

# Retinoik Asidin Prenatal Dönemdeki Endokondral Kemikleşme Üzerine Etkileri

## The effects of retinoic acid on endochondral ossification during prenatal development

### Neriman Çolakoğlu,

Assoc. Prof. MD,  
Department of Histology and Emriyology,  
Firat University Medical Faculty,  
nerimancoolakoglu@yahoo.com

### Ayşe Murat Aydın,

Assist. Prof. MD.,  
Department of Radiodiagnostic  
Firat University Medical Faculty,  
amurat@firat.edu.tr

### Hatice Banu Özel,

Dr. MD.,  
Department of Histology and Emriyology,  
Firat University Medical Faculty,  
bunuuyisal@yahoo.com

### Enver Ozan,

Prof. MD.,  
Department of Histology and Emriyology,  
Firat University Medical Faculty,  
ezon@firat.edu.tr

### Aysel Kükner,

Prof. MD.,  
Department of Histology and Emriyology,  
Abant İzzet Baysal Medical Faculty,  
akukner@hotmail.com

This manuscript can be downloaded from the webpage:  
[http://tipdergisi.erciyes.edu.tr/download/2007,29\(4\)280-284.pdf](http://tipdergisi.erciyes.edu.tr/download/2007,29(4)280-284.pdf)

Submitted : November 8, 2006  
Revised : March 5, 2007  
Accepted : April 5, 2007

#### Corresponding Author:

Neriman Çolakoğlu,  
Departman of Histology and Emriyology,  
Firat University Medical Faculty,  
Elazığ, Turkey

Telephone : +91 -xxx  
E-mail : nerimancoolakoglu@yahoo.com

#### Özet

**Amaç:**Bu çalışmada yüksek doz all-trans retinoik asidin sıçan fetuslerinde endokondral kemikleşme üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntemler:**Bu çalışmada 9 adet gebe Wistar-Albino cinsi ergin sıçanlar kullanıldı. Gebe sıçanlar 3 gruba ayrıldı. I. Grup kontrol olarak kullanıldı. II. Grup deneklere gebeliğin 12. gününde nörülasyon (prenatal 8.5-11.5 günler arası nörülasyonun başlangıç ve bitiş günleri olarak tespit edildi) sonrası III. Grup deneklere ise gebeliğin 8. gününde (nörülasyon öncesi) tek doz 60mg/kg all-trans retinoik asit gavaj yapılarak uygulandı. Bütün gebe sıçanlara gebeliklerinin 18. gününde servikal dislokasyon yapıldı ve her gruptan 6 fetus bu çalışma için kullanıldı. Işık mikroskopik ve radyografik teknikler kullanılarak fetal vertebralardaki kemikleşme incelendi.

**Bulgular:**Osteoblastik aktivite ve kemikleşen alanlar I. grupta belirgindi. II. grupta kemikleşme başlamasına rağmen III. grup vertebralarda kemikleşme belirtileri gözlenmedi. II. gruptaki kemikleşen alanlar I. gruba göre daha az olarak ayırt edildi.

**Sonuç:**Mevcut bilgiler ışığında nörülasyondan önce uygulanan yüksek doz all-trans retinoik asidin kemik morfogenezisini bozduğu fakat nörülasyon sonrası uygulanan all-trans retinoik asidin kemik oluşumu sırasında daha az yan etki gösterdiği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: **Fetus; Kemik; Osteogenezis; Retinoik asit.**

#### Abstract

**Purpose:** The aim of this study was to investigate the effects of excess all-trans retinoic acid on endochondral ossification in fetuses of rats.

**Material and Methods:** Nine Wistar-Albino pregnant rats were used in this study. Pregnant rats were divided into three groups. The first group of rats were used as control. The second group were fed by gavage a single dose of 60 mg/kg all-trans retinoic acid on day 12 of gestation after neurulation which began 8.5 day of gestation and finished 11.5 day of gestation whereas third group received same dose all-trans retinoic acid on day 8 of gestation (before neurulation). All pregnant rats were sacrificed at day 18 of gestation. Six fetuses from each group were used. Ossification of fetal vertebrates was light microscopically and radiographically determined.

**Results:** Osteoblastic activity and ossified areas were significant in group-I. Ossification signs were not evident in group-III whereas ossification in vertebrates begun in group-II. However, ossified areas of group-II were less than those of group-I.

**Conclusion:** In view of present findings, we suggest that administration of excess all-trans retinoic acid prior to neurulation disrupted bone morphogenesis. However, its administration following neurulation had less adverse effect on bone formation.

Key Words: **Bone; Fetus; Osteogenesis; Retinoic acid.**

## Giriş

Kemiğin fetal gelişimi iki şekilde olmaktadır. Her iki şekilde de primitif kollagenöz destek dokusunun yerini kemik dokusuna bırakması söz konusudur. Uzun kemikler, vertebra, pelvis ve kafatası kemiğinin tabanını oluşturan kemikler için sürekli büyüyen bir kıkırdak model oluşur ve bu kıkırdak daha sonra yerini kemiğe bırakır. Bu gelişim süreci endokondral kemikleşme olarak bilinir. Kafatasının yassı kemikleri, maxilla, mandibulanın büyük kısmı ise primitif mezenşim dokusunun direkt kemik dokusuna dönüşümü ile şekillenir. Bu tip kemikleşme ise intramembranöz kemikleşme olarak bilinir (1). Endokondral kemikleşme sırasında kondrositler proliferasyon, olgunlaşma, hipertrofi, matriks vezikül biyogenezisi ve apoptozisi içeren aşamalardan geçmektedir. Bu olaylar dizisi kıkırdak dokusunun yerini kemik dokusuna bırakmasıyla sonlanır. Çoğalan kondrositler çoğunlukla proteoglikan ve tip II kollajenden oluşan ekstrasellüler matriksi sentezlerler (2). Kondrositlerin olgunlaşması; hücrel büyüklükteki artış (hipertrofi), ve alkalın fosfataz aktivitesi ve tip X kollagen gibi hipertrofinin fenotipik belirteçlerinin ekspresyonu ile birlikte seyredir (2-7). Alkalın fosfataz aktivitesi ve tip X kollagen ekspresyonu matriks mineralizasyonunu düzenler (3-7). Kondrosit olgunlaşması başta bone morfogenetik protein (BMP) ve paratiroid hormonu ile ilişkili proteinler olmak üzere birçok otokrin ve parakrin faktör tarafından düzenlenmektedir (2). Endokondral kemikleşme sırasında kondrositlerin çoğunluğu apoptozis ile ölmekte, mineralize matriks osteoklastlar tarafından sindirilmekte ve kondrositlerin bir kısmı fenotipik kemik hücrelerine (osteoblast benzeri hücreler) farklılaşmaktadır (8). İn vivo kemik gelişimi oldukça kompleks bir fenomendir. Osteogenezis; osteoblastların mezenşimal prekürsörlerinin çoğalıp sırasıyla preosteoblastlara (osteoprogenitör hücrelere), osteoblastlara ve olgun osteoblastlara farklılaşarak ekstrasellüler matriksin birikip mineralize olmasıyla sonuçlanır (9). Retinoidler olarak adlandırılan A vitamini ve metabolitleri fizyolojik konsantrasyonlarda büyüme, hücrel farklılaşma, üreme (10, 11) gibi organizmanın normal fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Aktif A vitamini metaboliti olan all-trans retinoik asit (atRA) omurgalıların embriyonik gelişimleri sırasında hücrel farklılaşmada, morfogenezisde retinolden çok daha aktiftir (12). Genetik analizler retinoik asit reseptörlerinin (RAR) yokluğunda kıkırdak oluşumunda ciddi yetersizlik olduğunu göstermiştir. Transgenik farelerin gelişen ekstremitelerinde aktif RAR'lar negatif veya zayıf

olarak ifade edildiğinde kondrogenezisde problem olmakta ve iskelet malformasyonları oluşmaktadır. Bu sonuçlar RAR ile ilgili sinyallerin iskelet gelişiminde önemli rol oynadığının göstergesidir. RAR'lar kondroblast farklılaşmasını düzenlemekte ve retinoik asit (RA) sinyaline iştirak ederek iskelet taslağının apozisyonel büyümesinde rol oynamaktadırlar (13).

Prenatal gelişim sırasında bir morfogen olarak hareket eden retinoik asit, gebeliğin erken dönemlerinde yüksek dozda uygulanmasına bağlı olarak teratojenik etki de göstermektedir. Maternal yüksek doz RA omfalosel, ekzensefali, ekzoftalmus ve ekstremitte kısalığı gibi defektlere yol açmaktadır (14).

Bu çalışmada prenatal gelişimin farklı iki döneminde uygulanan atRA'in endokondral kemikleşme üzerine olan etkilerinin ışık mikroskopik ve radyolojik olarak belirlenmesi amaçlandı.

## Yöntem ve Gereçler:

Araştırma, ağırlıkları 250-270 gr olan 9 adet Wistar-Albino cinsi ergin (3 aylık) dişi sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi.  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  oda ısısında 12 saat ışık (7:00-19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00-7:00) tutulan sıçanlar, özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi.

## Maternal All-trans Retinoik Asit Uygulanması

Çalışmada kullanılan sıçanlara her gün 8.00 - 9.30 saatleri arasında vajinal smear yapıldı. Proöstrüs evresinde olduğu tespit edilen sıçanlar, aynı günün akşamı erkek sıçanlarla 1:1 şekilde eşlenip aynı kafese konuldu. Ertesi gün sabah saat 7.00'da erkek ve dişi sıçanlar ayrıldı. Yapılan vajinal smear sonrası sperm (+) olarak tespit edilen sıçanların gebeliğin 0. gününde oldukları kabul edildi. Gebe olduğu saptanan 9 adet sıçan 3 ana gruba ayrıldı.

I.Grup: Kontrol grubu normal beslenen gebe sıçanlara (n=3) gebeliklerinin 18. gününde servikal dislokasyon uygulandı. Midsagittal insizyonla fetusleri alındı. Bu fetuslerden rastgele seçilen 6 adeti I.grubu oluşturdu.  
II.Grup : Gebeliklerinin 12. gününde (GD 12) gavajla 60 mg/kg dozda atRA (15) verilen sıçanlara (n=3) gebeliklerinin 18. gününde servikal dislokasyon uygulanıp, midsagittal insizyonla fetusleri alındı. Bu fetuslerden özellikle gelişim geriliği olanlar seçilip (n= 6) II.grup oluşturuldu.

III. Grup: Gebeliklerinin 8. gününde (GD 8) gavajla 60 mg/kg dozda atRA (15) verilen sıçanlara (n=3)

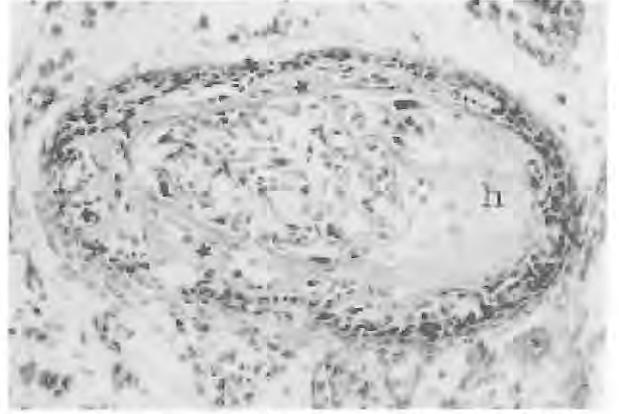
gebeliklerinin 18. gününde servikal dislokasyon uygulanıp, midsagittal insizyonla fetusleri alındı. Bu fetuslerden özellikle gelişim geriliği olanlar seçilip (n= 6) III.grup oluşturuldu.

Fetuslar Bouin tespit solüsyonuna atıldı, anomaliler açısından incelenip, radyografileri çekildikten sonra midsagittal olarak diseke edildi. Bouin solüsyonunda 24 saatlik tespitten sonra dereceli alkollerle (50, 60, 70, 80, 90, 96, 100°) yıkandı. Xylol serilerinden geçirildi. Isısı 54°C olan etüvde xylol-parafin, yumuşak parafin ve sert parafin ile muamele edilip bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5 µm'lik kesitler alınıp Hematoksilen – Eozin tekniği ile boyandı. Kesitler BH2 Olympus fotomikroskopla incelenip fotoğraflandı.

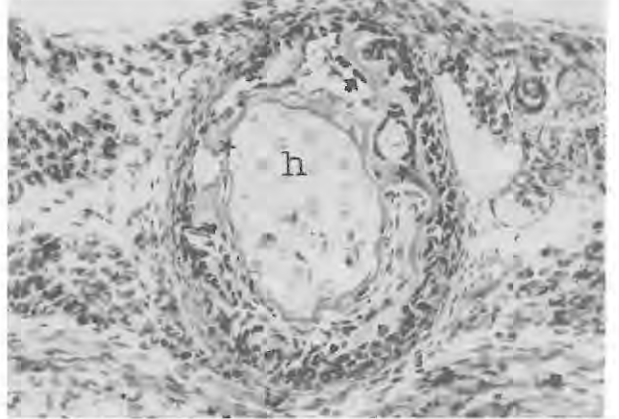
### Bulgular

Kontrol grubuna ait kesitlerde endokondral kemikleşme belirgin olarak izlendi. Bu grup vertebralarda hipertrofik kırıkdağ zonu, kemikleşen alanlar ve yüksek osteoblastik aktivite saptandı (Resim 1). Nörolasyon sonrası (GD12) atRA'e maruz kalan fetusların (grup II) vertebralarda kontrol grubu ile benzer şekilde hipertrofik kırıkdağ zonu, kemikleşmenin oluştuğu alanlar ve osteoblastik aktivite gözlenmekle birlikte, vertebralar kontrolden daha küçük çaplı olarak ayırt edildi (Resim 2). Nörolasyon öncesi (GD8) atRA'e maruz kalan fetuslarda (grup III) vertebra çaplarının kontrole ve grup II'ye göre oldukça küçük olduğu ve herhangi bir kemikleşme belirtisine sahip olmadıkları tespit edildi. Bu grup fetuslarda perivertebral bölgelerde belirgin vaskülarizasyon gözlendi ve vertebraların henüz kırıkdağ yapılarını koruduğu saptandı (Resim 3).

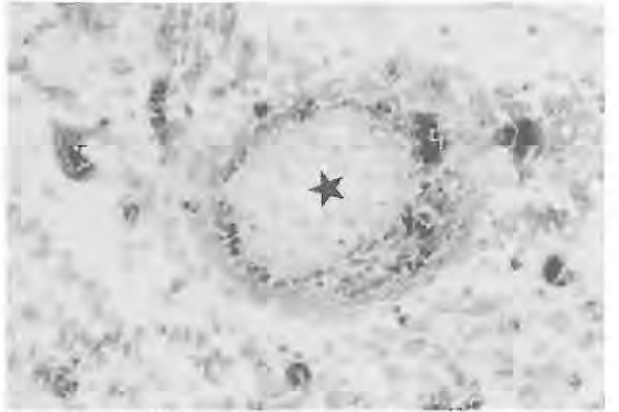
Yapılan radyografik çalışmalar da ışık mikroskopik bulguları desteklemekte idi. Kontrol grubuna ait radyografide kemik yapıları ossifiye idi; vertebra, kafatası, ekstremiteler ve yüz kemikleri belirgin olarak ayırt edildi (Resim 4a). II. Grup deneklerdeki ossifikasyonun kontrol grubundaki kadar geniş çaplı ve belirgin olmadığı gözlemlendi. Vertebralar kısmen ossifiye idi (Resim 4b). III. Grup deneklerdeki kemiklerin ossifikasyonu belirgin olmayıp kırıkdağimsi olarak gözlemlendi. Kafatası, yüz kemikleri ve ekstremiteler kemiklerinin gelişimi yetersiz ve küçük boyutlu olarak ayırt edildi (Resim 4c). Grup II ve III 'teki fetusların tepe-oturma nokta uzunlukları kontrol grubuna göre daha kısa olarak tespit edildi.



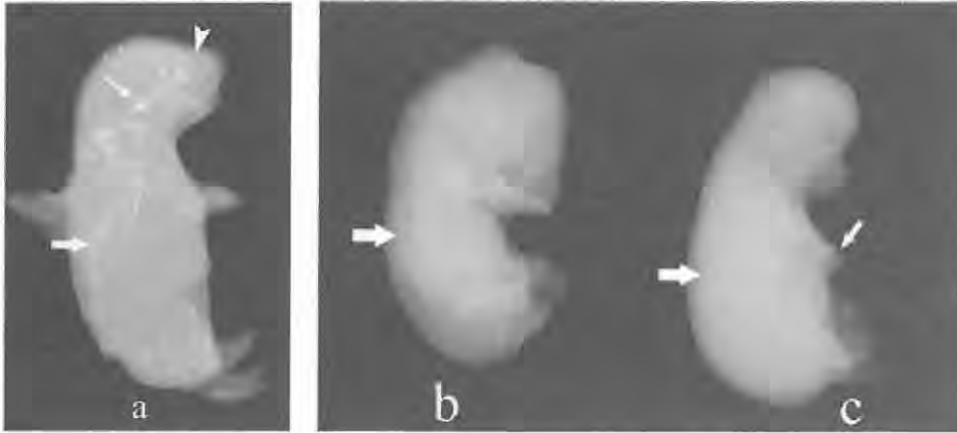
Resim 1. Grup I. Hipertrofik kırıkdağ zonu (h), osteoblastik aktivite (oklar), kemikleşen alanlar (\*) belirgin olarak gözlenmektedir. Hematoksilen Eozin x 120



Resim 2. Grup II. Hipertrofik kırıkdağ zonu (h), osteoblastik aktivite (ok) ve kemikleşen alanlar (\*). Vertebra çapının Grup I'den daha küçük olduğu belirgin. Hematoksilen Eozin x 120



Resim 3. Grup III. Vertebra çapının Grup I ve II'ye göre anlamlı derecede küçük olduğu, ve vertebranın kırıkdağ yapısında olduğu (\*) ve perivertebral bölgenin oldukça vaskülarize olduğu ayırt edilmekte. Hematoksilen Eozin x 120



Şekil 4: Fetuslerin lateral radyografileri. a: Grup I . Kemik yapılar belirgin şekilde ossifiye izlenmektedir. Vertebralalar (kalın ok), kafatası ( ince ok ) ve yüz kemikleri (ok başı) net izlenmektedir. b: Grup II. Vertebralalar kısmen ossifiye izlenmektedir (kalın ok).c:Grup III. Genel olarak kemiklerin ossifikasyonu yetersizdir (kalın ok). Kafatası ve yüz kemiklerinin gelişimi yetersizdir ve bu kemikler küçük boyutlardadır. Ekstremiteler belirgin derecede kısa ve ince olarak gözlenmektedir (ince ok). b ve c 'deki fetuslerin boyutları a ile karşılaştırıldığında küçüktür.

### Tartışma

Fizyolojik koşullarda retinoik asit kondrojenik farklılaşma ve mineralizasyonu aktive eden A vitamini metabolitlerindendir (16,17). Memeli ekstremitte gelişiminde RA kondrojenik hücreleri de kapsayan birçok hücre türünün farklılaşmasını etkilemektedir (13). Birçok deneysel çalışma endojen retinoidlerin ve A vitamini metabolitlerinin vertebra ve ekstremitte gelişiminde önemli rol oynadığını göstermiştir (18). Teratolojik çalışmalar retinoidlerin gerek fazlalığının gerekse yetersizliğinin ekstremitte gelişiminde bozukluğa yol açtığını ortaya koymuştur ( 18-20).

Yapılan bu çalışmada da morfolojik ve radyolojik incelemeler atRA fazlalığının ekstremitte ve fetal tepe - oturma noktası uzunluğunda önemli derecede kısalığa yol açtığını gösterdi. Yine fetal vertebralardan alınan kesitlerde gelişimin erken döneminde atRA uygulanan deneklerde osteogenezisin geciktiği gözlemlendi. Radyografik incelemelerimizde bu bulgumuzu destekler nitelikte olup bu grup vertebralaların kemikten daha çok kıkırdığımsı bir taslaktan ibaret olduğunu gösteriyordu.

Yu ve Xing RA'in iskelet gelişiminin erken safhalarında (kondrogenezis) etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada RA'in kıkırdak farklılaşmasını inhibe ederek iskelet malformasyonlarına yol açtığını tespit etmişlerdir (21). Biz de yaptığımız çalışmada kıkırdak taslağın yerini kemik dokuya bırakmamasını kondrogenezis aşamasındaki bir inhibisyon kaynaklandığını düşünmekteyiz. Yapılan iki farklı çalışmada atRA'in embriyonik mezenşimal hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını inhibe ettiği, farklılaşan kondrositlerde ise fenotipik kaybın meydana geldiği saptanmıştır (22, 23).

Bu çalışmanın sonucunda prenatal dönemde teratojenik dozda maternal atRA'e maruz kalan fetuslerde vertebra ve ekstremitte gelişiminde bozukluk ve ossifikasyonda gecikme saptanmıştır. Bu durum özellikle nörolasyon öncesinde atRA'e maruz kalan fetuslarda daha belirgin olarak gözlemlendi. İskelet gelişiminde ve kemikleşmede birçok sinyal molekülünün birbiriyle etkileştiği ve koordineli hareket ettiği bilinmektedir. Biz yüksek doz atRA'in sinyal molekülleri arasındaki etkileşimi bozup hücre proliferasyonu ve farklılaşmayı inhibe ederek ekstremitte ve vertebralarda gelişim bozukluklarına yol açtığını düşünmekteyiz.

### Kaynaklar

1. Young B, Heath JW, eds. *Wheater's Functional Histology*. Sydney: Churchill Livingstone; 2000.
2. Garimella R, Bi X, Cmacho N, Sipe JB, Anderson HC. Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization. *Bone* 2004; 34: 961-970.
3. Kirsch T, von der Mark K. Remodelling of collagen types I, II and X and calcification of human fetal cartilage. *Bone Miner* 1992; 18: 107-117.
4. Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. Regulated production of mineralization competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* 1997; 137: 1149-1160.
5. Kirsch T, Harrison G, Golub EE, Nah HD. The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicles – mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem* 2000; 275: 35577- 35583.
6. Leboy PS, Shapiro IM, Uschmann BD, Oshima O, Lin D. Gene expression in mineralizing chick epiphyseal cartilage. *J Biol Chem* 1988; 263: 8515-8520.
7. Schmid TM, Bonen DK, Luchene L, Linsenmayer TF. Late event in chondrocytes differentiation: hypertrophy, type X collagen synthesis and matrix calcification. *In vivo* 1991; 5: 533-540.
8. Cancedda FD, Gentili C, Manduca P, Cancedda R. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *J Cell Biol* 1992; 117: 427- 435
9. Raouf A, Seth A. Ets transcription factors and targets in osteogenesis. *Oncogene*, 2000; 19:6455-6463.
10. Noy N. Retinoid binding proteins: Mediators of retinoid action. *Biochem J* 2000; 348: 481-495
11. Pauken CM, LaBorde JB, Bolon B. Retinoic acid acts during periimplantational development to alter axial and brain formation. *Anat Embryol* 1999; 200: 645-655
12. Nau H. Retinoid teratogenesis: Toxicokinetics and structure-specificity. *Arc Toxicol* 1993; 16: 118-127.
13. Underhill TM, Sampaio AV, Weston AD. Retinoid signaling and skeletal development. *Novartis Found Symp*. 2001; 232: 171-185
14. Colakoglu N, Kukner A. Teratogenicity of retinoic acid and its effects on TGF- $\alpha$ 2 expression in the developing cerebral cortex of the rat. *J Mol Histol* 2004; 35: 823-827
15. Yasuda Y, Konishi H, Kihara T, Tanimura T. Developmental anomalies induced by all-trans retinoic acid in fetal mice: II. Induction of abnormal neuroepithelium. *Teratology* 1987; 35: 355-366
16. Koyama E, Golden EB, Kirsch T, et al. Retinoid signaling is required chondrocytes maturation and endochondral bone formation during limb skelotogenesis. *Dev Biol* 1999; 208: 375-391
17. Wu LN, Ishikawa Y, Nie D, Genge BR, Wuthier RE. Retinoic acid stimulates matrix calcification and initiates type I collagen synthesis in primary cultures of avian weight-bearing growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 1997; 65: 209-230.
18. Means AL, Gudas LJ. The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 201-233
19. Lee GS, Kochhar DM, Collins MD. Retinoid-induced limb malformations. *Curr Pharm Des* 2004; 10 (22) : 2657-2699.
20. Zhou J, Kochhar DM. Cellular anomalies underlying retinoid-induced phocomelia. *Reprod Toxicol* 2004; 19: 103-110
21. Yu Z, Xing Y. All-trans retinoic acid inhibited chondrogenesis of Mouse embryonic palate mesenchymal cells by down-regulation of TGF- $\beta$ /Smad signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ; 340: 929-934.
22. Cho SH, Oh CD, Kim JS, Kim IC, Chun JS. Retinoic acid inhibits chondrogenesis of mesenchymal cell by sustaining expression of N-cadherin and its associated proteins. *J Cell Biochem* 2003; 89: 837-847
23. Bhasin N, Kernick E, Luo X, Seidel HE, Weiss ER, Lauder JM. Differential regulation of chondrogenic differentiation by the serotonin 2B receptor and retinoic acid in the embryonic mouse hindlimb. *Dev Dyn* 2004 ; 230: 201-209.