerde ortaya çıktığı, epifiz kıkırdağı zonlarının enzimatik aktiviteye göre ne gibi değişiklikler gösterdiği kapsamlı olarak açıklığa kavuşturulmamıştır.

Bu çalışmanın amacı; prenatal dönemin son evrelerinden itibaren doğumdan sonra erginlik çağına kadarki değişik yaş gruplarında olan ratların, epifiz kıkırdağının histolojik gelişimi ve buna bağlı olarak enzimatik aktiviteyi zonlarına göre belirlemeyi amaçlamaktadır.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada prenatal dönemde 15,17,19,20. günlerde 6'şar adet olmak üzere 24 fetüs, postnatal dönemde 1, 10, 20, 30, 40 ve 60. günlerde olmak üzere toplam 36 adet erkek yavru rat kullanıldı. Fetüslerin her biri ayrı anaçtan alındı.

Deney sırasında kullanılan hamile ve yavru ratlar dekapitasyonla öldürüldüler. Deneklerin ekstremitelerinden alınan epifiz örneklerinin bir kısmı, fikse edilmeden dondurma mikrotomuyla kesilmek üzere derin dondurucuya alınırken bir kısmı da, parafin kesitleri için aseton takibine alındı. Prenatal ve postnatal dönemin 1 günlük grupları hariç, diğer grupların dokularına %14'lük nötral EDTA (Ethylenediamine-tetra acetik acid) solüsyonu ile dekalsifikasyon işlemi uygulandı (+ 4°C'de 6 gün).

10 mikrometre kalınlıktaki dondurma ve parafin kesitlerine aşağıdaki boya metodları uygulandı. Hematoksilin-Eozin, Alsiyan mavisi-Hematoksilin, PAS-Alsiyan mavisi-Hematoksilin, Alkalın fosfataz (Gomori'nin kalsiyum metodu, 1952), Asit fosfataz (Gomori'nin kurşun metodu, 1950), ATPaz (Wachstein ve Meisel'in kurşun metodu, 1960), 5'-Nükleotidaz (Wachstein ve Meisel'in kurşun metodu, 1957) (3,18,31).

Elde edilen enzim aktiviteli kesitlerin kontrolü; substrat içermeyen inkübasyon solüsyonlarında aynı süre ile bekletilmiş, aynı yaş grubuna ait epifiz kıkırdağı kesitleri ile yapıldı. Epifiz kıkırdağında subgruplama değişik yazarlara göre (4,7,19,23,27,34,39) Tablo 1'deki gibi yapıldı.

Preparatlar optiphot tipi Nikon ışık mikroskopu ile değerlendirildi. Fotoğraflandırma esnasında büyüme katsayısı; objektif x oküler x agrandizör kombinasyonuna göre hesaplandı.

## BULGULAR

### Histolojik Bulgular

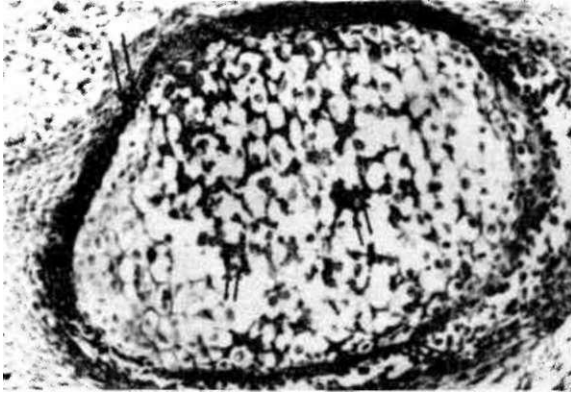
15 günlük fetüslerde ekstremite modelini oluşturan embriyonal kıkırdakta, en-perikondral alanlarda, herhangi bir ossifikasyon belirtisine rastlanılmadı (Şekil 1). 17 günlük fetüslerde kıkırdaktan oluşmuş uzun kemik modellerinin eklem bölgesi ve aralığı belirginleşmişti. Bu grupta perikondral ve en-kondral ossifikasyonun oluşmaya başladığı alanlarda hücre hipertrofisi belirgin olarak artmıştı (Şekil 2). 19 günlük fetüslerde sekonder ossifikasyon merkezi hariç diğer tüm bölgeler belirgindi. Bu gebelik döneminden itibaren peri-enkondral ossifikasyon alanları ve bu yöndeki farklılaşma ürünü olan kemik trabekülleri belirgin olarak izleniyordu (Şekil 4). Doğum sonrası 10. güne kadar gözlenmeyen sekonder ossifikasyon merkezinin 10. günden itibaren giderek artan bir alan içinde geliştiği, büyüme plağı kalınlığının yaşla birlikte azaldığı gözlemlendi (Şekil 5).

### Enzimatik Aktivite

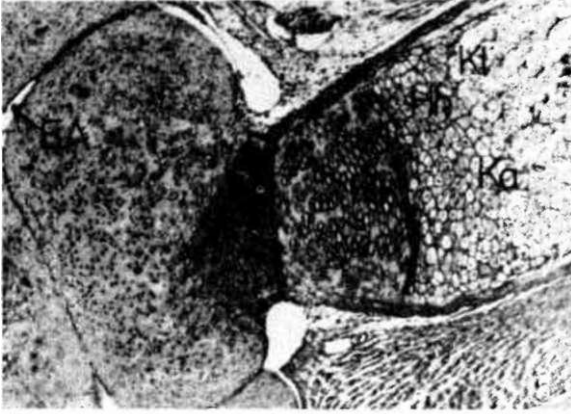
Bütün deney gruplarında enzim aktivitesi şiddeti, kemiğin büyüme yönüne uygun olarak metafizden epifize doğru giderek artıyordu. Çalışılan enzim çeşitlerine ait aktiviteler Tablo Pde görüldüğü gibi belirlendi.

Alkalın fosfataz aktivitesi, 15 günlük fetüslerde belirgin olarak gözlemlendi. Perikondral alanlarda çok kuvvetli pozitif, kıkırdak modelin ilk hipertrofik hücreleri içeren orta kısımlarında zayıf pozitif (Şekil 6). 17 günlük fetüslerde perikondral ossifikasyon bölgelerinde çok kuvvetli pozitif, en-kondral hipertrofik hücreler içerisinde zayıf ile kuvvetli pozitif arasında değişen aktivitelerde belirlendi. 19 ve 20 günlük fetüsler ile postnatal dönemin tüm gruplarında artikular kıkırdağın tangential, transiyonal, radyal zonları ile epifiz plağı çoğalma zonu ve hücre kolonları proksimal hücrelerinde çok az aktifti (Tablo 1). Hücre kolonlarının merkez hücrelerinde pozitif ile kuvvetli pozitif arasında, artikular kıkırdağın epifizyal zonunda, sekonder ossifikasyon merkezinde, epifiz plağının hücre kolonları zonunun distal hücrelerinde, hipertrofik zon hücrelerinde, kalsifikasyon zonu hücreleri ile kondrolizis zonunda zayıf pozitif ile çok kuvvetli

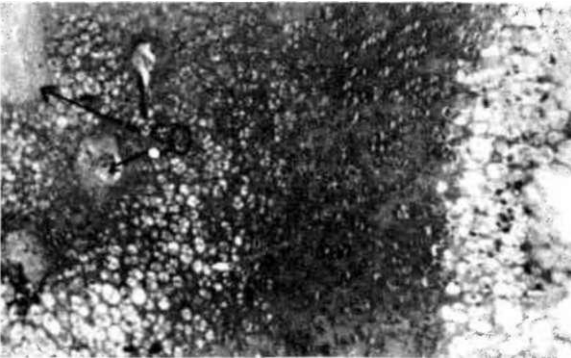




Şekil 3: Perikondral ve endokondral ossifikasyon alanlarında (çift oklarla) alkalın fosfataz aktivitesi görülmektedir. 17 günlük fetüs, alkalın fosfataz, dondurma kesiti, x400.



Şekil 4: Epifiz kıkırdağında sekonder ossifikasyon merkezi hariç diğer tüm bölgelerin görünümü. 19 günlük fetüs. PAS + Alsiyan mavisi + Hematoksilen. x160. HK = Hücre kolonları, IH = Hipertrofik hücreler, Ka = Kalsifiye hücreler, KI = Kondrolizis sonu, EA = Eklem aralığı



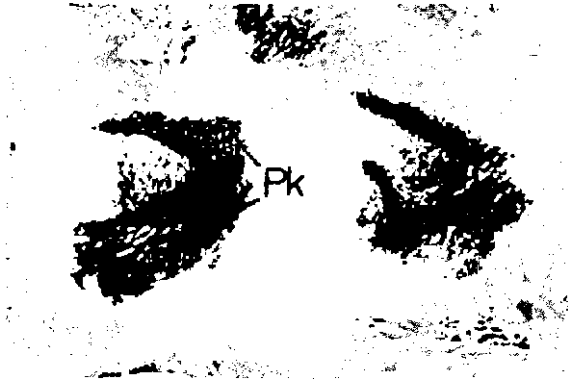
Şekil 5: Epifiz kıkırdağında sekonder ossifikasyon (SO) merkezinin oluşumu görülmektedir. 10 günlük avru, PAS + Alsiyan mavisi + Hematoksilen, x160.

icoblastlar ve periostcum içinde alkalın fosfataz aktivitesi çok fazlaydı (Şekil 3,7). 15 günlük prenatal dönemden postnatal dönemin 20. gününde olan deneklerde, alkalın fosfataz aktivitesi giderek bir artış gösterdi. Genelde ossifikasyon bölgelerinde bu enzim çokyoğundu.

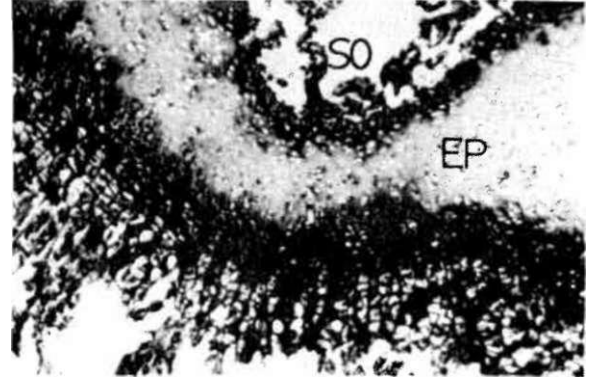
Asit fosfataz, 15 günlük fetüslerde bu enzimin aktivitesi gözlenmedi. 17 günlük fetüslerde kondrositler içerisinde zayıf pozitif, aynı zonun matriksinde ve periostcumda kuvvetli pozitif, Diğer tüm gruplarda asil fosfataz aktivitesi tangentiyal zon, transisyonal zon, epifizyal zon hücreleri ve kalsifikasyon zonu hücrelerinde zayıf pozitif ile kuvvetli pozitif arasında aktiviteye sahiptir. 20 günlük fetüsler ile postnatal dönemin tüm gruplarının radyal zon hücrelerinde pozitiften çok kuvvetli pozitif aktiviteye kadar değişiyordu (Tablo 1).

Epifiz kıkırdağı çoğalma zonu hücrelerinde genelde çok zayıf aktivite vardı. Hücre kolonları zonu bütün hücrelerinde, postnatal dönemin 10. gününe kadar çok zayıf aktivite olmasına karşın 20. günden itibaren kuvvetli pozitif ile çok kuvvetli pozitif arasında aktiviteye sahipti. Hipertrofik zonda, yaşla birlikte aktivitenin arttığı ve 60 günlüklerde doruk noktasına ulaştığı gözlemlendi. Tablo 1'de görüldüğü üzere asit fosfataz enziminin daha çok artikular kıkırdağı radyal zon, hücre kolonları zonunun tüm hücreleri, kondrolizis zonu ve sekonder ossifikasyon merkezinde yoğun olduğu gözlemlendi. Hipertrofik zonda ise kısmen pozitif (Şekil 8,9).

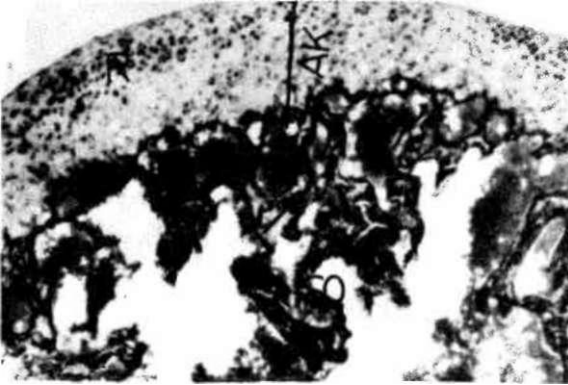
ATPaz, 15 günlük fetüslerde kıkırdağ dokusu içerisinde endokondral ossifikasyonun gerçekleşeceği alanlarda hücreler arası çok zayıf, perikondral alanlarda ise kuvvetli pozitif. 17 günlük fetüslerde perikondrium, hipertrofik hücreler ve interterritoriyal alanlarda kuvvetli pozitif, diğer alanlarda negatif. 19 günlük fetüslerde hücre kolonları zonunda proksimalden distale doğru yaklaştıkça negatiften kuvvetli pozitive doğru bir artış gözlemlendi. Kondrolizis zonunda zayıf pozitif, hipertrofik zonda ise kuvvetli pozitif aktivite vardı. Prenatal dönemde 20 günlük fetüs, postnatal dönemde 1,10,20,30,40 ve 60 günlük yavru ratlarda tangentiyal zon, sekonder ossifikasyon merkezi, hücre kolonları distal hücreleri ve hipertrofik zon hücrelerinde aktivite pozitiften çok kuvvetli pozitive doğru artış gösterdi. Radyal zon ve çoğalma zonunda ise negatif ile pozitif arasında değişen aktivite vardı. Transisyonal zonda ise aktivite düşüktü. Aynı yaşlarda ATPaz aktivitesi, epifizyal zonda kuvvetli pozitif, kondrolizis



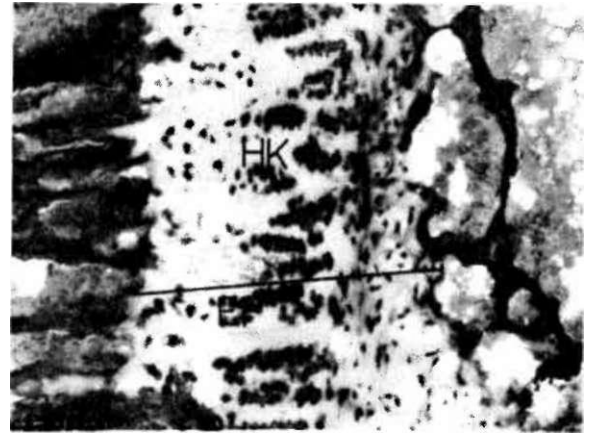
Şekil 6: Perikondral (Pk) alanda çok kuvvetli alkalın fosfata/ aklivitesi. 15 günlük fetüs. Alkalın fosfata? + Alsiyan mavisi. x160.



Şekil 7: Lipilz plağı (L:1) hipertrofik hücre zonu (Ih) matriksinde ve kalsifikasyon zonunda (Ka) çok kuvvelli alkalın fosfataz aklivitesi gözleniyor. 20 günlük yavru, dondurma kesiti. Alkalın fosfata/. \IML.



Şekil 8: Artikular kıkırdağın radyal zonu (R) hücrelerimle ve sekunder ossifikasyon merkezindeki (OS) çok yoğun asil fosfataz aklivitesi. 60 günlük yavru, Asit fosfataz + Bozin, dondurma kesiti, x160.



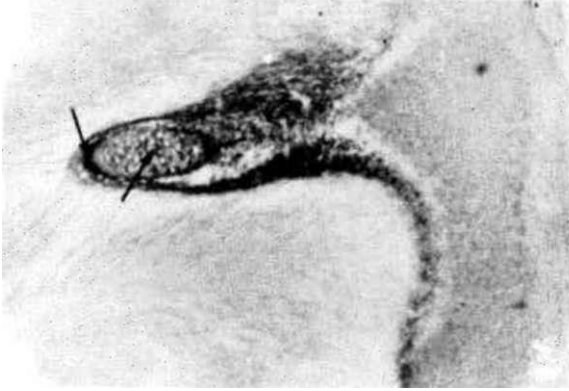
Şekil 9: Lipilz plağı hücre kolonları zonu (HK) ve kondrolizis zonundaki (KI) yoğun asit fosfataz aklivitesi gözlenmektedir. 20 günlük yavru. Asit fosfataz + Eozin, dondurma kesiti. x400.

zonunda ise zayıf pozitif ile kuvvetli pozitif arasında görülüyordu. Hücre kolonları proksimal ve merkez hücrelerinde negatif ile kuvvetli pozitif arasında değişiyordu. Sözü edilen gruplarda ATPaz, hipertrofik zon ve kalsifikasyon zonu malriksinde ve metafiz osteoblastları içinde kuvvetli pozitif. Genel olarak bu enzimin aktivitesinde de yaşla birlikte bir artış görüldü (Tablo 1).

### 5'-Nükleotidaz

15 günlük fetüslerde bu enzimin aklivitesi gözlenemedi. 17 günlük fetüslerde, kondrositlerde ve periosteum içinde şüpheli pozitif ile kuvvetli pozitif arasındaydı. Bazı kesitlerde kıkırdağın modeli çevresinde ve ossifikasyon başlangıcı olan perikondral alanlarda intersellular olarak pozitif reaksiyon vardı (Şekil 10). Diğer tüm gruplarda langeniyal zonda, pozitiften çok kuvvetliye doğru yaşla

birlikte bir artış gösterdi. Transisyonel zonda da yoğun aktivite olmasına rağmen iangentiyal zona göre biraz düşüktü. Doğumdan sonra 10. günden başlayarak değerlendirmeye alınan sekonder ossifikasyon merkezinde, hücre kolonları zonu distal hücreleri ve hipertrofik zonda, bütün gruplarda yaşla birlikte, aktivite de arttı. 19 günlük fetüslerde ve postnatal dönemin 10. gününde radyal zonda zayıf pozitif, 20 günlük fetüste ve postnatal dönemin 1. gününde negatif, postnatal dönemin diğer gruplarında pozitif ve kuvvetli pozitif arasında değişen aktivite vardı. Epifizyal zonda ise aktivite pozitif ile çok kuvvetli pozitif arasında değişen aktivite idi (Tablo 1). Prenatal 20. gün, postnatal dönemin 1, 10, 40 ve 60. günlerinde çoğalma zonun-



Şekil 10: Enkondral ve perikondral doku alanlarında 5'-Nükleotidaz aktivitesi (tek oklarla) görülmektedir. 17 günlük fetüs, 5'-Nükleotidaz + Alsiyan mavisi. x160.

da az aktivite gözlenmesine karşın 20 ve 30. günlerinde daha fazla enzimatik reaksiyon vardı.

Hücre kolonları zonu proksimal hücrelerinde postnatal dönemin 20 ve 30. günleri hariç, diğer gruplarda aktivite çok azdı. Hücre kolonları zonu merkez hücrelerinden hipertrofik zona doğru olan bir aktivite artışı belirlendi. Kalsifikasyon zonunda ise çok azaktivitedeydi (Tablo 1).

## TARTIŞMA

Pre ve postnatal dönemde büyümenin odak noktası olarak kabul edilen uzun kemik epifiz kıkırdağı bölgesindeki enzim içeriği çalışmaları oldukça eskidir (5,8,33) ve bu çalışmalar günümüzde de detaylı olarak devam etmektedir (1,10,21,25). Yapılan araştırmalarla bu enzimlerin enerji metabolizması, mineralizasyon, fosfor-kalsiyum metabolizması ve ossifikasyon ile ilgili oldukları belirlenmiştir (2,5,12,14,16,26,35,38).

Elimizdeki kaynaklara göre en çok çalışılan ve tartışılan enzimler fosfatazlar grubudur. Bunlardan alkalın fosfatazın genellikle hücre içi sindirimi ve sekresyonda, intestinal ve böbrekte olduğu gibi plazma membranı transporunda etken olduğu (29), enerji sağlama ve mineralizasyonda dolayısıyla ossifikasyonda rol aldığını belirten araştırmalar vardır (2,11,13,16,17,38). Bazı yazarlar (24), alkalın fosfataz aktivitesi ile diğer biyokimyasal değişiklikler arasında bir ilişkinin olduğunu, gelişmeye paralel olarak alkalın fosfataz aktivitesinde bir düşmenin görüldüğünü belirtmektedirler. Alkalın fosfataz daha önceki verilere göre değişik zon hücrelerinde ve matriks veziküllerinde değişik aktivitede bulunmaktadır (16,35). Özellikle hücrelerin

membranlarında yerleşiktir. Ayrıca gece saatlerinde aktivitesinde %20'lik bir artış olmaktadır (36).

Bu çalışmanın sonuçları alkalın fosfatazın özellikle hücre kolonları zonu distal bölgesi, hipertrofik ve kalsifikasyon zonları hücreleri ve matriksleri, melaliz bölgesinde perikondral ossifikasyon alanları içerisinde çok yoğun olduğunu gösterdi. Buna karşılık artikular kıkırdağı içerisinde, epifizyal zon hariç, çok az aktifti. 15 günlük prenatal devreden postnatal devrenin 20. gününe kadar alkalın fosfataz enzimi aktivitesinde giderek bir artış gözlemlendi. 20. günden sonra 30 ve 40. günlerde enzim aktivitesinde düşme görülmekle beraber 60 günlük hayvanlarda çok fazla aktivitedeydi. Ossifikasyon bölgelerinde alkalın fosfatazın yoğun olduğunu belirleyen bu sonuçlarımız, bu enzimin ossifikasyonda rol aldığı görüşünü (12,16,17,35) desteklemektedir.

Lizozomlarda yerleşik ve malriksin yıkımını sağlayarak ossifikasyona ortam hazırladığı belirtilen asil fosfataz enzimi (16,24), epifiz kıkırdağında değişik aktivitede gözlenmiştir (5,6,35). Asit fosfatazın osteoklastlarda ve kemik iliği retikulum hücrelerinde bol bulunduğu, aktivitenin yaşa bağlı olarak arttığı, kemik rezorpsiyonunun ileri olduğu laktasyonda ve parathormon tarafından indüklenen patolojik kemik rezorpsiyon vakalarında, osteoklastların sayısına paralel olarak aktivitesinin de arttığı değişik kaynaklarda bildirilmiştir (8,9,17,24). Akisaka (2), asit fosfatazın epifiz kıkırdağı fosfat metabolizmasında anahtar rol oynadığı ve özellikle matrikste lokalize olduğunu vurguladı.

Bu çalışmanın verileri, asit fosfataz enziminin daha çok artikular kıkırdağı radyal zonunda, hücre kolonları zonu merkez ve distal hücrelerinde ve kondrolizis zonunda lokalize olduğunu göstermiştir. Gelişme periyodlarına paralel olarak kondrolizis zonu matriksinde özellikle yoğun olduğu, hücre differensiyasyonuna paralel olarak değişiklikler gösterdiği ve matriksin yıkımında görev aldığı sonucuna varılabilir.

Mitokondri, hücre membranında bulunan ve enerji değişimlerinde görev aldığı belirtilen ATPaz enzimi, kemik formasyonunda çok büyük rol oynar ve kemikle nükleotidlerin parçalanmasından sorumlu enzim mekanizmalarını oluşturur (14,16,35).

ATPaz'ın farklı dokularda, değişik aktivitede gözlenmesi doğal bir bulgu olarak belirtildikten sonra bu enzimin, epifiz kıkırdağının hipertrofik zonunda (13), eklem kıkırdağında (9), açılma zonunda (5) aktif olduğu bildirilmiştir.

Gössner ve Schwabe (17) ATPaz'ın ostcoblarda Silbermann ve Frommer (35) epifiz kıkırdağının proliferatif, hipertrofik zonları ile diğer zonlarda dağılmış kondrosillerin içinde çok aktif olduğunu gözlemlediler. Fischer (16), doğum sonrası gelişme devresindeki ratlarda yaptığı çalışmada ATPaz enziminin kıkırdak hücre kolonlarının distaline doğru aktivitesinin arttığını, hipertrofik hücreler ve geçiş zonu hücrelerinde en yüksek ativitede olduğunu belirtti. Kincaid (22) ve Akisaka (2) yapmış oldukları çalışmalarda, bu enzimin artikular kıkırdağın tangentiyal zonunda ve kıkırdak matriksinde lokalize olduğunu belirttiler.

Bu çalışmanın bulguları, ATPaz'ın bütün yaş gruplarında artikular kıkırdağın tangentiyal zonunda, hücre kolonları distal hücrelerinde ve hipertrofik zon hücrelerinde değişen derecelerde pozitif olduğunu göstermiştir. Sonuçlarımız bu konuda daha önce yayımlanmış sonuçları desteklemektedir. Bu veriler ATPaz enziminin ilgili zonlarında enerji değişimlerinde rol aldığı görüşünü doğrulamaktadır.

5'-Nükleotidaz enzimi, nükleotid metabolizmasını ve plazma membranında mikrosirkülasyonu regüle eden (28,29), hücre metabolizmasının enerji değişimlerinde rol oynayan (16) bir enzim olarak tarif edildi. Yine daha önce yapılmış çalışmalarda bu enzimin artikular kıkırdak tangentiyal zonunda (30), epifiz. plağı kıkırdak sütunlarında (5,6) kalsifikasyon zonunda (14) ve ostcoblarda yoğun olduğu belirtilmiştir. Fischer (16) ratlarda yaptığı çalışmada; bu enzimin hücre kolonları hipertrofik hücreler ve açılma zonunda yoğun olduğunu bildirmiştir.

Bulgularımız, 5'-Nükleotidaz enziminin artikular kıkırdağı tangentiyal zonunda yaşla birlikte, pozitiften kuvvetli pozitive doğru, değişen bir aktivite gösterdiği ve bu konuda önceki bulguları (30) teyit ettiğini gösterdi. Epifiz kıkırdağı hücre kolonları distal hücrelerinde, hipertrofik zonda ve perikondral alanda yoğun aktivitenin varlığını belirleyen gözlemlerimiz Fischer'in (16) bulgularını doğrulamaktadır. Kalsifikasyon zonunda çok az aktivitenin gözlenmesi de Gössner ve Schwabe'nin (17) sonuçları ile ters düşmektedir.

## SONUÇLAR

a. Hyalin kıkırdaktan oluşmuş ilk ekstremité modellerinin prenatal dönemin 15. gününden önce oluştuğu ve eklem bölgelerinin belirgin olarak 15. günden itibaren ortaya çıktığı,

b. Kıkırdak modelde primer encondral ve perikondral ossifikasyon başlangıçlarının 17. günden itibaren belirdiği,

c. Sekonder ossifikasyon merkezinin postnatal dönemde 10. günden itibaren ortaya çıktığı,

d. Büyüme plağının 60 gün süreyle varlığını koruduğu ancak postnatal dönemde giderek incelendiği,

e. Alkalın fosfataz ve ATP az enzimlerinin 15 günlük fetüslerde gözlenmesine karşılık, asit fosfataz ve 5'-Nükleotidaz enzimlerinin henüz gözlenmediği,

f. Enzim aktivitesi şiddetinin kemiğin büyüme yönüne uygun olarak genellikle ossifikasyon bölgelerinde yoğun olduğu,

g. Alkalın fosfataz enziminin tüm gruplarda, artikular kıkırdağın epifizyal zonu hariç, tüm zonlarında çok az yoğunlukta olduğu, buna karşılık ossifikasyonla direkt ilgili epifiz plağının hücre kolonları zonu distal hücreleri ve hipertrofik zonda çok daha fazla yoğunlukta olduğu,

h. Asil fosfataz enzimi yoğunluğunun gelişim yaşına paralel olarak giderek arttığı ve 60 günlük deneklerde en yüksek aktiviteye ulaştığı, artikular kıkırdak radyal zonu hücreleri, sekonder ossifikasyon merkezi, epifiz plağı hücre kolonları zonunun tüm hücrelerinde ve kondrolizis zonu matriksinde yoğun aktivitede olduğu,

i. ATPaz. enziminin postnatal dönemde, 40 ve 60 günlük gruplarda, artikular kıkırdak tangentiyal zonunda çok kuvvetli aktivitede olduğu, ayrıca sekonder ossifikasyon merkezi, hücre kolonları distal hücreleri ve hipertrofik zon hücrelerinde yoğun aktivitegösterdiği,

j. 5'-Nükleotidaz enziminin artikular kıkırdağı tangentiyal zonunda, diğer enzimlere göre daha aktif olduğu, yine diğer enzimler gibi bu enzimin de sekonder ossifikasyon merkezi, hücre kolonları distali ve hipertrofik zonda çok kuvvetli reaksiyon verdiği bu çalışmanın verileriyle belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Akisaka T, CV Gay: Ultrastructural localization of calcium activated adenosine triphosphatase (Ca<sup>++</sup> + ATPase) in growth-plate cartilage, .1 of Histochem and Cytochem 1985, 33(9):925-32.
2. Akisaka T and CV Gay: Ultrastructural demonstration of g-Nitrophenyl phosphatase (p-NPPase) activity in the epiphyseal growth plate. Acta Histochem Cytochem 1986, 19:21-29.

3. Bancroft JD, A Stevens, MATMP Dawson: Theory and Particle of Histological Techniques, Churchill Livingstone, Edinburg, London and New York 1977, pp 230, 290-6.
4. Bloom W and DW Fawcett: A Textbook of Histology, Tenth edition, WB Saunders Company 1975, pp 244-85.
5. Bona C, M Pitis, V Stanesco et V Ionesco: Etudes histochemiques et enzymologiques sur le cartilage de croissance, Acta Histochem 1964,18:295-316.
6. Bona C, V Stanesco, M Dumitrescu, G Ghyka and V Ionesco: Histochemical studies on the growing human tibial cartilage, Acta Histochem 1965, 21:98-119.
7. Brighton CT, T Kitajima and RM Hunt: Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes, Arthritis Rheum 1984, 27(11): 1290-9.
8. Cabrini RL: Histochemistry of ossification. Int Rev Cyto! 1961,11:283-306.
9. Cipra JD and JS Willmer: Composition of epiphyseal cartilage. III. Differences in enzymatic activities of epiphyseal and articular cartilages of rachitic chick, Can J Biochem Physiology 1962,40:419-23.
10. Classen-Linke I, HW Denker and E Winterhager: Apical plasma membrane bound enzymes of rabbit uterine epithelium. Pattern changes during the periimplantation phase, Histochemistry 1987, 87:517-29.
11. Delbrück A: Enzyme activity determinations in bone and cartilage. Enzym Biol Clin 1970. 11:130-53.
12. Dixit PK: Quantitative histochemistry of cartilage alkaline phosphatase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in different zones of rachitic rat cartilage during healing, Calc Tiss Res 1972, 10:49-57.
13. Dulce H-J: Enzymaktivitäten im hyalinen Knorpel im verknöcherten Knorpel und im Knochen, Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1960,319:272-8.
14. Dulce H-J: Biochemie des Knochens; in Diehlhelm, Olsson, Strnad Vicen und Zuppinger, Handbuch der Medizinischen Radiologie, Springer, Berlin 1970. Vol IV/1. pp 12-105.
15. Fischer G: Untersuchungen zur qualitativen Verteilung von Enzymen kohlenhydratstoffwechsels in der humerusepiphyse von ratten bestimmter Altersgruppen. Acta Anat 1973, 84:19-30.
16. Fischer G: Die Verteilung und Aktivität von Enzymen in der humerusepiphyse von albinoratten bestimmten Alters. Acta Anat 1980,106:150-7.
17. Gössner W und M Schwabe: Enzymhistochemie des Knochen Gewebes. Z Orthop 1971, 109:212-30.
18. Gur-E: Biological Staining Methods, Eighth edition. Searle Diagnostic Gurr Products, England 1973, pp 17.52-53.
19. Jungueira LC and J Carneiro: Basic Histology, 4th edition. Los Altos, California 1983, pp 148-61.
20. Kanabe S, HUT Hsu, RNA Cecil and HC Anderson: Electron microscopic localization of adenosine triphosphate (ATP)-hydrolyzing activity in isolated matrix vesicles and reconstituted vesicles from calf cartilage, J of Histochem and Cytochem 1983,31(4):462-70.
21. Katsura N and K Yamada: Isolation and characterization of a metalloprotease associated with chicken epiphyseal cartilage matrix vesicles, Bone 1986, 7:137-43.
22. Kincaid SA; DC Van Sickle: Effect of exercise on the histochemical changes of articular chondrocytes in adult dogs. Am J Vet Res 1981, Vol. 43 No.7: 1218-26.
23. Knese K-II: Cytologische betrachtungen an skeletzellen über die bildung der kohlenhydrat-protein-komplex, Z Mikrosk Anat Forsch 1969,81:233-94.
24. Kufnace MM and SA Miller: Activities during growth of long bones and mandibles. Calc Tiss Res 1972, 9:173-178.
25. Lidor C and S Edelman: Calcitriol increases Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, Biochem and Biophysical Res Comm 1987 144(2):713-7.
26. Livne E, C Oliver, RD Leapman, LC Rosenberg AR Poole and M Silbermann: Age-related changes in the role of matrix vesicles in the mandibular condylar cartilage, J Anat 1987, 150:61-74.
27. Masoud I, E Shapiro, A Moses: Tibial epiphyseal development: A cross-sectional histologic and histomorphometric study in the New Zealand White Rabbit, Journal of Orthopaedic Research 1986,4:212-20.
28. Matsubara S, T Tamada and T Saito: Ultrastructural localizations of alkaline phosphatase and acid phosphatase activities in the human term placenta, Acta Histochem Cytochem 1987,20(3):283-94.
29. Matsubara S, T Tamada, K Kurahashi and T Saito: Ultrastructural localizations of adenosine nucleotidase activities in the human term placenta with special reference to 5'-nucleotidase activity. Acta Histochem 1987, 20(4):409-19.
30. Otte P: Histochemischer nachweis einer spezifischen 5'-nucleotidase im gelenkkörper, Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1958,310:103-6.
31. Pearse AGE: Histochemistry, Theoretical and Applied, Fourth Edition, J and A Churchill Ltd 1980. pp 881.
32. Reis J: Enzymologia (Den Haag) 2,110,188, 1937. CIT: Otte P: Histochemischer nachweis einer spezifischen 5'-nucleotidase im gelenkkörper, Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 310: 103-106, 1958.
33. Robison R: The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. Biochem J 17: 286-293. 1923. CIT: Kufnace MM and SA Miller: Alkaline and acid phosphatase activities during growth of long bones and mandibles, Calc Tiss Res 9: 173-178. 1972.
34. Sampson HW and MS Cannon: Zonal analysis of metabolic profiles of articular-epiphyseal cartilage chondrocytes: A histochemical study. Histochemical Journal 18: 233-238, 1986.
35. Silbermann M and J Frommer: Phosphatase within the cartilage of the mandibular condyle of the mouse. J Anat 116: 335-345, 1973.
36. Simmons DJ and et al: Mineralization of the rat epiphyseal cartilage: A circadian rhythm, Mineral Electrolyte Metab 1983,9:28-37.
37. Valesco A and J Hidalgo: Cytochemical localization of thiamine pyrophosphatase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase activities in rat epiphyseal chondrocytes, Biology of the Cell 1987,59:161-8.
38. Vittur F, N Stagni, E Moro and J B Bernard: Alkaline phosphatase binds to collagen; a hypothesis on the mechanism of extravesicular mineralization in epiphyseal cartilage, Experientia 1984,40:836-7.
39. Warwick R, PL Williams: Gray's Anatomy. Guy's Hospital Medical School, University of London, 35th edition 1973, pp 219-28.