

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**HİPPO-YAP/TAZ SİNYAL YOLAĞININ
BÜYÜME PLAKLARININ İYONİZAN RADYASYONA
ERKEN CEVABINDAKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. MUHAMMED ERTUĞRUL ŞENTÜRK

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. BEKİR EREN ÇETİN**

**ANKARA
KASIM 2021**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**HİPPO-YAP/TAZ SİNYAL YOLAĞININ
BÜYÜME PLAKLARININ İYONİZAN RADYASYONA
ERKEN CEVABINDAKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. MUHAMMED ERTUĞRUL ŞENTÜRK

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. BEKİR EREN ÇETİN**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2020-33 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
KASIM 2021**

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Muhammed Ertuğrul Sentürk
Baba Adı	
Doğum Yeri/Tarihi	
Diploma Tarihi / Diploma No	
Mezun Olduğu Fakülte	Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 5 Ay: 7
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Hippo-YAP/TAZ Sinyal Yolağının Büyüme Plaklarının
İyonizan Radyasyona Erken Cevabındaki Rolü

JÜRİ KARARI: Jüri kararıyla tez olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

BASKAN

ÜYE

ÜYE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
EKLER.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Endokondral Kemikleşme Süreci ve Büyüme Plağı.....	3
2.1.1. İşlev ve Kondrositik Zonlar.....	3
2.1.2. Endokondral Kemikleşme Sürecinde Kondrosit Farklılaşmasının Ana Regülasyonu.....	5
2.2. Radyasyon İlişkili Büyüme Plağı Hasarı ve İyileşme Cevabı.....	8
2.2.1. Radyasyon İlişkili Büyüme Plağı Hasarının Histomorfolojisi ve Olası Patofizyolojik Mekanizmaları.....	8
2.2.2. Büyüme Plaklarının Radyasyon Hasarı Sonrası İyileşme Cevabı.....	10
2.3. Hippo-YAP/TAZ Sinyal Yolağı.....	14
2.3.1. Hippo Sinyal Yolağına Giriş.....	14
2.3.2. Hippo Yolağının Drosophila ve Memelilerdeki Ana Komponentleri ve Çekirdek Kinaz Kaskadı.....	15
2.3.3. Hippo-YAP/TAZ Sinyal Yolağının Düzenleyicileri.....	16
2.3.4. YAP/TAZ Transkripsiyonel Aktiviteleri.....	19
2.3.4.1. YAP/TAZ Aracılı Büyüme ve Gelişim Süreçlerinin Kontrolü.....	20

2.3.4.2. YAP/TAZ Aracılı Hücre Bölünmesinin ve Hücre Yaşam Döngüsünün Kontrolü.....	21
2.3.4.3. Hücre Farklılaşma Süreçlerinde YAP/TAZ Aktivitesi.....	22
2.3.4.4. Rejenerasyon Süreçlerinde YAP/TAZ Aktivitesi.....	22
2.3.4.5. YAP/TAZ Aktivitesinin Patolojik Süreçlerdeki Olası Rollerini.....	23
2.3.5. Hippo-YAP/TAZ Sinyal Yolağının Büyüme Plağının Endokondral Gelişimindeki ve Hasar Sonrası Büyüme Plağı Tamir Yanıtındaki Aktivitesi.....	23
2.4. Çalışmanın Amacı.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Deney Protokolü.....	27
3.1.1 Etik Kurul Onayı ve Deney Hayvanlarının Temini.....	27
3.1.2. Radyoterapi Planlama ve Uygulama Süreci.....	28
3.1.3. Deney Grupları.....	30
3.2. Sakrifikasyon.....	30
3.3. Histomorfolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemeler.....	31
3.4. İstatistik.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Histomorfolojik Bulgular.....	33
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	37
4.2.1. PTHrP.....	37
4.2.2. YAP.....	41
4.2.3. TAZ.....	43
5. TARTIŞMA.....	49

6. SONUÇLAR.....	66
7. KAYNAKLAR.....	69
8. ÖZET.....	97
9. ABSTRACT.....	99
10. EK-1- ETİK KURUL ONAYI.....	101
11. EK-2- ÖZGEÇMİŞ.....	103



KISALTMALAR DİZİNİ

ark. - arkadaşları

BMPs – Kemik Morfojenik Proteinler

CTGF – Bağ Doku Büyüme Faktörü

FGF – Fibroblast Büyüme Faktörü

GPCRs – G Protein Kenetli Reseptörler

Gy – Gray

H&E – Hematoksilen Eozin

Hpo - Hippo

IGF – İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IHH – Indian Hedgehog

MAP4Ks – Mitojen Aktiviteli Protein Kinazlar

MST 1/2 – Str 20 Benzeri Kinaz 1/2

LATS 1/2 – Tümör Baskılayıcı Kinaz 1/2

PTHrP – Paratiroid Hormon İlişkili Protein

RT - Radyoterapi

RUNX2 – Runt İlişkili Transkripsiyonel Faktör

Sav - Salvador

TAZ – PDZ Bağlayıcı Motif ile Transkripsiyonel Ko-aktivatör

Wts – Warts

WWTR 1 - PDZ Bağlayıcı Motif ile Transkripsiyonel Ko-aktivatör

YAP – Yes İlişkili Protein

Yki - Yorkie

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Büyüme plağının zonal morfolojisi ve büyüme plağındaki farklılaşma aşamalarını düzenleyen başlıca moleküllerin grafiksel özeti.....	4
Şekil 2. YAP/TAZ transkripsiyonel ko-aktivatörlerinin ana sinyal girdileri, etkileri ve Hippo kor kinaz kaskadı aracılığıyla sitoplazmik sekestrasyonunun ve nükleer aktivitesinin kontrolü.....	17
Şekil 3. Radyoterapi tedavi alanı (A) ve doz dağılımları (B).....	29
Şekil 4. Hematoksilen Eozin (H/E) boyamalara ait görüntüler.....	34
Şekil 5. Hematoksilen Eozin (H/E) boyamada gözlenen patolojik histomorfolojik bulguların temsili örnekleri.....	37
Şekil 6. PTHrP immünhistokimyasal boyamalarına ait görüntüler.....	38
Şekil 7. PTHrP ekspresyon düzeylerindeki değişimin karşılaştırmalı grafiği.....	40
Şekil 8. YAP immünhistokimyasal boyamalarına ait görüntüler.....	42
Şekil 9. YAP ekspresyon düzeylerindeki değişimin karşılaştırmalı grafiği.....	44
Şekil 10. TAZ immünhistokimyasal boyamalarına ait görüntüler.....	46
Şekil 11. TAZ ekspresyon düzeylerindeki değişimin karşılaştırmalı grafiği.....	48
Şekil 12. Radyoterapi uygulanmış gruplarda PTHrP, YAP ve TAZ ekspresyon değişikliklerinin korelasyon analiz grafikleri.....	48

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Deney grupları.....**30**

Tablo 2. PTHrP, YAP ve TAZ ekspresyonlarının gruplar arasındaki katsal değişimi
ve Wilcoxon İşaretli Sıralı Testi ikili istatistiksel karşılaştırma sonuçları.....**45**



EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı.....99

EK 2. Özgeçmiş.....101



1. GİRİŞ

Uzun dönemdeki yan etkilerine rağmen hem lokal kontrole hem de sağkalıma belirgin katkı sağlaması sebebi ile radyoterapi bir çok çocukluk çağı malign tümörünün modern tedavisinde önemini korumaktadır. (1) Nöroblastoma, ewing sarkom, wilms tümör, rabdomyosarkoma, medulloblastoma, hodgkin lenfoma gibi malignitelerin multimodal küratif tedavisinde hastaların %30-%70'unda radyoterapi kullanılması gerekmektedir. (1) Uzun dönem sağkalım sağlanabilen malign tümörlü çocuk sayısı zaman içerisinde önemli düzeyde artış göstermiştir. (2) Bu sebeple radyoterapi ilişkili uzun dönem toksisiteler daha sık gözlenmektedir ve bu toksisitelerin önlenmesi daha da önem kazanmıştır. (3) Çocukluk çağı radyoterapi uygulamalarında tümör yerleşimine bağlı olarak epifizyal büyüme plakları yakın komşulukları sebebi ile sıklıkla doz alanı içerisinde kalmaktadır. Büyüme plaklarında radyasyon maruziyeti sonrası büyüme arresti ortaya çıkmakta ve bu hasar uzun dönemde boy kısalığı, ekstremiteler uzunluk farklılıkları, aç deformiteleri gibi yan etkilere sebep olmaktadır. (4, 5) Büyüme plaklarının radyasyon duyarlılığı ve hasarı uzun süredir bilinmesine rağmen ne moleküler mekanizmaları henüz tam olarak ortaya konabilmiştir ne de etkili bir önleme veya tedavi yöntemi bulunabilmiştir. (4, 6-8) Amifostin, pentoksifilin, misoprostol, selenyum gibi bazı selektif radyokoruyucular denenmiş olsa da çalışmalar hayvan deneylerinin ötesine geçememiştir ve etkinlikleri de kısıtlı düzeyde gözlenmiştir. (7, 9-14) Gelişen tedavi teknikleri sayesinde sağlanan homojen doz dağılımları, tedavi alanlarındaki değişimler, tedavi dozlarındaki düşüş ve fraksinasyone tedaviler uygulamanın katkıları ile hasar şiddeti azaltılabilmüş olsa

da hasar halen daha kaçınılmazdır ve çoğunlukla sadece aç ı deformitelerini önlemede faydal ı olabilmektedir. (5)

İn vivo bazı çalışmalarda radyoterapinin büyüme plaklarındaki retardasyon etkisinin geçici olduğu ve ikinci haftadan sonra hasar onarımının olduğu gösterir nitelikte büyüme plaklarında bir iyileşme cevabının ortaya çıktığı gösterilmiştir. (7, 15-19) Bu iyileşme cevabı hasarı tamamen onarmaktan uzak, inkomplet bir tamir sürecidir. Bu yanıt büyüme plağındaki radyasyonun hasar verici etkisinin nihai boyutunu belirliyor olabilir. Bu iyileşme fazının moleküler ve genetik regölasyonunun anlaşılması bize selektif olarak müdahale ve radyasyon hasarını azaltma şansı tanıyabilecektir.

Hippo sinyal yolağı bir çok hücre içi ve dışı kaynaktan sinyal toplayıp Yes İlişkili Protein (YAP) ve paralogu PDZ Bağlayıcı Motif ile Transkripsiyonel Ko-aktivator (TAZ) transkripsiyon ko-aktivatörlerinin etkinliğini kontrol eden ve görece yeni keşfedilmiş sayılabilecek bir kinaz kaskadıdır. (20) İlk olarak organ boyutlarını ve proliferatif süreçleri kontrol ettiği saptanmışsa da, peşi sıra hızla artan kanıtlar Hippo yolağının gelişimsel ve rejenerasyon süreçlerinin de kritik bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. (21) Farklı bir çok organ ve dokudaki yaygın etkisini endokondral kemikleşme sürecinde de sergilemektedir. (22) Bu sebeple iyonizan radyasyon ile hasar almış büyüme plağında rejenerasyon sürecini başlatan iyileşme cevabının kritik bir parçası olması şaşırtıcı olmayacaktır. Fakat bu iyileşme cevabında Hippo-YAP/TAZ sinyal yolağının düzenleyici etkisinin var olup olmadığı ve diğer bilinen moleküler mekanizmalarla ilişkisi henüz incelenmemiştir.

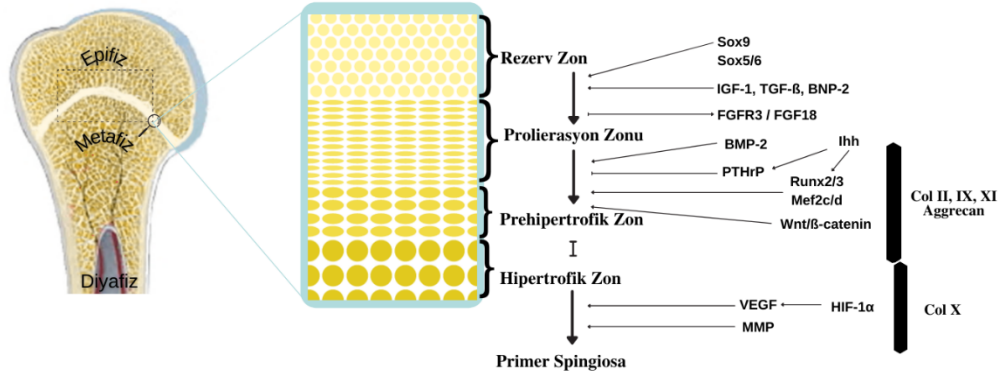
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Endokondral Kemikleşme Süreci ve Büyüme Plağı

2.1.1. İşlev ve Kondrositik Zonlar

İntramembranöz kemikleşme gösteren düz kemiklerin aksine apendiküler ve aksiyel kemikler endokondral kemikleşme süreci ile gelişim göstermektedirler. (23) Endokondral kemikleşme basitçe, farklılaşmamış mezenkimal hücre kümesinden farklılaşan kondrositlerin sentezlediği kartilajenöz matriksin belirli bir maturasyon sürecinden geçerek kemik doku ile yer değiştirdiği süreçtir. (24) Embriyonel dönemde başlayan bu süreç yetişkinliğe gelene dek postnatal dönemde de devam etmektedir. Uzun kemiklerin bu büyüme süreci kartilajenöz büyüme plağını merkez alan kondrosit farklılaşmasının yön verdiği epifizyal büyüme ile yönetilmektedir. (25)

Büyüme plağı epifiz ile metafiz arasına yerleşmiş oldukça özelleşmiş bir kıkırdak dokudur. Olgunlaşma sürecindeki bir büyüme plağında farklılaşma sürecinin aşamalarını takip eden ve o aşamalara göre organize olan morfolojik farklı zonlar gözlenebilmektedir. (26) Küresel progenitör kondrositlerden oluşan rezerv veya dinlenme zonu, kolumnar yapılar oluşturan düzleşmiş proliteratif kondrositlerden oluşan proliteratif zon, proliferasyonu yavaşlamış matür kondrositlerden oluşan prehipertrofik veya transizyonel zon ve boyutça oldukça genişlemiş kondrositlerden oluşan hipertrofik zon epifizyal kondro-osseöz bileşkeden metafizyal kondro-osseöz bileşkeye doğru uzanan fark edilebilir temel dört zondur. (27) (Şekil 1) Epifizyal periosta yakın yerleşimli muhtemelen



Şekil 1. Büyüme plağının zonal morfolojisi ve büyüme plağındaki farklılaşma aşamalarını düzenleyen başlıca moleküllerin grafiksel özeti

prekürsör hücreleri içeren rezerv zondan matriks zentezinin yapıldığı metafize yakın kondro-osseöz bileşkedeki hipertrofik zona doğru kıkırdak doku matur matriks içeren kemik dokuya doğru yer değiştirmektedir. Bu süreç boyunca hızlı çoğalan, kartilajenöz dokunun temel yapısı olan tip II kollajeni sentezleyen proliferatif kondrositten, proliferasyonu durmuş ve boyutça yaklaşık 10-20 kat genişlemiş, genetik programını tip X kollajen sentezlemeye çevirmiş hipertrofik kondrosite dönüşüm gerçekleşmektedir. Hipertrofik zonda yerleşmiş bu hipertrofik kondrositler apoptoza uğramadan önce ekstraselüler matriksin mineralizasyonunu düzenlemekte ve osteoklastik, osteoblastik farklılaşmayı ve damarsal yapıların işleyişini düzenleyerek matur kemiğe iskelet olacak kartilajenöz matrikse son şeklini vermektedirler. (23, 25-27) Arkada kalan avasküler kartilajenöz matriks osteoblastik hücrelerin kemik matriks sentezi ve damar invazyonu ile trabeküler kemiği oluşturacak kalsifiye kemik matriksine dönüşmektedir. (25, 28)

2.1.2 Endokondral Kemikleşme Sürecinde Kondrosit Farklılaşmasının Ana Regülasyonu

Endokondral kemikleşme kompleks, oldukça özelleşmiş ve sıkı kontrol edilen bir çok sinyal kaskadına ve genetik regülasyona ihtiyaç duymaktadır. Bu süreç boyunca kondrositler de değişen regülasyona bağlı eş zamanlı olarak diferansiye, proliferatif, prehipertrofik ve hipertrofik kondrosit aşamalarından geçerek hem farklılaşma sürecine eşlik etmektedir hem de süreci düzenleyici anahtar bir rol oynamaktadır. Bu kondrositik hücreler morfolojik olarak farklılık gösterdiği gibi moleküler ve genetik programlanma açısından da farklılık göstermektedir. (27, 29, 30) (Şekil 1) Kondrosit farklılaşma sürecindeki intrinsik ve ekstraselüler parakrin sinyal değişiklikleri radyoterapiye bağlı büyüme plağı hasarı ve hasar sonrası büyüme plaklarının iyileşme sürecinin mekanizmalarının ortaya konulması ve anlaşılması için de oldukça önemlidir ve burada kısaca özetlenecektir. (7, 19)

SOX9 hem kondrogenезisin başlaması hem de sonraki kondrositik proliferasyon ve farklılaşma aşamaları için tek başına en önemli transkripsiyon faktörüdür. (31) SOX9 diğer transkripsiyon faktörleri olan SOX5 ve SOX 6 ile beraber çalışarak kondrosit proliferasyon ve farklılaşmasını yönetmektedir. (32) SOX9, değişen ekspresyon düzeyi ve diğer ko-regülatörlerin varlığına göre farklı aşamalardaki kondrositlerin farklı davranışlarını kontrol etmektedir. (27) Mezenkimal kök hücreden ilk kondrositik farklılaşma SOX9 ekspresyonunu arttıran kemik morfogenetik proteinlerin (BMPs) kontrolü altındadır. (33) SOX9 aktivitesi post-transkripsiyonel olarak kendisi tarafından düzenlendiği gibi, Runt ile

ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RunX2), WNT/ β -Catenin ve HOX gen kümesi ile de negatif olarak regüle edilmektedir. (27, 34-37) Diferansiye kondrositler bu aşamadan sonra Indian Hedgehog (IHH), BMPs, Wnt, Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) sinyal yollarının kontrolü altında Kollajen II ve bir proteoglikan olan Aggrecan'dan zengin matriks sentezleyen düzleşmiş proliferatif kondrositlere dönüşür. (27, 38-40) Proliferatif kondrositin hipertrofik kondrositlere dönüşümü ise oldukça sıkı kontrol edilir ve PTHrP, IGF, BMP, Wnt/B-Catenin/FGF gibi bir çok sinyal yolağının karşılıklı iletişimine bağımlıdır. (27, 28, 38) Bu dönüşüm proliferatif fazdaki kondrositlerin siklin kinazların kontrolündeki hücre döngüsünün durdurulmasını gerektirmektedir. Hipertrofik diferansiyasyona ilerlemenin nasıl olduğu henüz tam olarak bilinmese de terminal diferansiyasyonu gerçekleştirmiş kondrositlerde yoğun olarak eksprese edilen CKI p57Kip2 hücre döngüsünden çıkışın ana medyatörü olarak gösterilmektedir ve bu genin olmadığı farelerde uzamış hücre döngüsünde kalmış, hipertrofik kondrosite farklılaşmanın olmadığı kondrositlerin izlendiği endokondral kemikleşme defekti izlenmiştir. (27, 41, 42) Bu aşamada BMPs, FGF, İnsulin benzeri büyüme faktörü (IGF), WNT sinyali gibi bir çok faktörün kontrolü olsa da temel düzenleyicilerin IHH ve Paratiroid hormon ilişkili protein (PTHrP) olduğu düşünülmektedir. (27, 38, 43, 44) İki molekülün oluşturduğu IHH/PTHrP geribesleme döngüsü kondrosit proliferasyonu ve hipertrofisinin ana regülatörüdür. PTHrP'den bağımsız olarak hipertrofik ve daha ileri farklılaşmayı arttıran IHH prehipertrofik kondrositlerden sentezlenir ve rezerv zonda PTHrP üretimini artırır. Artan PTHrP sinyali ise hücre döngüsünden çıkışı ve hipertrofik farklılaşmayı baskılamakta ve proliferasyonu

indüklemektedir. (38, 45-47) Yine PTHrP proliferasyonu destekler şekilde p57kip2 ekspresyonunu baskılamaktadır. (48) İleri farklılaşma artan PTHrP sebebi ile yavaşlayınca, azalmış prehipertrofik kondrositlerin IHH sentezindeki düşüşe bağlı olarak PTHrP seviyeleri resiprokal kontrol ile azalmaktadır ve proliferatif kondrositlerin ileri farklılaşmasına tekrar izin verilmektedir. (25, 44) Hücre siklusunu durdurup hacimsel artış fazına geçen prehipertrofik hücrelerin daha ileri farklılaşması ise SOX9, RunX2, Forkhead box A 2/3 (FOXA2/3) gibi faz spesifik transkripsiyon aktivitesine bağımlıdır. (27, 38) Bu fazda kondrositler hacimce 10-20 kat kadar büyümektedir ve Kollajen II sentezini destekleyen Col2a1 ekspresyonundan Kollajen X sentezleyen Col10a1 ekspresyonuna geçmektedir. (27, 49) Bu dönüşümün nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmese de SOX9'un faz spesifik ekspresyonel değişikliği ile yönetildiği düşünülmektedir. (27) Kondrosit hipertrofisi sırasında maturasyon için RUNX2 transkripsiyon faktörünün ana regülatörlerden biri olduğu ve buna takiben hedef gen Col10a1 ekspresyon düzenlenmesinin temel yürütücü olduğu düşünülmektedir. (50) Kondro-osseöz bileşkeye varan ve avasküler kondrositik matriks sentezini tamamlamış hipertrofik kondrosit bu aşamada ya apoptotik veya otofajik mekanizmalar ile programlanmış hücre ölümüne yönelmekte ya da osteoblastik ileri farklılaşmaya uğramaktadır. (51, 52) Bu kompleks süreçteki sinyal yollarının aktivitesi ve integrasyonu ise muhtemelen mTOR, Hippo ve GPCR-RTK sinyal yollarının kontrolü altındadır. (28) Hippo yolağının endokondral kemikleşme sürecine etkisi Bölüm 2.3.2'de ayrıca ele alınacağı için burada bahsedilmeyecektir.

2.2 Radyasyon İlişkili Büyüme Plağı Hasarı ve İyileşme Cevabı

2.2.1 Radyasyon İlişkili Büyüme Plağı Hasarının Histomorfolojisi ve Olası Patofizyolojik Mekanizmaları

Aktif büyüme plaklarının büyümesinin yavaşlaması veya durması çocukluk çağı radyoterapi uygulamalarının iyi bilinen bir komplikasyonudur. (4, 53-56) Radyoterapiye bağlı hasarın histolojik sonuçları nispeten daha iyi ortaya konulabilmiştir. Fakat radyoterapiye ikincil büyüme plağı arrestinin moleküler mekanizmaları, patofizyolojisi ve endokondral kemikleşme süreçlerindeki bozulmaların ne olduğu şu ana kadar net bir şekilde gösterilememiştir.

Büyüme plağının aktif hızlı bölünen hücreleri olan proliferatif kondrositlerinin epifizyal kondrositler dahil çevre diğer hücrelere göre daha selektif radyoduyarlı olduğu bilinmektedir. (8, 57-60) Bu sebeple radyoterapi sonrası büyüme plağındaki ilk değişiklikler proliferatif zonda baskın olmaktadır. Klinik pratikteki dozlar ile radyasyon maruziyeti sonrası ilk 24-48 saat içinde proliferatif kondrositlerde proliferatif aktivitenin belirgin azaldığı ve apoptozun geçici bir süre belirgin arttığı hem in vitro hem de in vivo deneyler ile gösterilmiştir. (7, 8, 15, 58, 61) Artan apoptoza ikincil olarak ilk 72 saatte sitotoksosite artışı ve hücre sayısında belirgin düşüş gözlenmektedir. (58) Erken dönemdeki proliferatif kondrositlerde artmış apoptoza ve hücresel kayba proliferatif zonun organize kolumnar yapının bozulması ve prematür terminal farklılaşmaya uğramış hipertrofik kondrositlerin rölatif artışı eşlik etmektedir. (8) Bu erken dönem bulgular genel olarak PTHrP/IIH sinyal aksı bozulmuş farelerde oluşan büyüme plağı hasarı ile benzer olarak bulunmuştur. (59, 62) Bu sebeple radyasyon ilişkili

hasara PTHrP'in seviyesinin azalması ve proliferatif kondrositlerdeki hücre siklus kontrolünün bozulmasının sebep olduğu öne sürülmüştür. (7, 8)

Radyoterapi ilişkili aşikar morfolojik bulgular ise birinci haftada gözlenmektedir. Işınlanmamış büyüme plakları ile karşılaştırıldığında proliferatif ve hipertrofik zon uzunluklarında azalma gözlenirken, özellikle hipertrofik zonda belirgin artmış matriks alan fraksiyonu saptanmaktadır. (13, 61) Büyüme plağı genel uzunluğunda ışınlanamamış büyüme plakları ile karşılaştırıldığında ilk 24 saatte matriks üretimindeki artışa ikincil geçici bir boyut artışı olsa da daha sonra geri dönüşümsüz olarak azalma gözlenmektedir. (6, 61) Radyoterapiye maruz kalan büyüme plaklarındaki total uzunluktaki azalmaya rağmen, terminal diferansiasyonun ve muhtemelen matriks alan fraksiyonunun artışı sebebi ile hipertrofik zonun total zon uzunluğundaki payı ise artış göstermektedir. (17)

İyonizan radyasyonun büyüme plaklarının matriksi üzerindeki etkisinin mekanizmaları henüz netleşmemiştir. Geçici bir süre ile ilk iki haftada hipertrofik zonda baskın, proliferatif zonu da içeren matriks alan fraksiyonu rölatif artmaktadır. (7, 10, 11) Net olmamakla beraber bunun üretim artışından çok matriks rezorbsiyonun azalması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. (17, 63) Ancak başka bir çalışmada rezorptif metalloproteinaz ve katepsin gibi enzimlerin genlerinde regülasyonun azalması ile birlikte ekstraselüler matriks sentezini uyaran genlerin regülasyonunun da arttığı saptanmıştır. (64) Muhtemelen hem üretimin artması hem de yıkımın azalması sebebi ile matriks alan fraksiyonu artış göstermektedir. İkinci haftadan sonra ise, daha önce baskılanmış olan kondroklastik rezorbsiyonun geri gelmesi ile özellikle hipertrofik zon matriks alan fraksiyonu normal büyüme plağı

seviyesine geri gelmektedir. (13, 63) Radyasyonun büyüme plağı ekstraselüler matriksine bir diğer etkisi Ca depolanmasındaki önemli miktardaki azalmadır. (60) Farklılaşmamış kondrositin radyasyon maruziyetine bağılı oluşan bu etki, kalsiyumdan fakir immatur matriks oluşumuna sebep olmaktadır. Radyasyonun maturasyon sürecindeki matriksin diğer önemli komponentleri olan kollajen ve proteoglikanlara etkisi ise henüz belirsizdir. İn vitro bir çalışmada radyasyon uygulaması sonrası ilk 96 saatte hem kollajen II mRNA hem de kollajen X mRNA ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre belirgin düşüş gerçekleşmiştir. (58) Fakat radyasyonun büyüme plağı ekstraselüler matriksin kollajen regülasyonuna in vivo etkileri literatürde ayrıca incelenmemiştir. Proteoglikan gibi ekstraselüler matriks proteinlerin sentezi üzerinde ise klinik uygulama dozlarında major bir etki saptanmamıştır. (8)

İyonizan radyoterapi sonrası zaman aralığı arttıkça progresif şekilde artan hücresel ve yapısal distorsiyon, kolumnar yapılaşmanın kaybı, matriks dejenerasyonu ve nekroz diğer gözlenebilen temel bulgulardır. (6, 13, 15, 63-65)

2.2.2 Büyüme Plaklarının Radyasyon Hasarı Sonrası İyileşme Cevabı

İyonizan radyasyonun büyüme plakları üzerindeki etkilerini inceleyen bazı in vivo çalışmalarda hem fraksiyone hem de fraksiyone olmayan radyasyon maruziyetinin ilk inhibitör etkilerinin geçici olduğı ve özellikle ilk haftadan sonra büyüme plaklarında hasarı onarmaya yönelik komplet olmasa da bir iyileşme cevabının başladığını gösteren veriler elde edilmiştir. (6, 7, 10, 13, 15-19, 61) Büyüme plaklarının büyüme hızı hücresel proliferasyonun, hipertrofik kondrosite

doğru matur farklılaşmanın, matriks sekresyon ve klerens hızının, hipertrofik hücre boyutu artışının beraber katkı sağladığı dinamik bir faktördür. (65, 66) Radyasyondan sonra büyüme plaklarındaki büyüme hızını değerlendiren çalışmalarda, ışınlanmış plaklarda ışınlanmamış plaklarla karşılaştırıldığında büyüme hızının en derin noktaya birinci haftada düştüğü, fakat sonrasında ikinci haftada artmaya başlayan büyüme hızının akselere olarak kontrol büyüme plaklarının büyüme hızını hemen hemen yakaladığı bildirilmiştir. (13, 15, 17) Büyüme hızındaki bu artış ile uyumlu olacak şekilde ikinci haftadan itibaren rejeneratif kondrosit klonlarının baskın duruma geçtiğini, proliferasyonun artmaya başladığı ve hacimsel olarak gittikçe artış gösterdiği gözlemlenmiştir. (7, 13, 15, 17) Fakat ışınlanmış plaklardaki büyüme hızındaki artış ilerleyen sürede de hep kontrol plaklarındakinden daha düşük seviyede kalmıştır ve artan rejeneratif kondrosit klonlarına rağmen eski kolumnar orjinal yapı tam olarak geri gelmemiştir. (6, 13)

Radyasyon hasarı sonrası gelişen büyüme hızındaki artışa zonal katkılar normal büyüme plağındaki zonal katkılardan daha farklıdır. (15) Horton ve ark. yaptığı çalışmada normal büyüme plağında büyüme hızına rölatif en büyük katkının hipertrofik hücre genişlemesi ve hipertrofik zon matriks sentezinden geldiği, ama ışınlanmış büyüme plaklarında büyüme hızının daha çok proliferatif hücre duplikasyonu ve proliferatif zon matriks üretimi tarafından belirlendiğini saptanmışlardır. (15) Ayrıca, proliferatif zondaki hacimsel klonal ve matriks üretimindeki artışa karşın, hipertrofik zonda hipertrofik hücrelerde yeterli genişlemenin olmadığı ve matriks sentezinin azaldığını gözlemlemişlerdir.

Yazarlar çalışmada buna sebep olabilecek moleküler yolları çalışmamış olsalar da proliferatif zondan hipertrofik zona terminal farklılaşmanın matur bir farklılaşma olmadığı ve uygun olmayan PTHrP/IHH sinyal aksı sebebi ile bozulmuş olabileceğini ifade etmişlerdir.

Büyüme plağında radyasyon hasarı sonrası onarıcı cevabın hangi moleküler mekanizmalarla başladığı ve yönlendirildiği ile bilgimiz ise oldukça kısıtlıdır. (7, 18, 19) Damron ve ark. immünohistokimyasal boyama metodu ile yaptıkları çalışmada PTHrP boyama indeksi birinci haftada tüm zonlarda en düşük seviyeye inerken iyileşme cevabının histolojik kanıtlarının var olduğu ikinci haftada tüm zonlarda kontrol plağa oranla belirgin şekilde artışa geçmiştir. (7) Üçüncü haftada ışınlanmış plaktaki PTHrP ekspresyonu kontrol grubuna kıyas ile diğer zonlarda benzer seviyelere gelirken rezerv zonda belirgin yüksek seviyelerde seyretmeye devam etmiştir. Kondrosit klonlarının baskın hale geldiği dönemde bir çok gen kümesinde ilk haftadan sonra upregülasyon olduğu belirlenmiştir. Genetik kodlanmadaki bu değişikliklerin mekanizmaları ve sinyal yolları net olarak ortaya çıkarılamamış olmakla birlikte, bu genetik değişim radyasyon sonrası iyileşme sürecini yönetiyor olabilir. Fraksiyone radyoterapi sonrası iyileşme sürecinin erken döneminde proliferatif ve hipertrofik zonda baskın olan bir gen değişimi saptanmıştır. (18) Benzer diğer bir çalışmada da büyüme plağı gelişim sürecinin parçaları olabilecek büyüme faktörü, sitokin ve bunların reseptör genlerinin değişimi incelenmiş olup, birinci haftada en büyük değişim yine proliferatif ve hipertrofik zonda saptanmıştır. (16) Aynı çalışmada birinci haftada büyüme faktörleri olan insülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2) ve bağ doku

büyüme faktörü'nün (CTGF) her iki zonda da belirgin upregüle oldukları bildirilmiştir. Takip eden bir haftada IGF2 upregülasyonu kaybolurken CTGF her iki zonda da upregüle kalmaya devam etmiştir. CTGF'nin hem ekstraselüler matrik kompozisyonunu düzenlemede hem de kondrogenik farklılaşmada olası önemli rolleri gösterildiğinden upregülasyonunun devamlılığı radyasyon hasarından iyileşme sürecinin önemli bir parçası olabilir. (67, 68) Pritchard ve ark. ise iyileşme sürecinin daha geç döneminde önemli olabilecek genetik ekspresyon düzey değişimlerini belirlemek için fraksiyone radyoterapi ile yaptıkları çalışmada geç dönemde apoptotik ve rejenerasyon süreçlerini, gelişimsel aşamaları, angiogenezi düzenleyen yolakların parçası olan Timp3, GPX1, Gas6, Notch2, VEGF, HIF-1 ve Eef1a1 gibi genlerin özellikle rezerv zonda belirgin değişim gösterdiğini saptamışlardır. (19) Rezerv zonun kondrositler için kök hücre rezervuarı olabileceği yönündeki kanıtlar düşünülünce, hasar sonrası tamir sürecinde önemli rol alıyor olması şaşırtıcı olmayacaktır. (69) Fakat bahsettiğimiz çalışmalarda ortaya konulan iyileşme sürecinin hem erken hem geç dönemi için değişimi saptanmış düzenleyici olabilecek gen upregülasyonları, iyonizan radyasyon ile büyümesi durmuş büyüme plağının iyileşme cevabında rol alabilecek ana sinyal yollarının ne olduğunu veya upregülasyonların bu yollara nasıl etki ettiklerini belirlemede şu an için oldukça yetersizdir ve iyileşme cevabının moleküler ve genetik mekanizmalarının aydınlatılması için ileri çalışmalar gerekmektedir.

2.3 Hippo-YAP/TAZ Sinyal Yolağı

2.3.1 Hippo Sinyal Yolağına Giriş

Hippo yolağıının tanımlanması 20. yüzyıl sonunda, *Drosophila*'da organ boyutunu kontrol eden Nükleer Dbf-2 ilişkili (NDR) kinaz ailesinden bir tümör baskılayıcı gen olan Warts(Wts) geninin fark edilmesi ile başlamıştır. (70, 71) Takip eden kısa sürede Hippo yolağıının Hippo(Hpo), Salvador (Sav), Mats, Yorkie (Yki) gibi diğer ana komponentleri ve benzer etkileri olduğu da bulunmuştur. (20, 72-78) Bu moleküller bir arada bir çekirdek kinaz kaskadı olarak görev yapmaktadır ve bir transkripsiyonel kompleksin aktivitesini düzenlemektedir. (20, 79) Yolağıın önemli komponentlerinin *Drosophila*'da gösterilmesini takiben bu moleküllerin homologlarının memelilerde de bulunduğu ve düzenleyici fonksiyonlarının memelilere kadar korunduğı saptanmıştır. (80-82)

Ana görevi hücre çoğalmasının ve organ boyutlarının kontrol edilmesi olsa da, son iki dekatta hızla artan veriler hippo yolağıı aktivitesinin embriyogenez, organ gelişimi, kök hücre farklılaşması, morfogenez, rejenerasyon, immünite, tümörögenez, fibrozis gibi vücutta bir çok fizyolojik ve patolojik hücrenel sürecin kritik bir parçası olduğunu kanıtlamıştır. (21, 22, 83-93) Bu sebeple Hippo yolağıının, bir çok farklı hücrenel kontrol sürecinin kooordinasyonunu ve etkileşimini düzenleyen yürütücü bir yolak olduğu düşünülmektedir. Özellikle gelişimsel ve farklılaşma sürecinde aldığı roller düşünüldüğünde rejeneratif süreçlerin de merkezinde olması şaşırtıcı değildir. Nitekim, hippo yolağıının beyin, kalp, akciğer, karaciğer, kemik gibi bir çok organın hasar sonrası rejenerasyon süreçlerinde kritik rol aldığı gösterilmiştir. (21, 22, 85) Ayrıca, hücrenel

fonksiyonları düzenlemede ana yollar olan Wnt/B-Catenin, Notch, GPCR, TGF- β gibi yolların aktivitesine de etki etmektedir. (79, 94-97)

Hippo kaskadını başlatan belirli tek bir moleküler komponent yoktur ve hücre polariteden, hücre adezyonlarından, hücre-hücre veya hücre-matriks temasından, ekstraselüler matriks yoğunluğundan, hücre içi iskelet yapısından, hücresel yoğunluk gibi faktörlerle aktive olan mekano-fiziksel ve hipoksi, nutrsiyonel yetersizlik veya enerji yetersizliği gibi faktörlerle aktive olan stres sinyalleri gibi intrinsik sinyallerden, inflamatuvar durumlardan, doku hasarından ya da G protein kenetli reseptörlerden (GPCRs) gelen ekstrinsik biyokimyasal sinyallerden etkilenebilmektedir. (20, 98)

2.3.2 Hippo Yolağının Drosophila ve Memelilerdeki Ana Komponentleri ve Çekirdek Kinaz Kaskadı

Hippo kinaz kaskadı Drosophila’da Hpo, Sav, Wts ve Mats ana komponentlerinden oluşmaktadır ve Yki’nin fosforilasyon düzeyini kontrol ederek transkripsiyonel aktivitesini düzenlemektedir. (20, 81) Çekirdek kaskadın memelilerdeki homologları ise Hpo için Ste20-benzeri kinaz 1 ve 2 (MST1/2), Sav için bir iskele proteini olan Salvador 1 (Sav1), Wts için geniş tümör baskılayıcı kinaz 1 ve 2 (LATS1/2), Mats için LATS1/2 nin iskele proteini olan MOB1A ve MOB1B’dir. Drosophila’da yolağın etki azaltıcı efektörü olan Yki’nin homologu ise Yes ilişkili protein (YAP veya YAP1) ve PDZ bağlayıcı motif ile transkripsiyonel ko-aktivator (TAZ veya WWTR1)’dür. (80)

YAP/TAZ moleküllerinin fosforilasyonu MST1/2 veya mitojen aktiviteli protein kinazlar (MAP4Ks) tarafından aktivitesi kontrol edilen LATS1/2 ile düzenlenmektedir. (20, 99-103) Fosforile olmuş YAP/TAZ sitoplazmada çoğunlukla 14.3.3 proteini ile sekestre olarak veya ubiquitinasyona ya da otofajiye maruz kalarak inaktive olmaktadır. (103-107) İnaktivasyon mekanizmaları ile nükleer geçişi azalan YAP/TAZ'ın transkripsiyonel aktivitesi kaybolmaktadır. (20, 79, 108) Hippo yolağı çekirdek kor komponentleri ve ana regülasyonu Şekil 2'de illüstre edilmiştir.

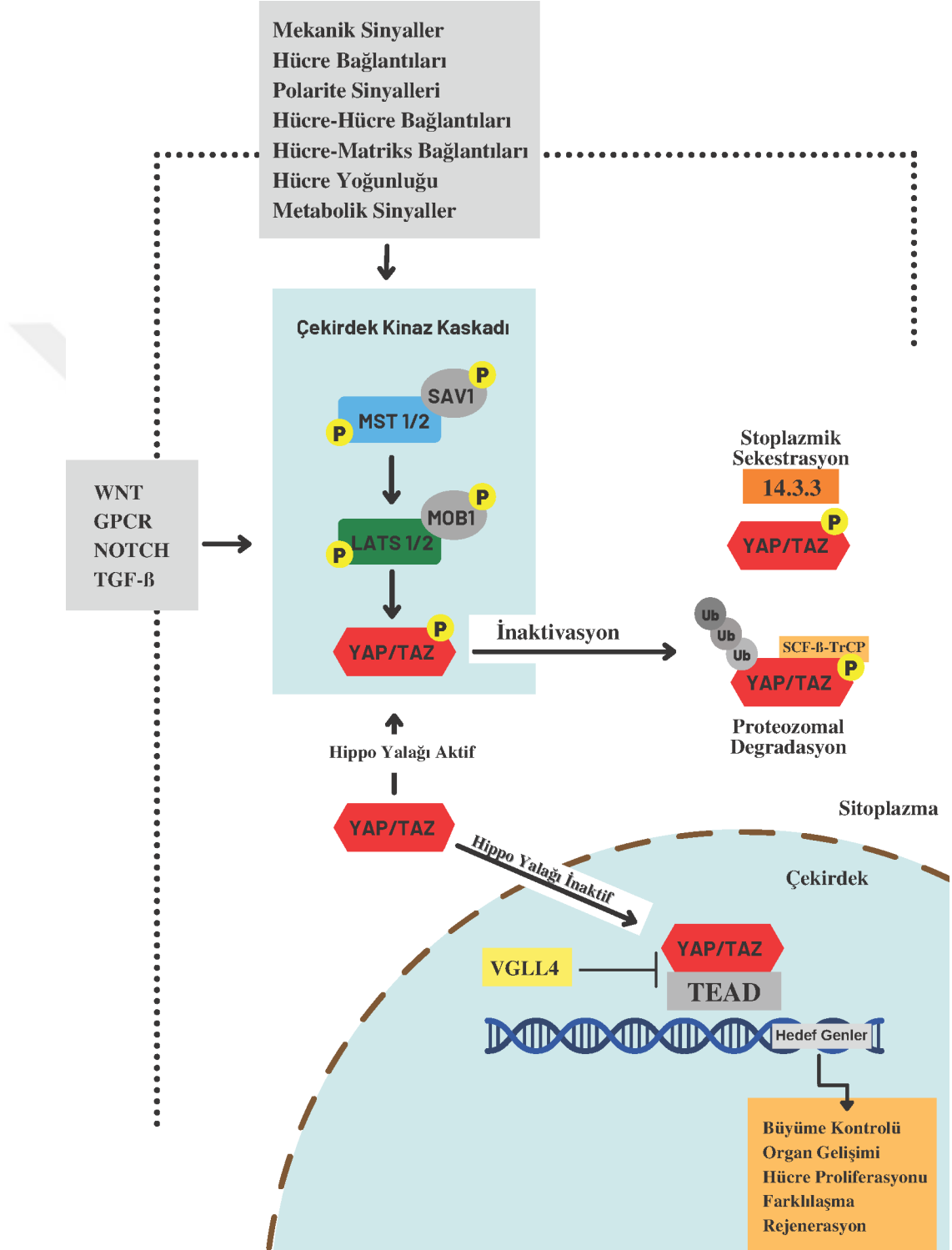
2.3.3 Hippo-YAP/TAZ Sinyal Yolağının Düzenleyicileri

Hippo yolağı genellikle spesifik ligandlarla aktive olan diğer ana yolaklardan farklı olarak çok çeşitli intrinsik ve ekstrinsik sinyal kaynaklı aktif olabilmektedir. (20)

Hippo yolağında aktivasyon yapan sinyallerin bir çoğu hücre proliferasyonu, büyüme ilişkili görevleri olan mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. (20, 79) Hippo yolağına sinyal girişi çok sayıda hücre içi ve hücre dışı farklı kaynak içermekte olup, oldukça kompleks bir etkileşim ağına sahiptir, burada sadece kısaca bahsedilmektedir.

Hücre polaritesinden ve adezyon bağlantılarından gelen girişler hippo yolağının bilinen en önemli sinyal kaynaklarıdır. Hücre bağlantılarının neurofibromin 2 (NF2 ya da Merlin), angiomin (AMOT), böbrek ve beyin protein

(KIBRA), zonula okludens, E-kaderin'in adaptör proteini α -katenin gibi önemli



Şekil 2. YAP/TAZ transkripsiyonel ko-aktivatörlerinin ana sinyal girdileri, etkileri ve Hippo kor kinaz kaskadı aracılığıyla sitoplazmik sekestrasyonunun ve nükleer aktivitesinin kontrolü

hücre içi üyeleri hippo yolağını bir çok ayrı basamaktan sinyal girişi yaparak regüle edebilmekte ve tümör baskılayıcı gibi etki gösterebilmektedirler. (109-115) Hücre polaritesi özellikle gelişimsel süreçlerin kritik bir düzenleyicisidir. (116) aPKC ve Crumbs gibi apiko-bazal hücre polaritesi girişleri de direkt hippo çekirdeği ile ilişki kurabilmektedir. (117, 118) Hücre adezyon bağlantıları ve polaritesi hücre yoğunluğu, kontakt inhibisyon gibi önemli bilgileri Hippo yoluna aktararak YAP/TAZ moleküllerinin hücresel konumunu ve buna bağlı transkripsiyon etkinliğini düzenleyebilmektedir. (103, 112, 113) Hücresel yoğunluğun artması sonucu hücre şeklindeki değişimler ve sıkı ve adherens bağlantı gibi hücre-hücre bağlantılarının Hippo ilişkili veya bağımsız etkileri ile YAP/TAZ'ın nükleer geçişi azaltılabilmekte ve kontakt inhibisyona sekonder hücre proliferasyonu yavaşlatılabilmektedir. (113, 119) Bu mekanizma aynı zamanda hücre yoğunluğunun az olduğu dış katmanlarda proliferasyonu ve migrasyonu destekler şekilde YAP/TAZ aktivitesine izin vermektedir. (120-122)

Ekstraselüler yoğunluk ve hücresel mimarinin regülasyonundaki mekanik güçlere duyarlı sinyal değişiklikleri de doku büyümesini ve hücre proliferasyonunu kısıtlamak için integrinler veya aktin molekülleri hippo yolağının aktivitesini module edebilmektedirler. (123-127) Yine besinsel eksiklik, enerji yetersizliği, ozmotik değişiklik veya hipoksi gibi hücrenin stres altında olduğu durumlarda da hippo yolağı hücre homeostazisinin uygun şekilde korunabilmesi için görev almaktadır. (128-132)

Hippo yolağı ayrıca bir çok diğer sinyal yolağı ile de karşılıklı iletişim halindedir. Özellikle gelişimsel süreçlerde, doku homeostazisinde, tümöröeneziste

oldukça önemli olan WNT/ β -Catenin yolağı ile bağlantısı ilgi çekmektedir. (79, 94, 133) Henüz fonksiyonel önemi net olarak bilinmese de, hippo yolağının aktivasyonu sonucu sitoplazmik düzeyi artan TAZ'ın β -Catenin'i fosforile etmesi ya da artan YAP/TAZ miktarı ile β -Catenin ile fiziksel olarak bağlanıp degradasyona uğrayan bir yıkım kompleksi oluşturulması ile WNT/ β -Catenin yolağının nükleer aktivitesinin hippo aracılı olarak azaltıldığı gösterilmiştir. (134, 135) İki yolak arasındaki bağlantı bir çok dokunun gelişimsel ve rejenerasyon sürecini önemli düzeyde etkiliyor olabilir.

Hormonlar gibi bir çok hücre dışı biyokimyasal molekülün hücre reseptörü olan GPCR'da etkisi G protein tipine göre değişmekle beraber kinaz aktivitelerini değiştirerek hippo yolağına sinyal girişi sağlamaktadır. (95, 136, 137) Bu yoldan yapılan düzenlemeler hormon, büyüme faktörü gibi hücre dışı sinyallerin hippo yolağına aktarılması için temel yoldur ama fonksiyonel etkileri henüz tam aydınlatılamamıştır. (98)

Hippo-YAP/TAZ sinyal yolağının NOTCH ve TGF- β ailesi sinyal yolları ile etkileşiminin de var olduğu bilinmektedir ve bu süreçlerin organogenez, farklılaşma, hücre büyümesi gibi önemli biyolojik süreçlerdeki etkisini düzenliyor olabileceği düşünülmektedir. (79, 138, 139)

2.3.4 YAP/TAZ Transkripsiyonel Aktiviteleri

YAP ve onun daha küçük homologu olan TAZ birer transkripsiyon faktörleridirler. (140, 141) Fosforilasyon durumuna göre sitoplazma ve çekirdek

arasında yer deşiştirmektedirler. Ana düzenleyici olan hippo yolağına dahil LATS1/2 veya daha nadiren hippo yolağı bağımsız işleyen diğer kinazlar aktif olmadığında defosforile YAP/TAZ gen ekspresyonunu yürütmek için nükleusta akumule olmaktadır. Fakat YAP ve TAZ transkripsiyon faktörleri olmasına rağmen DNA ile direkt bağlanarak gen ekspresyonunu d zenleyememektedir. Başka bir transkripsiyon faktörüne bağlanan ko-aktivator olarak görev yapmaktadırlar. Hedef gen transkripsiyonunu sıklıkla TEAD ailesinin transkripsiyon faktörlerine (TEAD 1-4) bağlanarak aktive etmektedirler. (142) Ayrıca RUNX1/2, p73, ERBB4, EGR-1, SMADs, PAX3, TBX5 gibi diğer transkripsiyon faktörlerine de bağlanabilmektedirler. (140, 143, 144) YAP/TAZ'ın nükleus içi aktivitesi ise VGLL4 gibi TEAD'a bağlanan moleküller ile kısıtlanmaktadır. (145-147) Bu kompleks faktörler bir arada doku-hücre spesifik YAP/TAZ aktivite düzeyini belirlemektedir. (140)

YAP/TAZ'ın doku, organ boyutunun düzenlenmesinde esansiyel bir rolü olsa da, bunun haricinde gelişimsel süreçlerin, doku ve organ rejenerasyonun, hücre migrasyonunun, hücre proliferasyonun ve yaşam döngüsünün, farklılaşma süreçlerinin, hücre yapısal süreçlerin ve homeostazisinin de önemli bir düzenleyicisidir ve disreg lasyonunda kanser başta olmak üzere patolojik süreçler de gelişmektedir. (98)

2.3.4.1 YAP/TAZ Aracılı Büyüme ve Gelişim Süreçlerinin Kontrolü

YAP ve TAZ'ın en iyi ortaya konulmuş aktivitesi büyümenin kontrolü ve gelişimdir. (93) YAP/TAZ'ın embriyogenez sırasında aşırı aktif olduğu durumlarda kalp, karaciğer gibi organların normalden daha büyük olduğu rat çalışmalarında gözlenmiştir. (85) Bununla birlikte uygun gelişim için de yeterli miktarda aktif olmaları gerekmektedir. YAP ve TAZ gen ifadesinin birlikte durdulmuş farelerde embriyonik gelişimin tamamlanamadığı gösterilmiştir. (122) Yine YAP'ın tekli delesyonu kalp hipoplazisi, böbrek hipoplazisi, vasküler yetersizlik ve embriyonel dönemde lethality ile sonuçlanmaktadır. (148) TAZ'ın tekli delesyonunun etkisi daha sınırlı olsa da akciğer ve böbrek gelişimi bozulmaktadır. (149, 150) Her iki faktör bir arada düşünüldüğünde gerek organ boyutunun gerekse organ fonksiyonunun uygunluğu için doku spesifik dengeli bir YAP/TAZ aktivitesi elzem görülmektedir.

2.3.4.2 YAP/TAZ Aracılı Hücre Bölünmesinin ve Hücre Yaşam Döngüsünün Kontrolü

DNA replikasyonu, hücre büyümesi, mitoz ve DNA tamirinin komponentleri YAP/TAZ aktivitesinden önemli düzeyde etkilenmektedir. (85) Apoptotik süreçlerin inhibisyonunu yapan Bcl-2, survivin gibi moleküller YAP/TAZ aktivitesi ile upregülasyona uğramaktadır. (85, 151) Bu etkileri ile YAP/TAZ hücre proliferasyonunu uyarırken, apoptozu engelleyerek hücre yaşam ömrünü uzatmaktadır.

2.3.4.3 Hücre Farklılaşma Süreçlerinde YAP/TAZ Aktivitesi

YAP/TAZ aktivitesinin hücre farklılaşması süreçlerinin üzerinde yaygın bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Fakat etkileri henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Akciğer, gastrointestinal trakt, karaciğer, böbrek, sinir sistemi, damar, kalp, bez hücrelerinin farklılaşması üzerinde etkili olduğunu gösterilmiştir. (21, 85, 87, 109, 149, 150, 152-155) Bazı çalışmalarda multipotent kök hücre farklılaşması sırasındaki yüksek YAP düzeylerinin farklılaşmanın çeşitliliğini sürdürdüğü, bununla birlikte farklılaşmanı ileri aşamalarında YAP aktivitesinin farklılaşmayı tamamlamak için azaldığı gösterilmiştir. (156)

2.3.4.4 Rejenerasyon Süreçlerinde YAP/TAZ Aktivitesi

Hücre proliferasyonunun ve farklılaşmasının kontrolündeki önemli rolleri hippo yolağını rejenerasyon süreçlerinin de merkezine koymaktadır. Hasar veya doku kaybı sonrası, hippo yolağının kinaz kapasitesinin azalması YAP/TAZ transkripsiyonel aktivitesini arttırmakta ve proliferatif, mitojenik ve farklılaşma süreçlerinin gen ekspresyonunu arttırmaktadır. (85) Yetişkin dönem organların bir çoğu için hasar sonrası rejenerasyon çok kısıtlı kalmakta iken, ektopik YAP/TAZ verilmiş farelerde kalp, bağırsak, deri, karaciğer rejenerasyon kapasitesinin arttığı gösterilmiştir. (157, 158) Tamir süreçlerinin ve rejenerasyonun YAP aktivitesi ile indüklenebiliyor olması henüz veriler oldukça az olmasına rağmen hasar görmüş

bir çok farklı organ ve doku için bu yolun müdahalesi ile rejenerasyonun sağlanabileceğini düşündürmektedir.

2.3.4.5 YAP/TAZ Aktivitesinin Patolojik Süreçlerdeki Olası Roller

Normal gelişim süreçlerindeki ve hücre homeostazindeki rolleri YAP/TAZ yolunun disregülasyonunda bir çok patolojik sürecin gelişmesini de açıklamaktadır. Özellikle apoptoz ve proliferasyondaki kontrolü sebebi ile kanser gelişimi ve progresyonunda oldukça etkili görünmektedir. Bir çok kanser hücre dizisinde YAP/TAZ aktivitesinin artması ile yaşam döngüsünün hızlandığı, metastazın arttığı ve hatta tedaviye direnç geliştiği görülmektedir. (92, 159, 160)

2.3.5 Hippo-YAP/TAZ Sinyal Yolağının Büyüme Plağının Endokondral Gelişimindeki ve Hasar Sonrası Büyüme Plağı Tamir Yanıtındaki Aktivitesi

Hippo yolağının iskelet gelişimindeki etkileri oldukça kısıtlı çalışmada incelenmiştir. Şu ana kadarki bulgular YAP ve TAZ'ın endokondral süreçlerdeki belirgin rolü olduğunu desteklese de moleküler ve fonksiyonel sonuçları açısından gelişkilidir.

Hippo yolağının kök hücrelerinin farklılaşmasındaki rolleri düşünüldüğünde, mezenkimal hücre kondensasyonu ile başlayan endokondral kemikleşme sürecini progenitör hücre aşamasında etkiliyor olması şaşırtıcı olmamaktadır. YAP'ın β -Catenin sinyalini düzenleyerek mezenimal progenitör

hücrelerin adipogenik farklılaşmasını inhibe edip, osteogenik farklılaşmasını aktive ettiği rapor edilmiştir. (161, 162) Başka çalışmalarda ise YAP1'in osteogenik farklılaşmayı azalttığı, yüksek TAZ seviyelerinin ise osteogenik farklılaşmayı arttırdığı gösterilmiştir. (163-166) Her ne kadar YAP ve TAZ'ın etkinliği kritik olsa da muhtemelen Hippo bağımsız YAP ve TAZ ilişkileri bu süreçleri daha komplike hale getirmektedir ve etkilerinin net olarak belirlenebilmesi için ileri çalışmalar gerektirmektedir. (167, 168)

Büyüme plağındaki ileri farklılaşma sürecinde Hippo yolağı aktivitesi ise faz spesifik olarak değişkenlik gösteriyor gibi durmaktadır. Hippo yolağının ana kinazları olan LATS1/2 ve MST1/2 düzeylerinin maturasyon ilerledikçe arttığı gösterilmiştir. (169) Başka bir çalışmada ise büyüme plağında kondrositler hipertrofik maturasyona ilerlerken YAP1 düzeyinin Hippo yolağı aktivitesinin artmasına ikincil belirgin azaldığı ispatlanmıştır. (22) Deng ve ark. yaptığı bu çalışmada kondrositik progenitör hücrelerde YAP1 aktivitesinin proliferasyonu indükler şekilde aktif olduğunu göstermektedir. Yine proliferatif kondrositlerde YAP1'in transkripsiyon aktivitesinin yüksek olduğu ve SOX6 geninin regülasyonunu arttırdığı saptamışlardır. Proliferatif kondrositlerin aksine hipertrofik kondrositlerde ise YAP1 düzeylerinin azaldığını ve eş zamanlı olarak maturasyonu indükleyen RUNX2 ve Col10a1 regülasyonun arttığını, aksine YAP1 ekspresyonunun arttığı transengenik farelerde ise matur hipertrofik kondrositlerin ana düzenleyici genleri olan Aggrekan ve Col10a1 regülasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. (22) Hepsi bir arada değerlendirildiğinde YAP1 ekspresyonu artmış farelerde ilk proliferasyonun ve farklılaşmanın indüklenmesine rağmen, uygun

maturasyonun sağlanamaması nedeni ile histolojik değerlendirmede büyüme plağının boyutunun küçük kaldığı, hipertrofik zonda mineralizasyonun bozulduğu ve endokondral kemikleşmenin gerçekleşmediği gözlenmiştir. Bu sebeple artan YAP1 düzeylerinin endokondral kemikleşmeyi engellediğini ifade etmişlerdir. Vanyai ve ark. ise in vivo ortamda büyüme plaklarındaki histolojik incelemede, Ki67 boyama ile yapılan incelemede YAP artışının in vitro proliferasyonu arttırmasına rağmen in vivo ortamda proliferasyon artışına sebep olduğunun gösterilemediğine, fakat ekstraselüler matriks sentezinin belirgin azaldığını ve buna ikincil hücre yoğunluğunun arttığına dikkat çekmişlerdir. (170) İleri aşamalarda ise farklılaşmanın YAP/TAZ bağımsız da ilerlediğini fakat ekstraselüler matriks yoğunluğunun metalloproteaz enzimlerinin regülasyonun azalmasına ikincil artıyor olabileceğini açıklamışlardır.

YAP ve TAZ mekanik girdilerin transkripsiyonel dönüşümünde ana regülatörlerden biridir. (171, 172) Zhong ve ark. da yaptıkları çalışmada ekstraselüler matriks yoğunluğunun YAP'ın nükleer ve transkripsiyonel aktivitesini arttırdığını ve kondrositik fenotipi belirlediğini göstermişlerdir. (173) Ekstraselüler matriksin mekanik sinyalleri kök hücrelerin farklılaşma kaderini de etkilemektedir. Bir çalışmada iskelet sistemi mezenkimal multipotent kök hücrelerinde artan nükleer YAP/TAZ aktivitesinin hücrelerin kondrogenik ve adipogenik farklılaşmasını engellerken osteogenik farklılaşmaya yönelttiğini göstermiştir. (174) Başka bir çalışmada da önceki çalışmanın sonuçlarıyla benzer şekilde, artan YAP/TAZ aktivitesinin osteogenik ve fibrokondrogenik farklılaşmayı arttırdığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir. (175) Kardiyak ve renal

hasar süreçlerinde ekstraselüler matriks yoğunluğundaki değişimlerin YAP/TAZ aracılı yanıtlar oluşturduğu ve bu moleküllerin modülasyonunun maladaptif yanıt ilişkili hasarın nihai boyutunu önemli oranda azalttığı ortaya konulmuştur. (176-178) Endokondral tamir sürecinde YAP'ın olası maladaptif etkisi ise bir çalışmada değerlendirilmiştir. Deng ve ark. yaptığı bu çalışmada, Yap1^{tg/+} farelerde fraktür sonrası tamir bölgesinde YAP1 aşırı ekspresyonuna eşlik eden bozulmuş, daha az mature kallus formasyonu gözlemlemişlerdir. (22) Matriksten gelen mekanik girdilerin homeostasiste önemli rol oynadığı büyüme plağında, hasar ve hasara yanıt süreçlerinde bu mekanizmaların etkileri ise henüz bilinmemektedir.

Çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde henüz net bulgular elde edilememiş olsa da YAP ve TAZ'ın ayrı ayrı faz spesifik aktivitelerinin var olduğu ve büyüme plağında erken proliferasyonu arttırırken ileri hücresel farklılaşmayı inhibe ettiği ve ekstraselüler matriksin maturasyonunu da bozduğu söylenebilir. (22, 179) Yüksek sürekli YAP1 aktivitesi hasar sonrası endokondral matur kemikleşmeyi azaltmakta ve tamir sürecini inhibe etmektedir. Hasar süreçlerine yanıtındaki erken kök hücre farklılaşmasına etkisi ise bilinmemektedir. Bulgular açık bir şekilde endokondral gelişimde ve tamir süreçlerinde YAP/TAZ aktivitesinin etkin ve anahtar bir düzenleyici olabileceğini desteklemektedir. (22)

2.4 Çalışmanın Amacı

Hippo-YAP/TAZ yolağının rejenerasyon ve gelişimsel süreçlerdeki rolünün endokondral kemikleşme süreci özelinde de işlemekte olduğu

gösterilmiştir. Büyüme plağı hasarı sonrası bir iyileşme yanıtı gelişmekte fakat postnatal dönemde bu cevabın etkinliği sınırlı olmaktadır. İyonizan radyasyona maruz kalmış büyüme plağında da akut dönemde ilk etki olarak büyüme plağında büyümenin durması gözleniyor olsa da hemen bunu takip eden bir endokondral iyileşme cevabının oluştuğunun kanıtları mevcuttur. Fakat bu iyileşme sürecinin yönetici mekanizmaları ve cevabın neden tam olmadığı henüz bilinmemektedir. Hippo-YAP/TAZ yolağının endokondral rejenerasyonda aldığı kritik roller iyonizan hasar sonrası gelişen rejenerasyon sürecinin de merkezinde olabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda radyasyon hasarı sonrası büyüme plaklarında gelişen iyileşme cevabında genetik düzenlemeleri yapıyor olabilecek Hippo-YAP/TAZ sinyal yolağının rolü in vivo olarak araştırılacaktır. Çalışmamız, iyileşme cevabının farklı fazlarındaki Hippo-YAP/TAZ etkinliğini ortaya koymayı ve bu yolağın modülasyonun iyileşme cevabında oluşturacağı potansiyel değişiklikleri irdelemeyi amaçlamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Protokolü

3.1.1 Etik Kurul Onayı ve Deney Hayvanlarının Temini

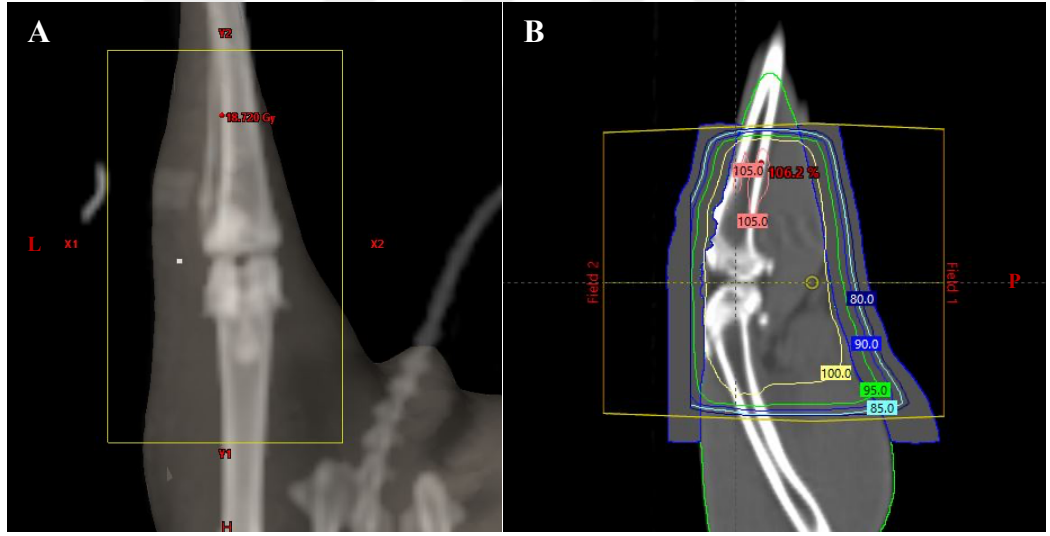
Çalışmamız için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan G.Ü.ET-20.043 kodlu etik kurul onayı alınmıştır. (EK 1) Çalışmada 36 adet Yeni Zelanda Irkı, yaklaşık 8 haftalık ve 1.500-2.000 gram ağırlığında tavşan kullanılmıştır. Tavşanlar Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve

Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Araştırma süreci ve bu süreçte deney hayvanlarının bakımı Gazi Üniversitesi GÜDAM – Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde yürütülmüştür. Tüm tavşanlar deney sürecince, 12 saatlik karanlık-aydınlık döngüsü sağlanan, 22 ± 2 C ısı ve 50 ± 5 nem oranına sahip ortamda barındırılmışlardır. Tavşanların su ve pelet yem ihtiyaçları ad-libitum olarak sağlanmıştır.

3.1.2 Radyoterapi Planlama ve Uygulama Süreci

Radyoterapi planlama ve uygulama sürecinde tavşanlara kas içi 45 mg/kg ketamine ve 5 mg/kg ksilazin anestetik ajan uygulanarak genel anestezi sağlanmıştır. Anestezi altına alınan tavşanlar prone pozisyonda, vakumlu yatak yardımı ile sabitlenmiştir. Tavşanlara kliniğimizde bulunan Siemens Somatom Sensation Open Bilgisayarlı Tomografi cihazı ile üç boyutlu radyoterapi planlama için 1.5 mm kesit aralığı ile simülasyon tomografisi çekilmiştir. Radyoterapi tedavi hacmini kontrol etmek ve tedavi planlaması için görüntüler Eclipse 15.6 Tedavi Planlama Sistemi'ne aktarılmıştır. Tavşanların sol distal femur ve proksimal tibial epifizyal büyüme plaklarını içerecek şekilde tedavi hacmi belirlenmiştir. Hedef hacimde reçete edilen dozun sağlanması ve yüzey doz dağılımını optimize etmek için 1 cm doku eşdeğeri bolus kullanılmıştır. Paralel karşıt iki alan ile 6 MV X ışını kullanılarak kaynak merkez mesafesi 100 cm (SAD 100 cm) olacak şekilde 3 Boyutlu Konformal Radyoterapi (3BKRT) Planlama ile tedavi planlama yapılmıştır. Büyüme plaklarına 3.5 Gy fraksiyon dozu ile birbirini takip eden

günlerde uygulanmak üzere 5 günde toplam 17.5 Gy radyoterapi dozu reçete edilmiştir. Tavşanların sağ alt ekstremiteleri ve diğer normal dokuları radyasyon maruziyetini önlemek için alan dışında bırakılmıştır. Radyoterapi tedavi alanları ve doz dağılımı Şekil 3 'te gösterilmiştir. Tavşanlar radyasyonun uygulanması için kliniğimizde bulunan Varian Clinac DHX lineer akseleratör radyoterapi uygulama cihazına aktarılmışlardır. Planlama tomografisinde immobilize edildikleri şekilde tekrar immobilize edilen tavşanlara 5 gün foton ışını ile radyoterapi uygulanmıştır.



Şekil 3. Radyoterapi tedavi alanı (A) ve doz dağılımları (B)

3.1.3 Deney Grupları

Deneye dahil edilen toplam 36 adet tavşan takip sürelerine göre farklılık gösteren her biri 6 tavşandan oluşan 6 gruba bölünmüştür. Radyoterapinin son gününden başlamak üzere takip süreleri her bir grup için sırasıyla 1. (24. Saat), 7., 10., 14., 17., 21. gündür. (Tablo 1) Tüm gruplardaki tavşanların sol taraf distal femur ve proksimal tibial büyüme plaklarına toplam 17.5 Gy radyoterapi uygulanmıştır ve sağ taraf aynı büyüme plakları radyoterapi uygulanmayan kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. Deney grupları

Grup	Radyoterapi Süresi (gün)	Takip Süresi (gün)	Toplam Deney Süresi (gün)
Grup 1	5	1	6
Grup 2	5	7	12
Grup 3	5	10	15
Grup 4	5	14	19
Grup 5	5	17	22
Grup 6	5	21	26

3.2 Sakrifikasyon

Belirlenen takip süresini tamamlayan tavşanlara kulak veninden ksilazin verilerek oluşturulan derin anestezi ile ötenazi yapılmıştır. Tavşanın exitus olduğu gözlemlendikten sonra sol alt ekstremitte ve sağ alt ekstremitte distal femur ve proksimal tibial büyüme plakları uygun şekilde eksize edilmiştir. İmmünohistokimyasal incelemeler için eksize edilen materyaller hızlıca formaldehite alınmıştır.

3.3 Histomorfolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemeler

Elde edilen dokular en az 72 saat süresince % 10' luk formaldehit çözeltisinde tespit edilmiştir. Sonrasında doku örnekleri dekalsifikasyon amaçlı uygun solüsyona alınarak bekletilmiştir. Dekalsifikasyonun sağlanmasının ardından tüm dokular kasetlere konularak akarsu altında yıkanmıştır. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan alkol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %100) geçirilmiştir. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirilip ardından erimiş parafine gömülmüştür. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 4 µm kalınlığındaki kesitlere tüm örnekler için Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması ve PTHrP, YAP ve TAZ için immunohistokimyasal işaretlemleri yapılmıştır. Tüm deney grupları kemik dokusu bloklarından lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sağlandıktan sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate (%100, %96, %80, %70) edilmiştir. Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 1'er dakika distile sudan geçirilmiştir. Antiijen maskesini kaldırmak için 1/10 dilue EDTA tamponu uygulanmıştır. Distile su ile yıkama aşamasından sonra 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmiştir. 2 saat nemli ortamda asıl antikor (primary antibody) inkübe edilip, 30 dakika bekletilmiştir. HRP Polymer Quanto da 30 dakika bekletilmiştir. Her aşamada PBS ile dikkatle yıkama yapılmıştır. Pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıp, Harris Hematoksilen'de 30 saniye boyanılmış ve 2x1 dakika akar suda yıkanmıştır. %1 amonyak-su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda yıkanmıştır. Boyanan

camlar artan alkol serilerinden geçirilerek suyu alındıktan sonra 5 dakika seffaflaştırmak için ksilolde bekletilmiştir. Ardından entellan ile kapatılmıştır. Elde edilen örnekler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde ışık mikroskopi ile incelenerek, Leica - Qwin programında resimleri çekilerek değerlendirilmiştir.

3.4 İstatistik

PTHrP, YAP ve TAZ için 100er hücre sayılıp nükleer boyanan hücre sayıları kaydedilmiştir. Kayıtlar istatistiksel incelemeler için ticari olarak satılan bir istatistiksel yazılım paketi olan SPSS (IBM Corp, Statistic for Windows, Version 23.0, Armonk, NY) programına aktarılmıştır. Her bir ayrı molekül için 1. gün (1. Grup) kontrol grubunun boyanan hücre sayısı değeri 1 (bir) kabul edilerek diğer gruplardaki değerler katsal değişim ifade şekline dönüştürülmüştür. Daha sonra değerler parametrik olmayan çoklu bağımlı değerlendirme testi Friedman ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki ikili farklılıklar Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi ile analiz edilmiştir. Gözlem süresince moleküllerin ekspresyonel değişiklikleri arasındaki uyumu değerlendirmek için Spierman Korelasyon Testi uygulanmıştır. Testler %95 güven aralığında uygulanmıştır ve $p = .05$ istatistiksel anlamlılık değeri olarak kabul edilmiştir.

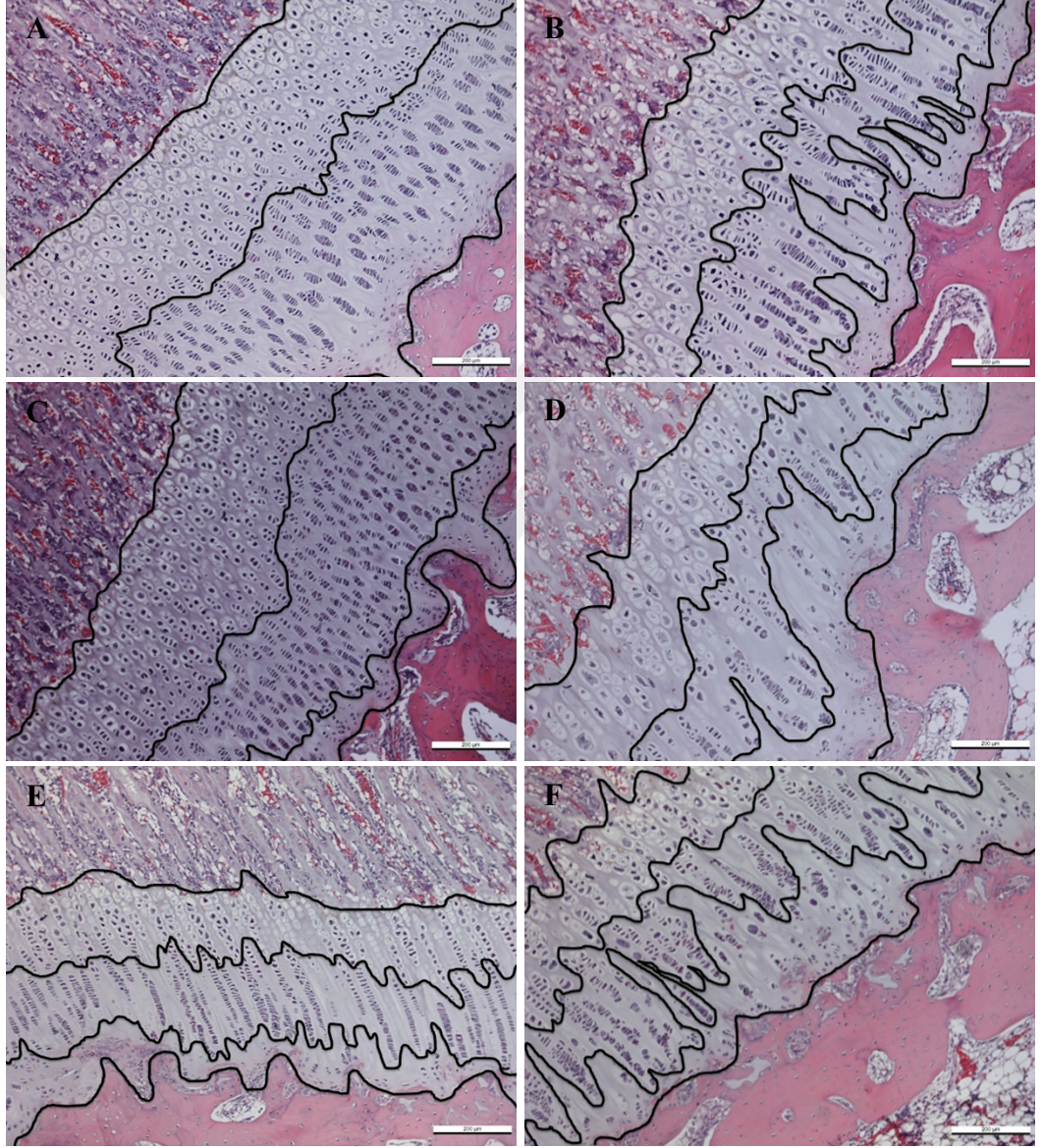
4. BULGULAR

4.1 Histomorfolojik Bulgular

Hematoksilen eozin ile yapılan genel histomorfolojik incelemede, fraksiyone radyoterapi sonrası 24. saatte kontrol grubuna kıyasla radyoterapi uygulanmış büyüme plaklarında zonal histomorfolojik değişim minimal düzeydedir. (Şekil 4 A - B) Proliferatif ve hipertrofik zon alanlarında artmış apoptoz gözlenen temel bulgudur. Yapısal değişiklik ilk olarak proliferatif zonda gerçekleşmiştir ve proliferatif zonun normal kolumnar yapısının bozulmaya başladığı izlenmiştir. (Şekil 4 B) Bu günde kontrol grubuna kıyasla toplam büyüme plağı uzunluğu deney grubunda artmıştır. Bununla birlikte takip eden günlerde RT uygulanmış büyüme plaklarının uzunluğu normal büyüme plaklarına göre geri dönüşümsüz olarak azalmıştır. İlk dönemdeki geçici boyut artışının ekstraselüler matriks üretimindeki rölatif artışa bağlı olduğu düşünülmüştür.

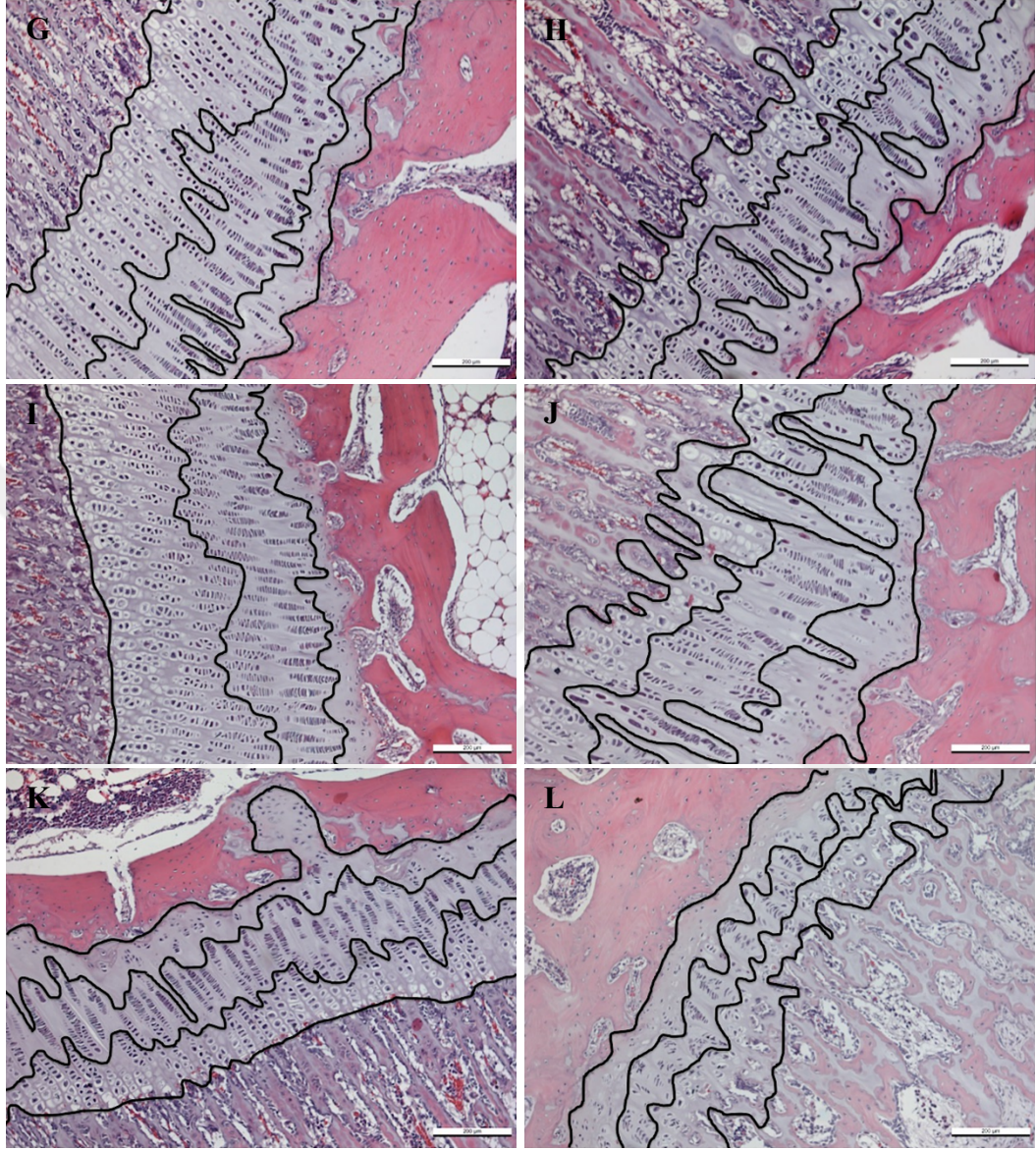
Radyoterapi sonrası 1. haftada histomorfolojik bulgular belirginleşmeye başlamıştır. (Şekil 4 C – D) Kondrositlerin proliferatif aktivitesinin sol taraf büyüme plaklarında belirgin azaldığı gözlenmiştir. Radyoterapi ikincil apoptozun ilk güne kıyasla daha da artışı proliferatif azalmaya eşlik etmektedir. Hipertrofik ve proliferatif zon uzunlukları kontrol grubuna göre azalmıştır. Bununla birlikte matriks alan fraksiyonunun ise rölatif artışı saptanmıştır. Aynı zonlarda hücrel yapısal değişiklikler ve nekroz bulguları ortaya çıkmıştır. Bu etkilerin takip eden günlerde progresif bir şekilde arttığı ve yaygınlaştığı tespit edilmiştir. Bu dönemdeki büyüme plaklarında artmış lizozom miktarına ikincil olduğu düşünülen, diğer kondrositlere göre daha eizonofilik sitoplazmalara sahip yer yer laküner

yapılar gösteren hücreler saptanmıştır. (Şekil 5 A ve C) Bu hücrelerin miktarı 5. gruba doğru artış göstermektedir.



Şekil 4. Hematoksilen Eozin (H/E) boyamalara ait görüntüler. Gözlenebilen zonal ayrımlar siyah çizgi ile konturlanmıştır.

Diğer sayfada devam etmektedir...



Şekil 4. (Devamı) Hematoksilen Eozin (H/E) boyamalara ait görüntüler. Gözlenebilen zonal ayrımlar siyah çizgi ile konturlanmıştır. (Bar 200 μ m)

A ve B : 1. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

C ve D : 7. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

E ve F : 10. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

G ve H : 14. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

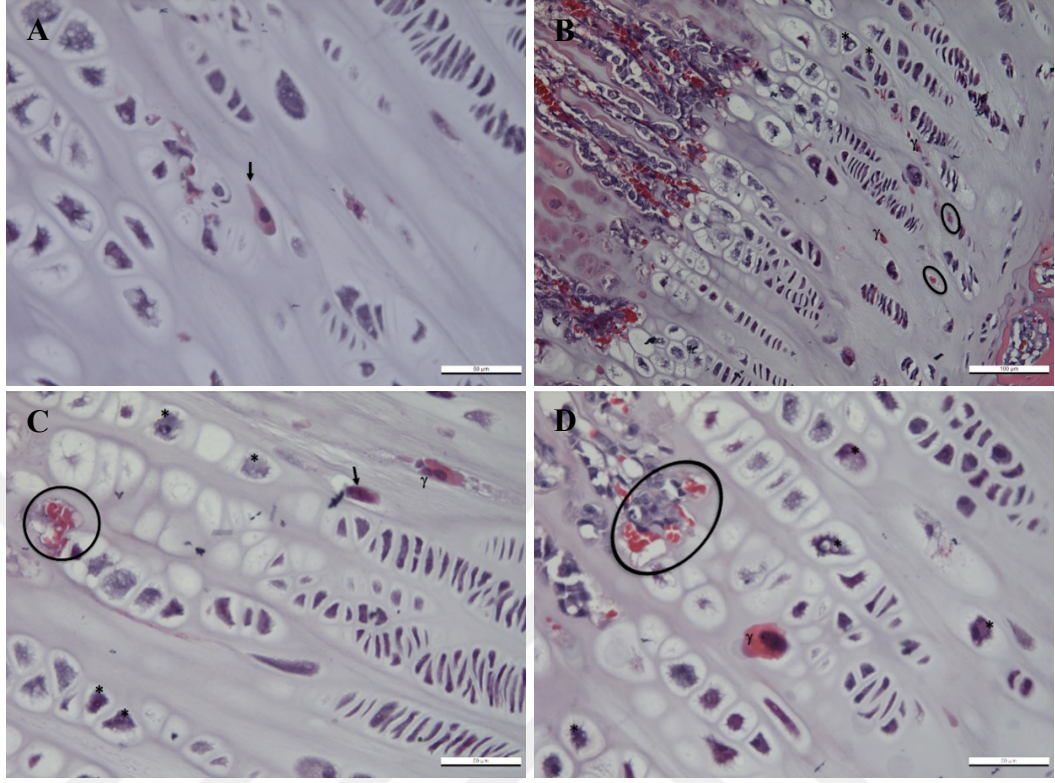
I ve J : 17. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

K ve L : 21. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

Radyoterapi sonrası 7. ve 10. günde belirgin artış göstermiş olan hipertrofik zon matriks alan fraksiyonu 14. günde normal büyüme plağı seviyesine gerilemiştir. (Şekil 4) Buna eşlik eden kondroklastik hücre sayısındaki artış dikkati çekmektedir. (Şekil 5 B ve C) Yüksek lizozomal içerikli hücrelerin artışıyla beraber kondroklastik hücrelerin ortaya çıkması matriks yıkımının arttığına ve buna ikincil matriks alan fraksiyonunun azaldığına işaret etmektedir.

İyileşme yanıtının bir göstergesi olan rejeneratif kondrosit kolonileri 10. günden itibaren artmaya başlamıştır ve 14. günde en belirgin artışı göstermiştir. Buna ikincil proliferasyon hızı ve hacimsel artış önceki gruplara göre 4. grupta artış göstermekle beraber kontrol grubuna kıyasla sürekli olarak daha düşük seviyede kalmıştır.

On yedinci ve takip eden 21. günde rezorbisyon zonundaki uzunluk ve matriks dejenerasyonu maksimum seviyeye çıkmıştır. (Şekil 4) Lipid birikimine sekonder olduğu düşünülen, vakuolizasyon izlenen sitoplazmaya sahip kondrositlerde artış tespit edilmiştir. (Şekil 5 D) Altıncı grupta osteogenezise geçişin bir bulgusu olan vasküler invazyona ait kapiller oluşumlardaki artış belirginleşmiştir. (Şekil 5 C ve D) Aynı dönemde büyüme plağındaki kemik doku/kıkırdak doku oranında belirgin artış saptanmıştır. Kondrosit selüleritesi önemli oranda azalmış, hücresel ve yapısal distorsiyona eşlik eden nekroz major bulgu haline gelmiştir.



Şekil 5. Hematoksilen Eozin (H/E) boyamada gözlenen patolojik histomorfolojik bulguların temsili örnekleri. ↓ **işareti** : Artmış eizonofilik sitoplazmalara sahip kondrositler, **γ işareti** : Kondroklast olduğu düşünülen çok çekirdekli dev hücreler, **O işareti** : Kapillerizasyonun belirgin izlendiği alanlar, *** işareti** : Lipid içerikli vakuollere sahip kondrositler

A : 7. gün, RT grubu (Bar 50 µm)

B : 14. gün, RT grubu (Bar 50 µm)

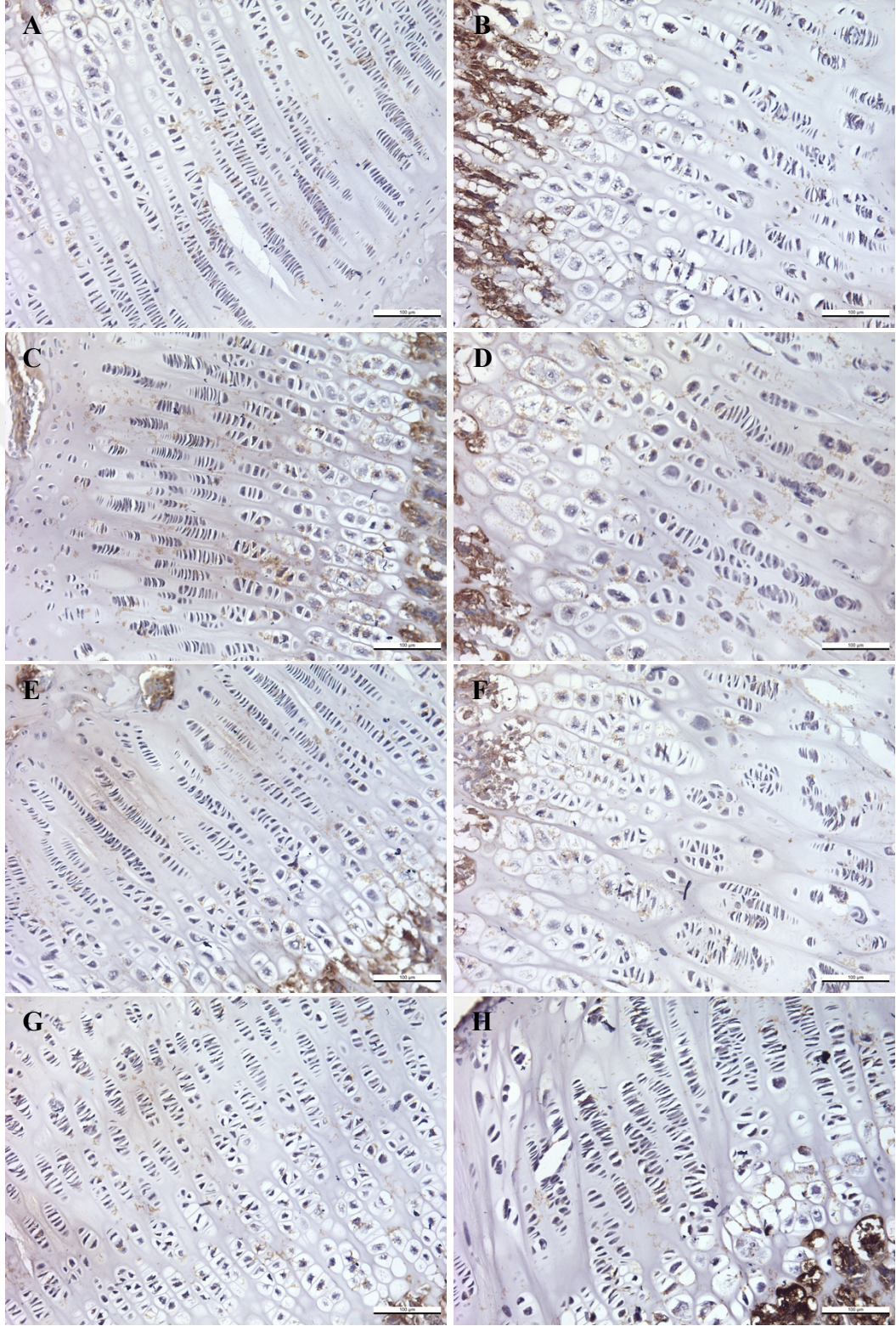
C : 17. gün, RT grubu (Bar 50 µm)

D : 21. gün, RT grubu (Bar 50 µm)

4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular

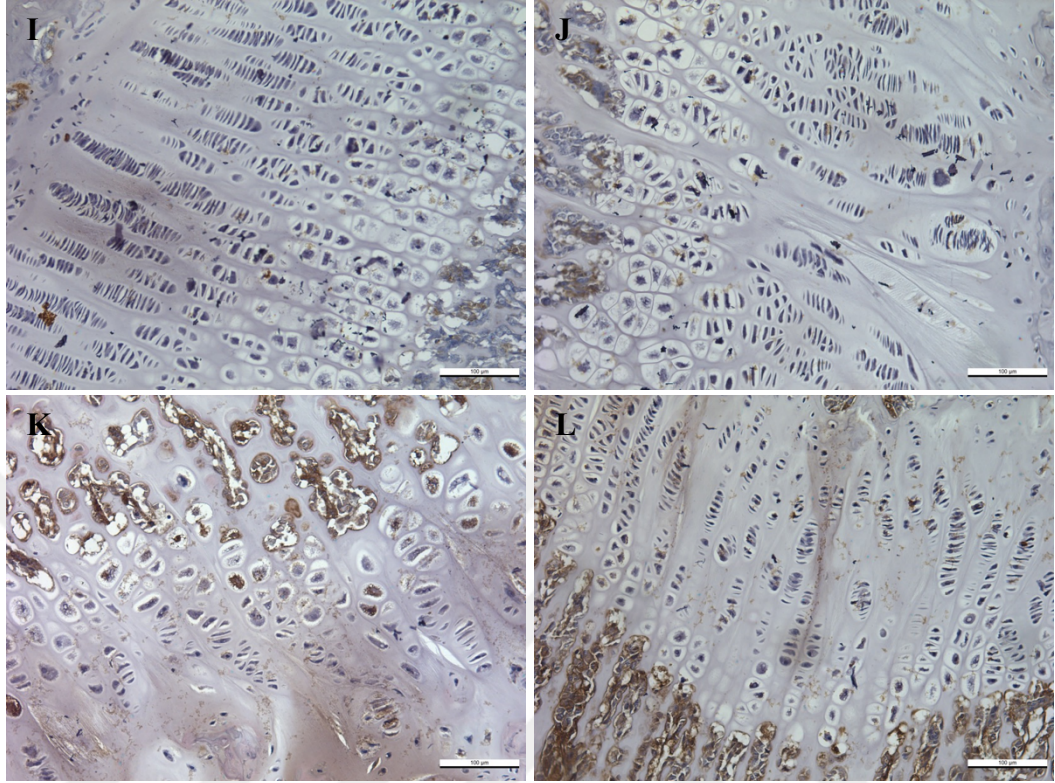
4.2.1 PTHrP

Yüz hücre sayılarak immünohistokimyasal olarak nükleer PTHrP boyanan hücreler sayılarak kaydedilmiştir. Kontrol grubu 1. Gündeki ortalama ekspresyon



Şekil 6. PTHrP immünohistokimyasal boyamalarına ait görüntüler (Bar 100 µm)

Diğer sayfada devam etmektedir...



Şekil 6. (Devam) PTHrP immünohistokimyasal boyamalarına ait görüntüler (Bar 100 μ m)

A ve B : 1. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

C ve D : 7. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

E ve F : 10. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

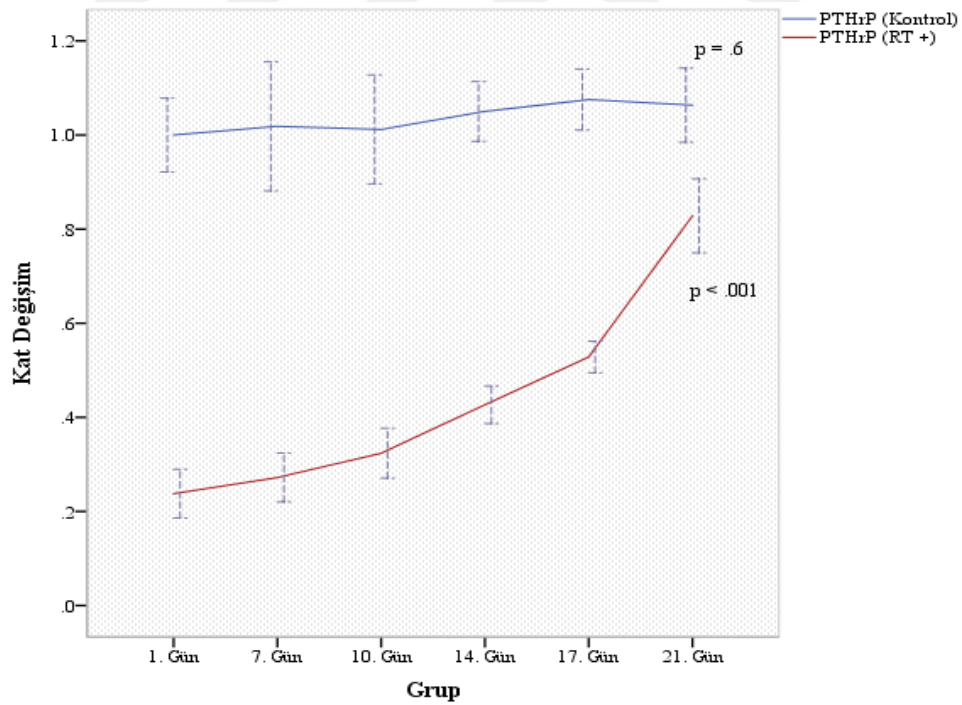
G ve H : 14. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

I ve J : 17. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

K ve L : 21. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

seviyesi 1 kabul edilerek diğer gruplardaki ekspresyon seviyesi katsal değişim üzerinden ifade edilmiştir. Tüm gözlem süresince RT uygulanmış büyüme plaklarındaki PTHrP ekspresyon düzeyleri kontrol büyüme plaklarındaki ekspresyon düzeylerinden düşük izlenmiştir. (Şekil 6 ve 7) Radyoterapi uygulanmış plaklarda PTHrP ekspresyonu 1. günde en düşük seviyeye inmiştir. (

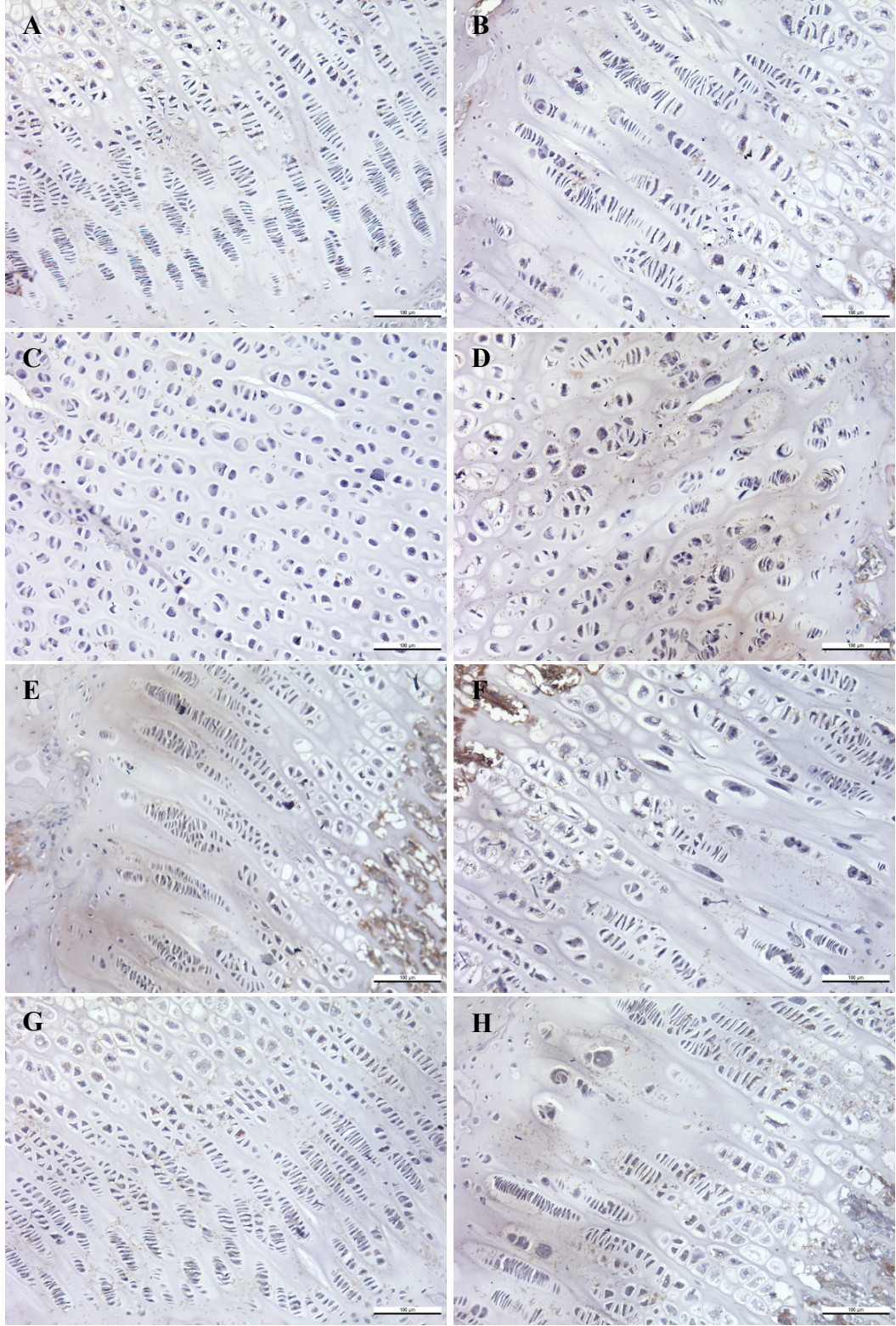
Kontrol grubuna kıyas ile %24 ekspresyon düzeyi, $p = .03$) Radyoterapi uygulanmış plaklardaki PTHrP ekspresyon düzeyleri takip eden gözlem süresince sürekli olarak artış göstermiştir. ($p < .001$) (Şekil 7) En belirgin artış 17. gün ile 21. gün arasında gerçekleşmiştir. (Şekil 7 ve Tablo 2) Radyoterapi uygulanmış plaklardaki gruplar arasında bir önceki takip süresine göre YAP ekspresyonundaki katsal değişim ve istatistiksel karşılıkları Tablo 2’ de özetlenmiştir. Radyoterapi uygulanmamış plaklardaki PTHrP ekspresyonu ise gözlem süresince tüm gruplarda istatistiksel olarak benzer düzeydedir. ($p = .6$) (Şekil 7)



Şekil 7. PTHrP ekspresyon düzeylerindeki değişimin karşılaştırmalı grafiği (p değeri : PTHrP kontrol ve RT + grup için PTHrP ekspresyonundaki değişimin Friedman test analizi sonucu) (RT : Radyoterapi) (1.0 Kat Değişim = 1. gün kontrol grubu ortalama değeri)

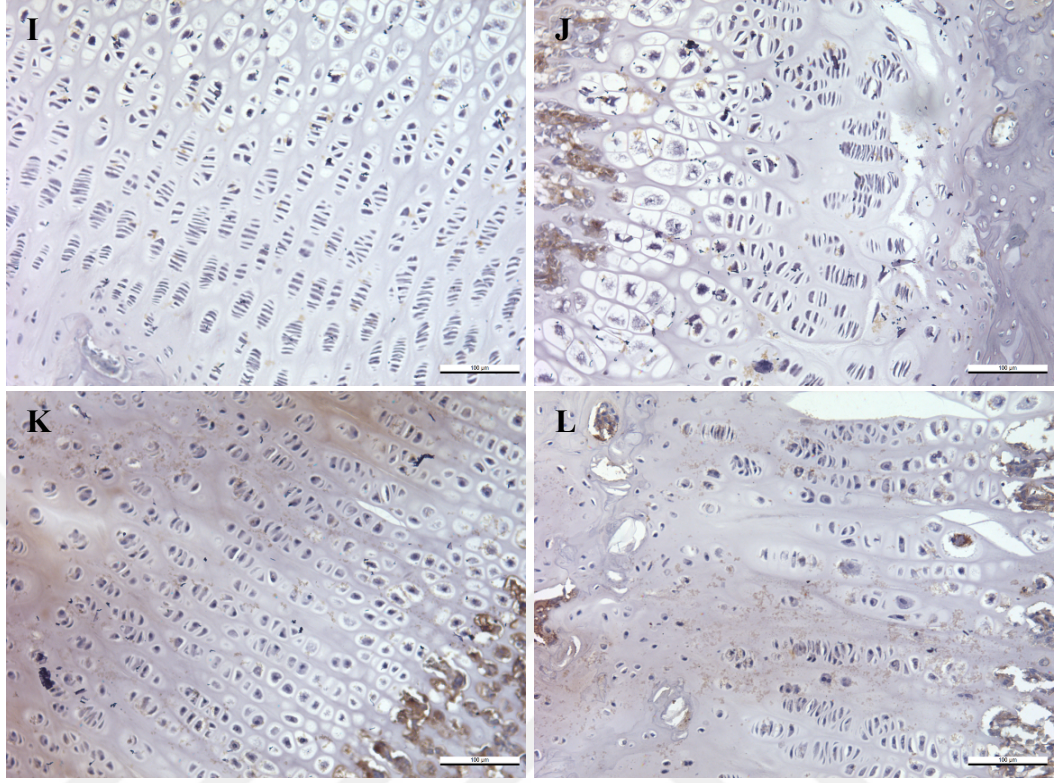
4.2.2 YAP

Yüz hücre sayılarak immunhistokimyasal olarak nükleer YAP boyanan hücreler kaydedilmiştir. Kontrol grubu 1. Gündeki ortalama ekspresyon seviyesi 1 kabul edilerek diğer gruplardaki ekspresyon seviyesi katsal değişim üzerinden ifade edilmiştir. Tüm gözlem süresince radyoterapi uygulanmış büyüme plaklarındaki YAP ekspresyon düzeyleri kontrol büyüme plaklarındaki ekspresyon düzeylerinden düşük izlenmiştir. (Şekil 8 ve 9) Büyüme plağında immünhistokimyasal YAP boyanmasının proliferasyon zonunda belirgin olduğu görülmüştür. (Şekil 8) Radyoterapi uygulanmış plaklarda YAP ekspresyonu 1. haftada en düşük seviyeye inmiştir. (1. gün kontrol grubuna göre % 41 ekspresyon düzeyi, $p = .03$) RT uygulanmış plaklardaki YAP ekspresyon düzeyleri 1. haftadan sonra takip eden gözlem süresince sürekli olarak artış göstermiştir. ($p < .001$) (Şekil 9) YAP ekspresyonundaki en belirgin değişim 14. gün ile 17. gün arasında gerçekleşmiştir. (Şekil 9 ve Tablo 2) Radyoterapi uygulanmış plaklardaki gruplar arasında bir önceki takip süresine göre YAP ekspresyonundaki katsal değişim ve istatistiksel karşılıkları Tablo 2' de özetlenmiştir. Radyoterapi uygulanmamış plaklardaki YAP ekspresyonu ise gözlem süresince tüm gruplarda istatistiksel olarak benzer düzeydedir. ($p = .5$) (Şekil) YAP ekspresyon düzeyindeki değişiklikler ile PTHrP ekspresyon düzeylerindeki değişim arasında korelasyon olduğu gözlenmiştir. (Spearman Korelasyon Katsayısı 0.8, $p < .001$) (Şekil 12 A)



Şekil 8. PTHrP immünohistokimyasal boyamalarına ait görüntüler (Bar 100 µm)

Diğer sayfada devam etmektedir...



Şekil 8. (Devam) YAP immünohistokimyasal boyamalarına ait görüntüler (Bar 100 µm)

A ve B : 1. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

C ve D : 7. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

E ve F : 10. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

G ve H : 14. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

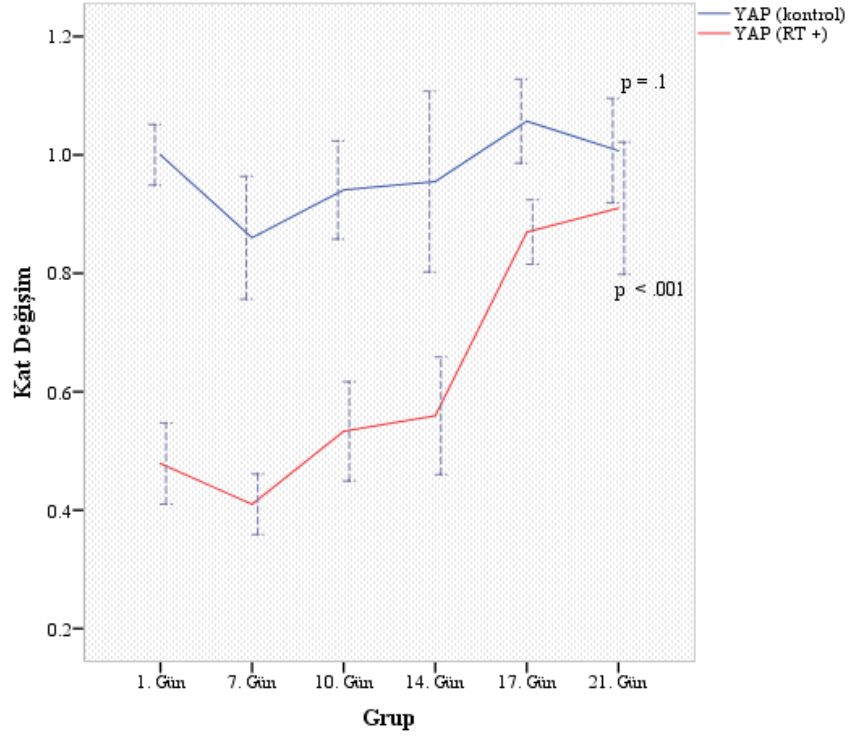
I ve J : 17. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

K ve L : 21. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

4.2.3 TAZ

Yüz hücre sayılarak immünohistokimyasal olarak nükleer TAZ boyanan hücreler kaydedilmiştir. Kontrol grubu 1. Gündeki ortalama ekspresyon seviyesi 1 kabul edilerek diğer gruplardaki ekspresyon seviyesi katsal değişim üzerinden ifade edilmiştir. Tüm gözlem süresince radyoterapi uygulanmış büyüme plaklarındaki

TAZ ekspresyon düzeyleri kontrol büyüme plaklarındaki ekspresyon düzeylerinden



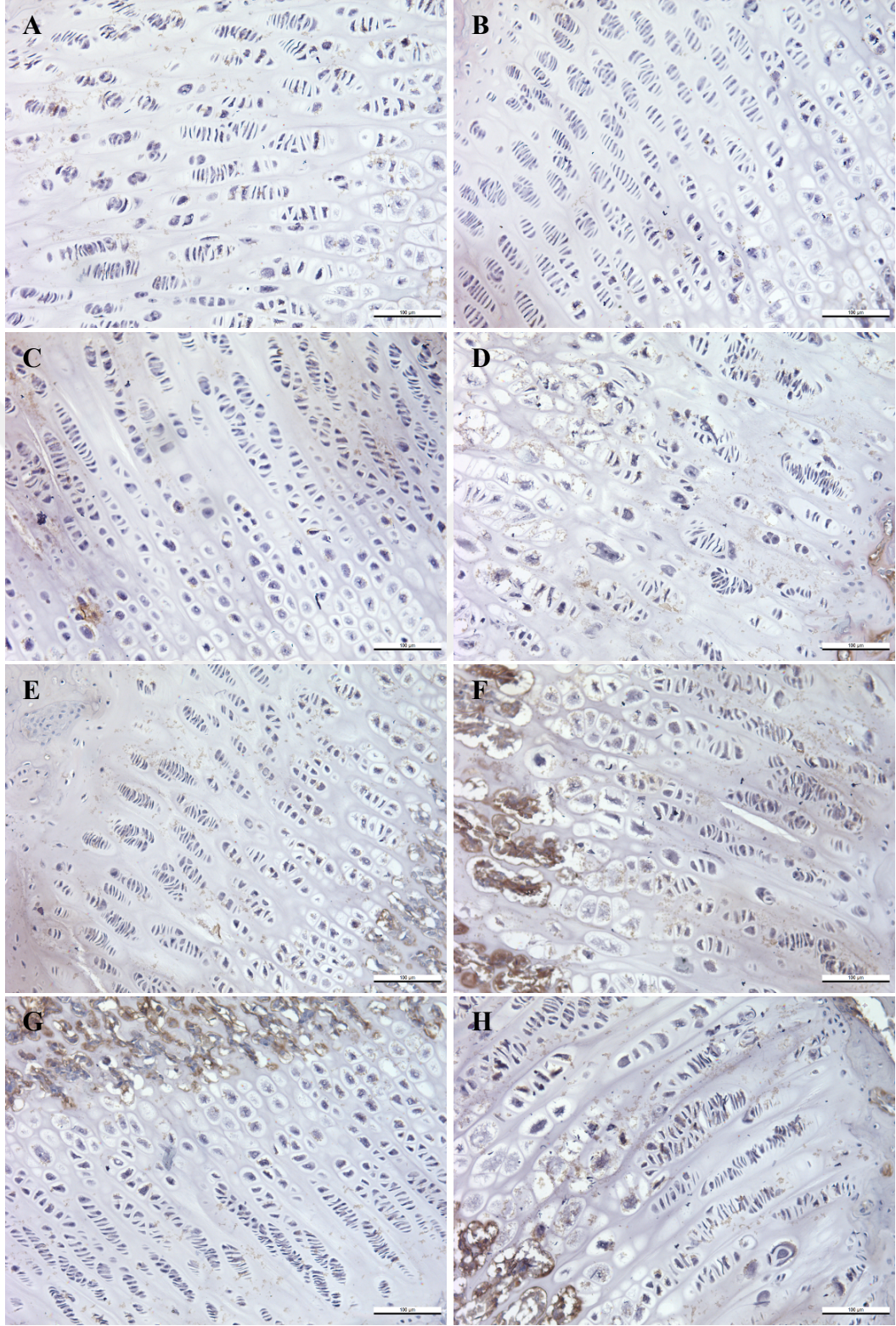
Şekil 9. YAP ekspresyon düzeylerindeki değişimin karşılaştırmalı grafiği (p değeri : YAP kontrol ve RT + grup için YAP ekspresyonundaki değişimin Friedman test analizi sonucu) (RT : Radyoterapi) (1.0 Kat Değişim = 1. gün kontrol grubu ortalama değeri)

düşük izlenmiştir. (Şekil 10 ve 11) Büyüme plağında immünhisiyokimyasal nükleer TAZ boyanmasının proliferasyon zonunda belirgin olduğu görülmüştür. Radyoterapi uygulanmış plaklarda TAZ ekspresyonu 1. haftada en düşük seviyeye inmiştir. (Kontrol 1. gruba göre % 50 ekspresyon düzeyi, $p = .03$) Radyoterapi uygulanmış plaklardaki nükleer TAZ ekspresyon düzeyleri 1. haftadan sonra takip eden gözlem süresince sürekli olarak artış göstermiştir. ($p < .001$) (Şekil 11) YAP

ekspresyonundaki en belirgin değişim 14. gün ile 17. gün arasında gerçekleşmiştir. (Şekil 11 ve Tablo 2) Radyoterapi uygulanmış plaklardaki gruplar arasında bir önceki takip süresine göre TAZ ekspresyonundaki katsal değişim ve istatistiksel karşılıkları Tablo 2’ de özetlenmiştir. Radyoterapi uygulanmamış plaklardaki PTHrP ekspresyonu ise gözlem süresince tüm gruplarda istatistiksel olarak benzer düzeydedir. ($p = .1$) (Şekil 11) TAZ ekspresyon düzeyindeki değişiklikler ile PTHrP ve YAP ekspresyon düzeylerindeki değişim arasında korelasyon olduğu gözlenmiştir. (Spierman Korelasyon Katsayısı YAP vs TAZ için 0.75, TAZ vs PTHrP için 0.63, her ikisi için $p < .001$) (Şekil 12 B ve C)

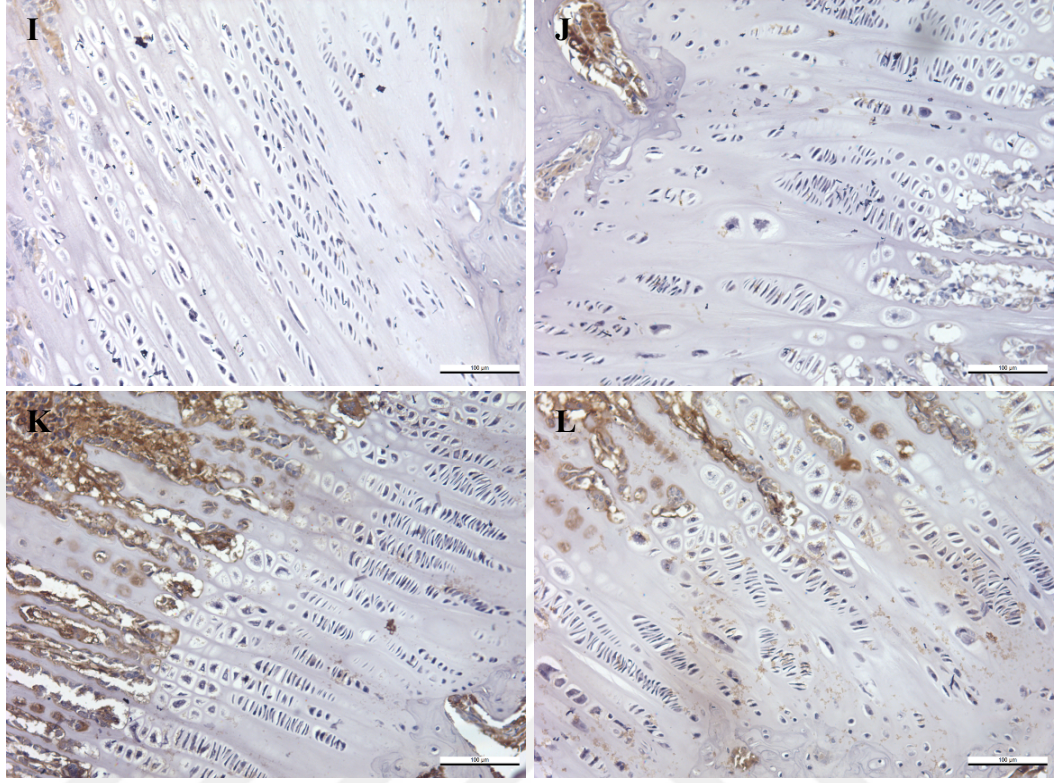
Tablo 2. PTHrP, YAP ve TAZ ekspresyonlarının gruplar arasındaki katsal değişimi ve Wilcoxon İşaretli Sıralı Testi ikili istatistiksel karşılaştırma sonuçları. * = İlgili molekülün bir önceki gruba göre en belirgin yükselişinin görüldüğü zaman dilimi. ($p < .5$ istatistiksel anlamlı kabul edilmiştir ve anlamlılık değerini karşılayan sonuçlar kalın yazılmıştır.)

	PTHrP		YAP		TAZ	
	Katsal Değişim	p değeri	Katsal Değişim	p değeri	Katsal Değişim	p değeri
2. Grup vs 1. Grup	1.14	.05	0.86	.03	.077	.03
3. Grup vs 2. Grup	1.19	.05	1.3	.05	1.07	.14
3. Grup vs 1. Grup	1.36	.03	1.12	.28	0.82	.03
4. Grup vs 3. Grup	1.32	.05	1.03	.49	1.07	.27
4. Grup vs 2. Grup	1.57	.03	1.36	.03	1.14	.05
4. Grup vs 1. Grup	1.79	.03	1.16	.17	0.88	.04
5. Grup vs 4. Grup	1.24	.04	1.55*	.03	1.42*	.03
5. Grup vs 3. Grup	1.63	.03	1.63	.03	1.52	.03
5. Grup vs 2. Grup	1.94	.03	2.12	.03	1.62	.03
5. Grup vs 1. Grup	2.2	.03	1.82	.03	1.24	.03
6. Grup vs 5. grup	1.57*	.03	1.04	.35	1.08	.12
6. Grup vs 4. grup	1.94	.03	1.62	.03	1.54	.03
6. Grup vs 3. grup	2.56	.03	1.71	.03	1.65	.03
6. Grup vs 2. grup	3.04	.03	2.22	.03	1.76	.03
6. Grup vs 1. grup	3.48	.03	1.9	.03	1.35	.03



Şekil 10. TAZ immünohistokimyasal boyamalarına ait görüntüler (Bar 100 μ m)

Diğer sayfada devam etmektedir...



Şekil 10. (Devam) TAZ immünohistokimyasal boyamalarına ait görüntüler (Bar 100 µm)

A ve B : 1. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

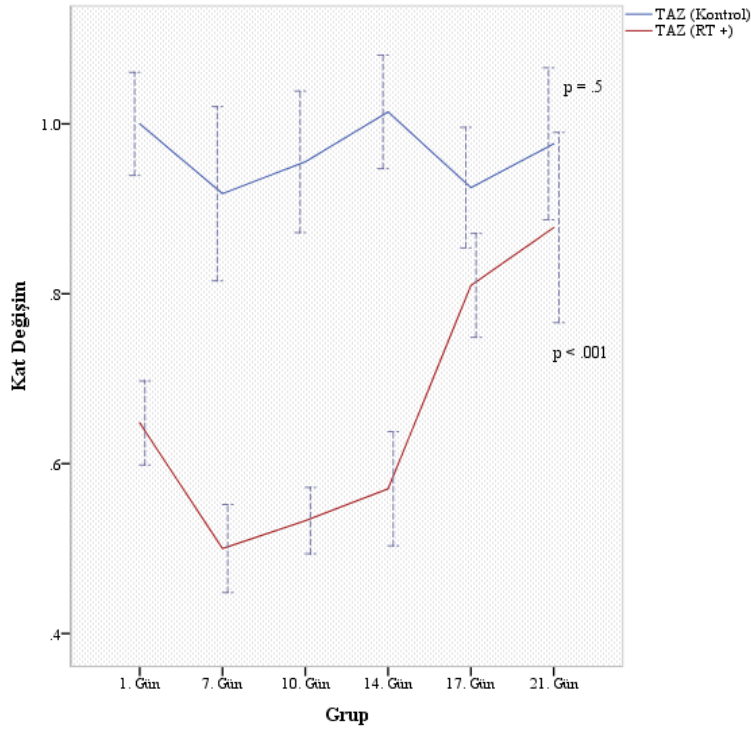
C ve D : 7. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

E ve F : 10. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

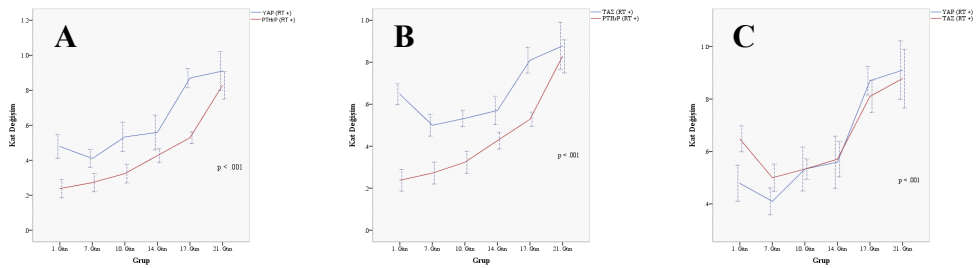
G ve H : 14. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

I ve J : 17. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu

K ve L : 21. gün, sırasıyla kontrol ve RT grubu



Şekil 11. TAZ ekspresyon düzeylerindeki değişimin karşılaştırmalı grafiği (p değeri : TAZ kontrol ve RT + grup için TAZ ekspresyonundaki değişimin Friedman test analizi sonucu) (RT : Radyoterapi) (1.0 Kat Değişim = 1. gün kontrol grubu ortalama değeri)



Şekil 12. Radyoterapi uygulanmış gruplarda PTHrP, YAP ve TAZ ekspresyon değişikliklerinin korelasyon analiz grafikleri

A : YAP vs PTHrP, Korelasyon Katsayısı = 0.8

B : TAZ vs PTHrP, Korelasyon Katsayısı = 0.6

C : YAP vs TAZ, Korelasyon Katsayısı = 0.76

5. TARTIŞMA

İyonizan radyasyonun epifizyel büyüme plakları üzerindeki inhibitör etkisi çocukluk çağı radyoterapi uygulamalarının iyi bilinen bir komplikasyonudur. Şu ana kadar geliştirilen yöntemler veya koruyucu tedaviler her ne kadar hasarın şiddetini ve etkisini azaltmış olsa da iyonizan radyasyon maruziyeti sonrası büyüme plağı arresti halen daha kaçınılmaz bir sonuç olarak görülmektedir. Bununla birlikte radyasyon maruziyeti sonrası büyüme plaklarının bir iyileşme cevabının olduğunun gösterilmesi hasarın kaçınılmaz olmayabileceğini de akıllara getirmiştir. (13, 15, 17) İyileşme cevabının olası moleküler mekanizmalarını anlamaya yönelik yapılan sonraki çalışmalar ise kısıtlı bir düzeyde kalmıştır ve bize net bir bilgi sağlamadan şu an için oldukça uzaktır. (7, 10, 16, 18, 19, 180) Bizim fraksiyone radyoterapi ile yaptığımız bu tavşan modeli büyüme plağında iyonizan radyasyon sonrası gelişen hasarda ve hasarı takip eden kompensatuar iyileşme yanıtında dokuların rejeneratif süreçlerinin kritik bir yürütücüsü olan YAP ve paralogu TAZ transkripsiyonel ko-aktivatörlerinin etkinliğinin olup olmadığını immünohistokimyasal olarak değerlendirmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre büyüme plağında YAP ve TAZ moleküllerinin nükleer ekspresyon düzeyleri radyoterapi uygulandıktan sonraki ilk 1 haftada belirgin şekilde azalmıştır. Histomorfolojik bulgular ise YAP ve TAZ azalışı ile aynı dönemde özellikle proliferasyon zonunda apoptotik bir hasarın geliştiğini ve inhibitör etkilerin büyüme plağına hakim olduğunu göstermektedir. İnhibitör etkileri takip eden klonojenik proliferasyon ve iyileşme yanıtının oluştuğu dönemde YAP ve TAZ nükleer ekspresyonları da yaklaşık 2 kata kadar artış göstermiştir. YAP/TAZ ekspresyon düzeylerindeki değişim büyüme plağı

proliferasyon ve farklılaşma süreçlerinin ana düzenleyicilerinden olan ve önceki çalışmalarda radyoterapi ilişkili hasarda ve iyileşme cevabında etkili olduğu saptanmış ana molekül olan PTHrP'nin ekspresyon düzeylerindeki değişim ile de korelasyon göstermektedir. Fakat hem YAP'ın ekspresyon düzeyi hem de yapısal paralogu olan TAZ'ın ekspresyon düzeyleri bu artışa rağmen yine de radyasyon uygulanmamış büyüme plaklarındaki ekspresyon düzeylerine erken dönemde erişememiştir. Histomorfolojik bulgularımız da oluşan iyileşme yanıtının iyonizan radyasyonun etkilerini önleyebilecek boyuta ulaşamadığını ve radyoterapi ikincil hasarları tamamen kompanse edemediğini göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgular YAP/TAZ transkripsiyonel modülatörlerinin büyüme plağındaki rejeneratif sürecin kritik bir düzenleyicisi olduğunu ve iyonizan radyasyon hasarı sonrası büyüme plağındaki hasarın ve kompensatuar iyileşme cevabının belirleyicisi olabileceğinin kanıtıdır. Sunduğumuz bu kanıtlar büyüme plaklarının iyonizan radyasyon hasarına karşı geliştirdiği komplet olmayan iyileşme cevabının YAP/TAZ veya bu transkripsiyonel modülatörlerin nükleer aktivitesini kontrol eden Hippo sinyalizasyonu üzerinden düzenlenebilmesinin mümkün olabileceğini göstermektedir.

Postnatal dönemdeki endokondral ossifikasyon süreci bir çok farklı yolağın karşılıklı etkileşimi altında sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. (38) Proliferatif evre sonunda hücre siklusundan çıkıp, ossifiye olacak matur matriks yapımı için hipertrofik kondrosite doğru terminal farklılaşma olurken, diğer taraftan multipotent mezenkimal kök hücrelerin kondenzasyonu ile kondrogenezise yönelmesi ve proliferasyonun büyüme süreci tamamlanana dek korunması kritiktir.

Büyüme plaklarındaki arrest etkisi ile bilinen iyonizan radyoterapiye büyüme plağının oluşturduğu ilk yanıt bizim histomorfolojik bulgularımızın da gösterdiği gibi proliferasyon zonundaki apoptoz ve hipertrofik kondrositlere doğru akselere terminal farklılaşmadaki artıştır. (13, 64, 181) Proliferasyon ve terminal farklılaşmadaki kontrolü göz önüne alındığında PTHrP-IHH yolağın parakrin ve otokrin aktivitesinin radyoterapiye bağlı değişimlerin de aracısı olduğunu önermek şaşırtıcı değildir. (61, 182) IHH sinyalinin rezerv zondan kolumnar proliferatif yapıya doğru farklılaşmayı sağlarken, PTHrP'nin ise proliferatif kondrositin yaşam döngüsünden çıkmasını, apoptozunu ve hipertrofik zona immatür farklılaşmasını engellediği bilinmektedir. (43, 45, 48, 183) PTHrP'nin bilinen bu kritik rolleri sebebi ile radyoterapi sonrası büyüme plaklarındaki hasarın ve hasarı takip eden iyileşme cevabının da temel moleküler düzenleyicisi olabileceği düşünülmüştür. Radyoterapi sonrası artan intraselüler Ca seviyesine bağlı olarak PTHrP erken dönemde azalmaktadır. (8) Damron ve ark. rat modellerinde tek fraksiyon radyoterapi sonrası PTHrP'nin düştüğünü ve 1. haftada en düşük seviyesine eriştiğini saptamışlardır. (7) Aynı çalışmada PTHrP seviyelerinin 2. Haftada iyileşme cevabıyla beraber geri yükseldiği de saptanmıştır. Radyoprotektor kullanımı ile PTHrP'deki erken düşüşün azalmasına rağmen, ikinci haftadaki geri yükselişin de belirginliğini kaybetmesi üzerine yazarlar PTHrP'nin radyoterapi sonrası süreçlerdeki etkisinin çok önemli olmayabileceğini kaydetmişlerdir. Birkaç diğer çalışmadan da radyoterapinin etkilerinin PTHrP'den bağımsız olabileceği yönünde bulgular gelmiştir. (10, 16) Sonraki dönemde de PTHrP'nin büyüme plaklarının radyoterapiye cevabındaki rolünü netleştiren bir çalışma gelmemiştir.

Bizim modelimizde ise PTHrP seviyeleri bizim çalışmamızda 1. günde en düşük seviyelerine inmiştir. İlginç olarak PTHrP'nin 1. Haftada en düşük değere indiğini raporlayan diğer çalışmanın (7) aksine bizim çalışmamızda PTHrP ekspresyonunda bu dönemde artış görülmüştür. Daha sonraki dönemde YAP/TAZ'daki ekspresyon artışını takip eden bir PTHrP ekspresyon artışı olmakla birlikte birinci haftadaki bu diskordansın sebebi açık değildir. Henüz, PTHrP ile bu iki ko-aktivatör arasında sinyal arttırıcı veya azaltıcı transkripsiyonel bir bağlantı olduğunu gösteren bir kanıt olmadığından ve bizim çalışmamız bu ekseninde dizayn edilmediğinden birebir bir ilişki tariflenememektedir.

Postnatal dönemdeki büyüme plağı fonksiyonlarında YAP ve TAZ üstlendiği rol sadece bir kaç çalışmada incelenmiş olsa da ilk sonuçlar endokondral kemikleşme sürecinin uygun ilerleyişinde vücutta yaygın etkisi bulunan bu iki transkripsiyonel ko-aktivatörün kritik bir düzenleyici olabileceğini göstermektedir. (22, 163, 170, 173, 179) Deng ve ark. in vivo ve in vitro ortamda hem YAP overekspresyonu yaparak hem de YAP fonksiyonlarını baskılayarak yaptıkları moleküler çalışmada YAP için endokondral ossifikasyon sürecinde iki temel fonksiyon saptamışlardır. (22) Bu çalışmanın sonuçlarına göre, YAP baskın olarak proliferasyon zonunda eksprese edilirken erken dönem kondroprogenitör hücrelerin ve proliferatif kondrositlerin proliferasyonunu indüklemektedir. Diğer kritik rolü ise kondrositlerin ileri farklılaşmasının kontrolüdür. Farklılaşmanın ileri aşamalarında YAP'ın aktivitesini kaybettiği ve bu moleküler değişikliğin hipertrofik kondrosite doğru terminal farklılaşmaya ve maturasyona izin verdiği gözlemlenmiştir. Her ne kadar bir diğer önemli in vivo çalışmada Vanyai ve ark.

(170) kondrosit proliferasyonu için YAP veya TAZ'ın şart olmadığını öne sürmüş olsalar da, Deng ve ark. (22) elde ettiği sonuçlar, çalışmamızda gözlemlediğimiz erken dönem proliferasyon kaybı, apoptoz artışı ve hipertrofik zondaki matriks üretimi gibi histomorfolojik hasar bulgularına 1. ve 7. gündeki belirgin YAP kaybının sebep olmuş olabileceğine bir açıklama getirmektedir. Nitekim YAP ve TAZ ko-aktivatörlerinin proliferasyon, apoptoz, farklılaşma süreçlerini kontrol eden moleküller üzerindeki etkisi de iyi bilinmektedir. (21) Deng ve ark. YAP'ın büyüme plaklarında proliferasyonun kuvvetli bir düzenleyicisi olan SOX6'nın ve terminal diferansiasyonun temel aktivatörü olan Col10a1'in aktivitesini RUNX2 aracılı olarak düzenlediğini ispatlayarak bu süreçlerdeki etkilerinin kondrosit yaşam döngüsünde de geçerli olduğunu onaylamışlardır. (22) YAP ve/veya TAZ radyoterapi sonrası erken dönemdeki büyüme plağında oluşan inhibitör etkiyi açıklamak için potansiyel önemli moleküler adaylardır.

Radyasyona maruziyet sonrası büyüme plağındaki ilk inhibitör etkilerin geçici olduğu düşünülmektedir. İlk hasar sonrası kompensatuar bir iyileşme yanıtının olduğunu düşündüren bulgular hem rat hem de tavşan modellerinde gösterilmiştir. (6, 13) Radyoterapi uygulandıktan sonra yaklaşık 1. haftada belirginleşen hasar yanıtından sonra klonojenik kondrosit adalarının görülmeye başlandığı ve proliferasyon hızının arttığı rapor edilmiştir. (13, 15, 17) Bu bulgularla uyumlu şekilde bizim tavşan modelimizde de 10. gün itibari ile kondrosit kolonileri artmaya başlamış ve 14. günde belirgin bir hal almıştır. Bu iyileşme yanıtının nasıl düzenlendiğini açıklamaya yönelik yapılan çalışmalarda ise azalan PTHrP'nin geri artmasının veya IGF-2, CTGF gibi büyüme faktörlerinin rolü

olabileceği belirtilmiştir. (7, 16) Aynı çalışmacılar tarafından yapılan mikrodizileme çalışmalarında da erken iyileşme yanıtının başladığı dönemde doku rejenerasyon, ekstraselüler matriks üretimi, antiapoptotik ve büyüme plağı morfolojisinde önemli olan bir çok genin yukarı regülasyona uğradığı gösterilmiştir. (18, 19) Fakat tamir sürecini neyin başlattığı ve sürecin nasıl yönlendirildiği yapılan bu çalışmalarda netlik kazanamamıştır ve daha sonra literatürde ayrıca incelenmemiştir.

Hippo yolağının keşfi ve sonrasında rejenerasyon süreçlerinde aldığı rollerin hızlı bir şekilde tanımlanması tramva, hastalık vb. hasar verici süreçler sonrasında da dokuların hasara verdiği tamir yanıtında YAP ve TAZ'ın rolünün geniş çaplı araştırılmasına sebep olmuştur. (85) Yetişkin dönemde rejenerasyon kapasitesinin kısıtlılığı ile bilinen kalp (184, 185) ve çizgili kas (186) dokularında dahi YAP ve TAZ aktivitesinin arttırılması ile tamir kapasitesinin arttırılabileceği in vivo hayvan modellerinde gösterilmiştir. Bununla birlikte büyüme plağı hasarında bu iki transkripsiyonel modulatörün iyileşme cevabının bir parçası olup olmadığını direkt inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu konudaki kısıtlı bilğimiz endokondral kemikleşme sürecini takip eden diğer tamir süreçlerinden elde edilebilmektedir. Deng ve ark. yaptığı çalışmada YAP1 vahşi tip farelerde uygun endokondral kemikleşmeyi takip eden kallus formasyonu oluşurken, Col2a1-Yap1^{tg/+} transgenik ve Mst1c/c; Mst2c/c; Dermo1-Cre mutant farelerin her ikisinde de kallus yapısının maturasyonunun bozuk olduğu gözlemlenmiştir. (22) Benzer bir araştırma dizaynı ayrı bir çalışmada TAZ için uygulanmıştır. (187) Bu çalışmada da TAZ delesyonu sonrası fraktür iyileşme hattında oluşan kallus

formunun hasarlı olduğu bulunmuştur. Normal genetiğe sahip modellerde büyüme plaklarında hasar sonrası tamir süreçlerinde YAP ve/veya TAZ ekspresyon düzeylerini immünhistokimyasal veya moleküler düzeyde inceleyen bir çalışmaya İngilizce literatürde rastlanılmamıştır. Bizim çalışmamızda ise rejeneratif yanıtın oluştuğunu gösteren bulguların oluşmaya başlaması ile hem YAP'ın hem TAZ'ın nükleer düzeylerindeki belirgin artışın başlaması arasında belirgin bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte YAP/TAZ düzeylerinde görülen belirgin artışa rağmen deney modelindeki maksimum takip sürecinde dahi radyoterapi uygulanmış büyüme plaklarındaki YAP/TAZ seviyesi normal büyüme plağındaki YAP/TAZ düzeylerine erişememiştir. Histomorfolojik bulgular da bununla uyumludur. Proliferasyon kapasitesindeki 2. haftada belirginleşen artışa rağmen yeterli büyüme hızının yakalanamadığı ve ilerleyen süreçte de büyüme plağı morfogenezisi için hayati olan normal kolumnar ve zonal yapının tekrar oluşmadığı izlenmiştir. Takip eden dönemde de azalmış selüleritenin, belirgin yapısal distorsiyonun ve nekrozun büyüme plaklarına hakim olduğu görülmektedir. Daha önceki çalışmalar da bizim bulgularımızı onaylayan, erken iyileşme yanıtının yeterli düzeye ulaşmadığını gösteren bulgular raporlamışlardır. (13, 15, 17) Erken dönemdeki YAP/TAZ yanıtının yetersizliği buna sebep oluyor olabilir. Deney modelimizdeki takip sürecinin 21. gününde radyoterapi uygulanmış plaklardaki YAP/TAZ düzeyleri normal büyüme plaklarındaki seviyeye yaklaşmaktadır. Daha uzun takip süresinde yeterli YAP/TAZ yanıtının oluşabileceği fikri oldukça makuldur. Fakat henüz 21. günde dahi büyüme plaklarında erken kemikleşmenin bulguları gözlenmektedir. Bu da YAP/TAZ yanıtının yapısal değişiklikler

yerleşmeden, çok daha erken dönemde oluşması gerektiğine işaret etmektedir. Bu sebeple azalan YAP/TAZ aktivitesinin geri gelmesinin mekanizmaları aydınlatılmaya muhtaçtır. YAP/TAZ nükleer aktivitesi kanonikal olarak Hippo sinyal yolağı tarafından yapılmaktadır. (20) Bu yolağa yaygın bir sinyal girişi olmakla beraber radyoterapinin sebep olduğu hücresel ve zonal yapısal değişikliklerden gelen sinyal girdileri YAP ve TAZ ekspresyonel değişim dinamiğini açıklayabilir.

Proliferatif kondrositlerin kolumnar yapısı çevresindeki ekstraselüler matriks ile beraber büyüme plağının fonksiyonel altbiriminin bir parçasıdır (26) ve dinamik farklılaşma ve longitudinal büyüme sürecinin temel belirleyicisidir. (188) Rezerv zondaki nadiren proliferen olan kondrositler kolumnar yapı içerisinde mediolateral eksende düz bir hücre şekline geçmekte ve aktif olarak hızlı bir şekilde bölünmektedir. Daha sonra kolumnar yapının sonuna geldiğinde hücre siklusundan çıkmakta ve hücre şeklini tamamen değiştirerek matur ossifikasyonu yapacak hipertrofik kondrosite farklılaşmak üzere hacimce yaklaşık 20 kat büyümektedir. Hücre-hücre bağlantılarından, hücresel polariteden, matriks-hücre etkileşiminden ve matriks yoğunluğundan gelen mekanik sinyallerin bu yaşam döngüsünü sıkı bir şekilde kontrol ettiği gösterilmiştir. (189) Prein ve ark. murin modelinde ekstraselüler matriksin yapısal ve mekanik özelliklerinin kolumnar yapıdaki hücresel bölünmeye ve longitudinal uzamaya etkisini çok net bir şekilde göstermişlerdir. (188) Yazarlar bu çalışmada transvers eksende uzanan periselüler ve territorial matriks ile kolumnar yapılar arasında longitudinal eksende uzanan interterritorial matriks arasında belirgin yapısal ve yoğunluk farklılığı olduğunu

saptamışlar ve bu farklılığın hücresel bölünmeyi ve uzamayı indükleyebileceğini ifade etmişlerdir. Daha önceki çalışmalarla beraber bizim çalışmamızda da radyoterapiye maruz kalmış büyüme plaklarındaki en belirgin histomorfolojik bulgu yaklaşık 1. haftada belirginleşen kolumnar yapının ve matriksiyel organize yapının kaybıdır. Bizim düşüncemize göre yapısal belirgin bozulma olan bu evrede değişen hücre polaritesi, hücre adezyonu veya matriks kaynaklı mekanosinyaller iyileşme yanıtının başlatıcı rolünü üstleniyor olabilir. İyileşme yanıtının histomorfolojik belirtilerinin hemen yapısal bozuklukların belirginleştiği bu dönemden sonra oluşuyor olması bu hipotezi desteklemektedir. Deng ve ark.'nın (22) YAP hiperaktivasyonunun kondrositlerin kolumnar yapısı için kritik rolü olan SOX6 (190) aktivitesini artırıyor oluşunu saptaması bu düşüncenin indirekt bir kanıtıdır.

Mekanosinyallerin Hippo kor komponentleri üzerindeki ve YAP/TAZ'ın nükleer veya sitoplazmik lokalizasyonu belirlemede etkisi olduğu net bir şekilde bilinmektedir. (124) (171) Hipertrofik farklılaşmanın inhibitörü olup aynı zamanda proliferasyonu artırıcı etkileri olan, hücresel iskelet yapısının mediatörü Rho-GTPase ve onun efektör kinazı ROCK molekülleri (191, 192) defosforile YAP düzeylerini arttırmaktadır. (193) Yine hücre ve matriks arasındaki bağlantılar Rho-GTPase veya FAK-Src-PI3K yolu aracılığı ile YAP nükleer aktivitesini düzenlemektedirler. (123, 194) Radyoterapiye maruz kalmış büyüme plaklarında da görülen ana bulgulardan biri olan hücresel selüleritenin azaldığı durumlarda YAP'ın fosforilasyonunun azaldığı ve sitoplazmik sekestrasyon yerine nükleer birikim göstermesi mekanosinyallerin öneminin gösteren bir diğer önemli

bulgudur. (103, 124) Mekanik faktörlerin YAP/TAZ aracılığı ile kondrosit morfolojisini etkilediğini gösteren kapsamlı bir çalışma Zhong ve ark. tarafından yayınlanmıştır. (173) Bu çalışmanın sonuçlarına göre yoğun ve yoğun olmayan iki ayrı ortama ekilen kondrositler karşılaştırıldığında, yoğun ortamdaki kondrositlerde YAP ekspresyon seviyeleri belirgin bir şekilde artmaktadır. Artan YAP'ın olası etkisini gözlemlemek isteyen araştırmacılar yoğun ortama YAP nakavt edilmiş kondrositler ekmiştir. Yazarların bildirdiğine göre bu kondrositlerdeki 3. gündeki büyüme hızı aynı yoğun ortama sahip YAP nakavt edilmemiş kondrositlere göre belirgin düşmektedir.

Radyoterapi sonrası büyüme plağında görülen yapısal, hücresel distorsiyon ve matriks değişiklikleri göz önüne alınırsa, mekanik sinyallerin radyoterapi hasarı sonrası büyüme plaklarındaki YAP/TAZ ilişkili cevapla karşılıklı etkileşim içinde olduğunu düşünmek göz ardı edilmemelidir. Vanyai ve ark. in vivo çalışmalarında ESM regülasyonu altında kartilaj morfogenezisi için YAP/TAZ fonksiyonlarının önemine dikkat çekmişlerdir. (170) YAP/TAZ nakavt edildiğinde proliferasyon belirgin bir şekilde etkilenmezken, matriks alanı oransal olarak artmıştır ve hücre yoğunluğu belirgin azalmıştır. Araştırmacılar sonraki aşamada YAP ve TAZ'ın ESM genleri üzerindeki etkilerini değerlendirmişler ve matriks sentezini arttıran genlerin etkilenmemesine rağmen matriks yıkım sürecini etkileyen MMP2 ve Katepsin K düzeylerinin YAP/TAZ yokluğunda azaldığını saptamışlardır. Bu da YAP/TAZ yokluğunda ESM'deki artış yönündeki değişimin matriks sentezindeki artıştan çok azalan proteaz aktivitesine ikincil akumulasyon ile ilişkili olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca matriks remodelizasyonu için kritik olan CTGF

seviyelerinin YAP/TAZ yokluğunda belirgin azalırken, nükleer hiperaktif modellerde 3 kata kadar arttığını raporlamışlardır. Wang ve ark. (16) oluşturduğu radyoterapi modelinde iyileşme döneminde 2. haftada artan ve yazarların rejeneratif yanıtla ilişkili olabileceğini önerdiği CTGF seviyeleri YAP/TAZ ilişkili olabilir. Ama ne yazık ki, radyoterapinin büyüme plaklarında hücresel veya ekstraselüler matriks düzeyinde sebep olduğu yapısal ve morfolojik değişikliklerin ne olduğunu histomorfolojik bulguların ötesinde halen daha ayrıntılı olarak bilmemekteyiz. Bu etkilerin ve mekanizmaların ayrıntılı olarak incelenmesi büyüme plaklarının radyasyondan iyileşme sürecini de daha iyi anlamamıza ve kaçınılmaz görülen büyüme plağı arrestini daha etkili bir şekilde engellememize olanak sağlayacaktır.

YAP ve TAZ ko-aktivatörlerinin ossifikasyon süreçlerindeki etkisi proliferasyon zonundaki aktivitesinin ötesine uzanmaktadır. Karystinou ve ark. kök hücrelerdeki farklılaşma kaderinde anahtar bir rolü olan YAP/TAZ'ın kondrojenesis sürecine etkisini araştırdıkları in vitro çalışmada, mezenkimal kök hücrelerde TAZ'ın belirgin bir etkisini saptamazken, yüksek YAP aktivitesinin kondrojenetik farklılaşmayı azalttığını bulmuşlardır. (163) Benzer bir gözlem Zhong ve ark. tarafından da raporlanmıştır. (175) Yazarlar, RhoA-ROCK bağımlı bir mekanizma ile artan YAP ve TAZ'ın osteogenik ve fibrokondrojenik farklılaşmaya yöneldiğini ve mekanotransduksiyon mekanizmalarının da kök hücre kaderinde belirleyici olduğunu ifade etmişlerdir. Bununla birlikte YAP/TAZ aktivitesinin kondrojenik uyarımı arttırabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. (89, 195) Bizim oluşturduğumuz bu deneysel modelde ise ossifikasyon belirtileri radyoterapi uygulanmış büyüme plaklarında radyoterapi uygulanmamış

plaklara göre çok daha erken bir dönemde görülmüştür. Çalışmamız sonuçları bu konuya net bir mekanizmasal açıklama getirememektedir. Bu yönelim mezenkimal kök hücrelerdeki bir farklılaşma değişikliğinden kaynaklı olabileceği gibi, proliferatif kondrositlerin maturasyon bozukluğu ile de ilişkili olabilir. Ayrıca radyoterapi ile beraber metafizyel bölge ve kondroosseöz bileşke de önemli düzeyde hasar almaktadır. Ossifikasyon sürecindeki değişimlere periepipfizyel radyoterapi etkileri de katkı sağlıyor olabilir. (196) Bizim histomorfolojik bulgularımıza göre radyoterapi sonrası büyüme plağı tamir yanıtı, sondaj deliği gibi metodlarla oluşturulan travmatik büyüme plağı hasarı sonrası gelişen inflamatuvar fazla başlayan tamir cevabını takip etmemektedir. (197) Fakat travma sonrası büyüme plağında gelişen cevabın son aşamasında yaklaşık 3. haftada ortaya çıkan anjiogenetik ve osteogenik yanıt radyoterapi sonrası da görülen erken vasküler ve ossifikasyon bulguları ile benzerlik göstermektedir. Travmatik modelde başlangıçtaki inflamatuvar faz sonrasında gelişen mezenkimal kök hücre kondenzasyonunu, hızlanmış endokondral farklılaşmayı arttırdığı gibi normalde büyüme plağında gözükmeyen intramembranöz kemikleşmenin de oluşmasını sağlamaktadır. Daha sonraki VEGF ilişkili anjiogenetik yanıt ve fibro-osseogenetik yanıt da ilk inflamatuvar yanıtın başlattığı zincir reaksiyonlar sonrası ortaya çıkmaktadır. radyoterapi modelinde ise başlangıçta immün yanıt ilişkili bir inflamatuvar yanıt olduğunu gösteren net bir bulgu yoktur. İlerleyen süreçte oluşan erken ossifikasyonun ve vasküler yanıtın sebebi olabilecek moleküler ve patofizyolojik ilişkiler radyoterapi modeli ilişkili tamir mekanizmaları için net değildir. Kuvvetle ihtimal radyoterapi hasarı sonrası oluşan yanıt kompleks ve

epifizyel-periepifizyel dinamik bir çok etkileşimi içinde barındırmaktadır. YAP/TAZ ilişkili fibrogenetik-osteogenetik farklılaşmalar tamir sürecinin istenmeyen klinik sonuçlara sebep olan bu son aşamasını da etkiliyor olabilir.

İyonizan radyasyonun inhibitör etkilerini takip eden bir iyileşme cevabının belirtilerinin görülmesi araştırmacıları bu etkiyi potansiyelize etmeye yönlendirmiştir. Bu çalışmalar büyüme plağındaki spesifik bir yolağı modüle etmekten çok, amifostin ve pentoksifilin gibi radyoprotektörler ile yapılmıştır. (7, 9-14, 198-201) Bu metodun büyüme plaklarını koruyucu etkisi minimaldir ve etkileri iyileşme cevabını modüle etmekten çok radyoterapiye bağılı ilk inhibitör etkileri azaltmaları ile ilgili gibi görülmektedir. Bu çıkarım Damron ve ark. PTHrP, Bcl-2, Bax gibi moleküllerin immünohistokimyasal ekspresyonları üzerinden radyoprotektan kullanımının etkisini araştırdıkları çalışmanın sonuçları ile uyum göstermektedir. (7) Yazarların raporladıkları sonuca göre, amifostin PTHrP'nin 2. gündeki ilk azalışını azaltırken, 2. haftadaki PTHrP düzeylerinde kaydadeğer bir etki yapmamaktadır. Bax üzerinden etkinin daha belirgin olması radyoterapinin ilk inhibitör etilerinin etkisinin azaltıldığının işareti olabilir. Kombine radyoprotektan kullanımı ile yapılan diğer çalışmalarda immünohistokimyasal olarak proliferasyon belirteçlerinde belirgin iyileşme sağlanmış olsa da kemik uzunluğu gibi klinik sonuçlarda beklenen etki gözlemlenmemiştir. (10-12) Büyüme plağının bir çok büyüme ve farklılaşma uyarıcı faktörden etkilendiğı düşünülür ise bir diğer yol bu moleküller ile iyileşmenin indüklenmesidir. Radyoterapi sonrası iyileşme yanıtında büyüme faktörü modülasyonu yapılmış bir yaklaşım bu tarihe denk bulunmamıştır. Fakat büyüme plağı hasarı sonrası gelişen tamir yanıtını ve kondroenezisi

indüklemek için kullanılan büyüme faktörlü tedaviler de travma ile oluşturulmuş modellerde sadece inkomplet bir fayda sağlamıştır. (197) Bizim tahminimizce hasar sonrası gelişen kondrosit-matriks arası kompleks dinamik ilişkiler kullanılan metodların etkinliğini ve alanını kısıtlamaktadır. Bu sebeplerle iyileşme cevabının daha selektif olarak uyarımını gerekli gibi durmaktadır.

Radyoterapi maruziyeti sonrasında büyüme plaklarında oluştuğunu gösterdiğimiz YAP ve TAZ yanıtı iyileşme yanıtının bu iki molekül üzerinden modüle edilebileceğini göstermesi açısından umut vermektedir. Müdahale ile YAP ve TAZ düzeylerinin artırılmasının hasar sonrası süreçlerdeki tamir kapasitesindeki etkisi yetişkin hayvan modellerinde karaciğer, (202) kalp, (157, 158) deri (203) gibi organlar için gösterilebilmiştir. Radyoterapi sonrası büyüme plaklarında bir iyileşme yanıtı oluşmakla beraber bu yanıt radyoterapi ilişkili inhibitör etkileri önleyebilecek boyutta değildir. Sınırlı bir tamir yanıtına sahip büyüme plaklarında terapötik YAP/TAZ indüksiyonu ile artırılmış rejeneratif yanıt oluşturulması mümkün durmaktadır. Fakat, herhangi bir çeşit hasar verici mekanizmaya maruz kalmış büyüme plaklarında YAP/TAZ'ın aktive edilmesinin rejeneratif etkisini gösteren in vitro veya in vivo bir çalışma bu tarihe denk raporlanmamıştır.

YAP ve/veya TAZ aktivitesinin uyarılması büyüme plaklarının radyasyondan iyileşme etkisinin kuvvetlendirilmesi için heyecan verici olsa da bu mekanizma bir çok engel ve risk de barındırmaktadır. İlki YAP ve TAZ'ın bu süreçteki mezenkimal kök hücrelerden hipertrofik farklılaşmaya kadar dinamik aktive ve inhibe edici ayrı rollerinin var olmasıdır. Radyoterapi hasarı sonrasındaki

mekanizmaların kompleks olması şu ana kadar uygulanmış modellerin etkisini yorumlamayı daha da zorlaştırmaktadır. Ayrıca YAP ve TAZ WNT gibi endokondral kemikleşme sürecinde kritik rolleri olan bir çok önemli yolakla karşılıklı etkileşim içerisindedir. (98) Dahası YAP ve TAZ direkt transkripsiyon etkileri olan moleküller olmayıp aktivatör etkilidirler. (20) Hücre veya dokunun transkripsiyonel aktivitesine göre tamamen karşıt farklı etkiler de gösterebilmektedir. Tüm bu kompleks ilişkiler sebebi ile büyüme plağında radyoterapi sonrası oluşan YAP/TAZ etkisi ve modülasyonunun ilk görülden daha kompleks bir süreç olduğuna işaret etmektedir. Bir diğer problem YAP ve TAZ'ın onkojenik süreçleri modüle ediyor gibi gözüken etkileridir. (83, 204, 205) Radyoterapinin sıklıkla uygulandığı bu yaş grubu malignitelerin bir çoğunda artmış YAP/TAZ aktivitesi veya Hippo yolağı modülasyon bozukluğu olduğu ispatlanmıştır. (90, 206) Bu durumda YAP ve TAZ'ın ektopik aktivasyonunun onkolojik sonuçları negatif etkileyeceği düşüncesi haklı bir endişedir. Kısa süreli dahi olsa YAP/TAZ aktivasyonun bu malignitelerdeki progresyon oluşturucu etkisi şu an bilinmemekle beraber ileri çalışmalarda dikkatle değerlendirilmelidir. YAP/TAZ uyarımının taşıdığı potansiyel bir diğer risk ise uzamış YAP/TAZ aktivitesinin dokulardaki maladaptif tamir yanıtı ve fibrozis ile ilişkili olmasıdır. (176, 207) Bir çalışmada glokomda artmış ekstraselüler matriks yoğunluğunun uzamış YAP artışına ikincil miyofibroblastik farklılaşmayı arttırdığı, YAP'ın nakavt edilmesi veya verteporfin ile inhibe edilmesi sonucunda ise fibrotik değişikliklerin geri döndürülebildiği gösterilmiştir. (208) Benzer şekilde kalp yetmezliğinde YAP regülasyonundaki artışın kardiyak fibroblastik dönüşümü

arttırdığı ve kardiyak fonksiyonları bozabileceği saptanmıştır. (177) Renal iskemi reperfüzyon hasarı ile oluşturulmuş bir fare modelinde ise, akut iskemiyeye bağlı tubuler hasar sonrası uzun süreli YAP aktivasyonunun maladaptif tamir sürecinin bir parçası olduğu ve renal yetmezliği indüklediği bildirilmiştir. (178) YAP/TAZ yanıtı radyoterapi ilişkili hasar süreçlerinin bir parçası da olabilir. Tükürük bezlerinde radyasyon hasarı sonrası gelişen kompensatuar proliferasyon yanıtındaki YAP aktivasyonunun ROCK bağımlı bir yolla uzamış aktivitesinin doku rejenerasyonunu engellediği ve uzun dönemdeki hiposalivasyonun sebebi olabileceği ifade edilmektedir. (193) Endokondral kemikleşme sürecinde de YAP'ın hipertrofik terminal farklılaşmayı inhibe ettiği bilinmektedir. Deng ve ark. (22) çalışmasında YAP hiperaktivasyonu olan hayvan modelinde matur kallus yanıtının oluşmaması bununla ilişkili olabilir. Daha ilginç ise, bu çalışmada fraktür sonrası oluşan kallus formunun YAP hiperaktif farelerde YAP nakavt edilmiş farelere göre daha fazla bozulmuş olmasının saptanmasıdır. Bu yüzden her ne kadar kompensatuar proliferasyon yanıtı iyileşme cevabının kritik bir adımı gibi duruyorsa da YAP/TAZ ilişkili uzamış yanıt farklılaşma süreçlerini etkileyerek büyüme plaklarında da maladaptif bir tamir sürecine ve organ yetersizliğine de sebep olabilir. Bu yüzden YAP/TAZ'ın aktivasyonu ilişkili rejeneratif beklentiler radyasyon hasarını takip eden kısa süreli bir dönemle kısıtlı kalabilir. Ayrıca YAP/TAZ'ın dokularda yaygın etkisinin var olduğu düşünülürse, hiperaktivasyonları ilişkili olası sistemik risklerin önüne geçebilmek için doku spesifik bağlantılarının da ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Çalışmamızda klinik yaklaşıma uygun şekilde fraksiyone radyoterapi uygulanmıştır ve sonuçlar in vivo ortamdan elde edilmiştir. Çalışmanın iyi dizayn edilmiş bu özelliklerine rağmen sonuçları yorumlamayı güçleştiren eksiklikleri mevcuttur. İlki ve en önemlisi moleküler ekspresyon düzeylerinin western blot analizi gibi direkt kantitatif bir metodla ve RNA ekspresyon değişiklikleri ile beraber değerlendirilmemiş olmasıdır. İmmünohistokimyasal değerlendirme indirekt bir değerlendirme sunmakta ve protein ekspresyonunu göstermekle beraber transkripsiyonel aktivitedeki değişikliği ölçmemektedir. Ayrıca ekspresyon düzeylerinin immünohistokimyasal yarı kantitatif sayımı kişi ve gözlem bağımlıdır. Radyoterapi sonrası büyüme plaklarında ekstraselüler matriksteki değişimler oldukça dikkat çekicidir. Matriks yoğunluğunun kantitatif değerlendirmesi YAP/TAZ düzeylerindeki değişimi daha iyi anlamamızı sağlayabilirdi. Ayrıca YAP/TAZ fonksiyonlarına etki etme potansiyeli yüksek diğer düzenleyici moleküller çalışmamızda değerlendirilmemiştir. Bu da moleküler ilişkileri anlamamızı güçleştirmektedir. Bir diğer önemli olabilecek negatif etken farklı yaşlardaki büyüme plaklarının değerlendirilmemiş olmasıdır. Radyoterapinin büyüme plaklarında oluşturduğu hasar düzeyinin yaş bağımlı olduğu ve ilerleyen yaş ile hasarın klinik etkisinin azaldığı iyi bilinmektedir. (4, 182, 209, 210) Artan yaş ile büyüme plaklarında YAP/TAZ etki düzeyi değişiyor olabilir. Ayrıca takip süremiz uzun dönem yapısal sonuçları görece kadar uzun değildir. Ossifikasyon belirtilerinin netleştiği 3. haftada YAP/TAZ düzeyleri kontrol grubu seviyelerine yaklaşmıştır. Daha uzun takip süresinde YAP/TAZ seviyeleri olağan seviyelerinin çok üstüne çıkıyor olabilir. YAP ve TAZ'ın maladaptif tamir süreçlerinde (177,

178, 193) görülen etkileri de göz önüne alındığında ilk dönemdeki fonksiyonlarının çok daha ötesinde bir rol alıyor olabilir.

Sonuç olarak bizim bulgularımız YAP ve TAZ transkripsiyonel ko-aktivatörlerinin iyonizan radyasyon sonrası büyüme plaklarında gelişen hem ilk inhibitör etkilerin hem de takip eden kompensatuar iyileşme yanıtının kritik bir düzenleyicisi olabileceğini doğrulamaktadır. Radyoterapi sonrası bozulan büyüme plağı morfogenezisi YAP ve TAZ aktivitesindeki değişikliklere oldukça duyarlı olabilir. Özellikle iyileşme yanıtının başlaması ve nihai sonucunun düzeyi YAP/TAZ'daki 1. haftadan sonra ortaya çıkan değişimle açıklanabilir. İlerleyen çalışmalarda moleküler ilişkilerin net bir şekilde ortaya konulması bu bulguları güçlendirecektir. Hippo sinyal yolağının veya efektörleri YAP ve TAZ'ın aktivitesinin terapotik modülasyonu ile radyoterapi sonrası büyüme plağında gelişen rejeneratif süreçlerin güçlendirilebileceği fikri yeni ve umut vadeden bir yaklaşımdır. Bu yönde dizayn edilmiş ileri çalışmalar kaçınılmaz olarak görülen büyüme plağı arrestini önleyecek yolları bulmamızı sağlayabilecektir.

6. SONUÇLAR

- İyonizan radyasyon büyüme plaklarında proliferasyonda azalma, apoptoz artışı, hücresel distorsiyon, hipertrofik kondrosite hızlanmış farklılaşma ve hipertrofik zonda relatif artmış alan fraksiyonu, zonal morfolojide yapısal değişiklikler gibi erken hasar bulgularına sebep olmaktadır. Bu etkiler 1. haftada belirginleşmektedir.

- 10. gün ile beraber rejeneratif kondrosit klonları görülmeye başlanmıştır. 14. gün ile beraber iyileşme yanıtı, rejeneratif klonlar ve büyüme hızındaki artış belirginleşmiştir. Aynı dönemde matriks alan fraksiyonu muhtemel artmış rezorbtif etkilere ikincil azalmıştır. Rezorpsiyondan sorumlu kondroklastik hücreler artış göstermiştir ve muhtemel metalloproteinöz içeriğe sekonder eizonofolik sitoplazmalı kondrositler belirginleşmiştir.
- Rejenerasyon ile artan büyüme hızına rağmen büyüme hızı radyoterapi alan grupta her zaman daha düşüktür. Radyoterapiye maruz kalan büyüme plağının uzunluğu 1. Hafta ile beraber sürekli olarak kontrol büyüme plağının uzunluğundan kısadır.
- 21. günde kapillerizasyon belirginleşmiştir ve ossifikasyon bulguları morfolojiye hakim olmuştur.
- Histomorfolojik bulgular radyoterapi sonrası ilk 1 hafta inhibitör etkilerin baskınken, 2. haftada belirginleşen bir kompensatuar iyileşme yanıtının ortaya çıktığını ispatlamaktadır.
- İyileşme yanıtı inkomplet bir tamir yanıtıdır ve radyoterapi sebepli hasar verici etkileri tamamen geri döndürememiş, erken ossifikasyonu engelleyememiştir.
- PTHrP ekspresyon düzeyleri ilk gün en düşük seviyesine inmiş, daha sonra sürekli olarak artış göstermiştir. Takip süresince radyoterapi grubunda PTHrP ekspresyonu sürekli olarak kontrol grubu seviyelerinin altındadır.

- Nükleer YAP ekspresyon düzeyleri 1. günde azalmış, 1. haftada en düşük seviyesine inmiştir. Daha sonra sürekli olarak artmıştır. Takip süresince radyoterapi grubunda YAP ekspresyonu sürekli olarak kontrol grubu seviyelerinin altındadır.
- Nükleer TAZ ekspresyon düzeyleri 1. günde azalmış, 1. haftada en düşük seviyesine inmiştir. Daha sonra sürekli olarak artmıştır. Takip süresince radyoterapi grubunda TAZ ekspresyonu sürekli olarak kontrol grubu seviyelerinin altındadır.
- YAP ve TAZ ekspresyon düzeyleri ilk hasar döneminde belirgin azalırken, iyileşme yanıtının ortaya çıkması ile belirgin geri artış göstermiştir. Geri artış inkomplettir ve kontrol büyüme plağı seviyelerine gelememektedir.
- YAP ve TAZ ekspresyon değişiklikleri birbirleriyle ve PTHrP ekspresyonundaki değişimler ile korelasyon göstermektedir.
- YAP ve TAZ düzeyleri radyoterapi alan grupta takip süresince belirgin değişmektedir.
- Mevcut bulgular bu iki transkripsiyonel ko-aktivatörün iyonizan radyasyon sonrası büyüme plağındaki hasarın ve takip eden iyileşme yanıtının düzenleyicisi olabileceğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Jairam V, Roberts KB, Yu JB. Historical trends in the use of radiation therapy for pediatric cancers: 1973-2008. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;85(3):e151-5.
2. Howlader N NA, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, National Cancer Institute; 2013. [May 15, 2013]; based on November 2012 SEER data submission posted to the SEER web site April 3]. [cited 2021 Jan 22] Available from: URL: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2010/ . [
3. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(15):1572-82.
4. Gawade PL, Hudson MM, Kaste SC, Neglia JP, Wasilewski-Masker K, Constine LS, et al. A systematic review of selected musculoskeletal late effects in survivors of childhood cancer. *Curr Pediatr Rev.* 2014;10(4):249-62.
5. Hoeben BA, Carrie C, Timmermann B, Mandeville HC, Gandola L, Dieckmann K, et al. Management of vertebral radiotherapy dose in paediatric patients with cancer: consensus recommendations from the SIOPE radiotherapy working group. *Lancet Oncol.* 2019;20(3):e155-e66.
6. Argüelles F, Gomar F, Garcia A, Esquerdo J. Irradiation lesions of the growth plate in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 1977;59(1):85-8.
7. Damron TA, Mathur S, Horton JA, Strauss J, Margulies B, Grant W, et al. Temporal changes in PTHrP, Bcl-2, Bax, caspase, TGF-beta, and FGF-2 expression

following growth plate irradiation with or without radioprotectant. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(2):157-67.

8. Pateder DB, Eliseev RA, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Okunieff P, Constone LS, et al. The role of autocrine growth factors in radiation damage to the epiphyseal growth plate. *Radiat Res.* 2001;155(6):847-57.

9. Damron TA, Spadaro JA, Horton JA, Margulies BS, Strauss JA, Farnum CE. Novel radioprotectant drugs for sparing radiation-induced damage to the physis. *Int J Radiat Biol.* 2004;80(3):217-28.

10. Damron TA, Horton JA, Naqvi A, Loomis RM, Margulies BS, Strauss JA, et al. Combination radioprotectors maintain proliferation better than single agents by decreasing early parathyroid hormone-related protein changes after growth plate irradiation. *Radiat Res.* 2006;165(3):350-8.

11. Spadaro JA, Horton JA, Margulies BS, Luther J, Strauss JA, Farnum CE, et al. Radioprotectant combinations spare radiation-induced damage to the physis more than fractionation alone. *Int J Radiat Biol.* 2005;81(10):759-65.

12. Damron TA, Spadaro JA, Horton JA, Margulies BS, Strauss JA, Farnum CE. Combinations of radioprotectants spare radiation-induced damage to the physis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004(426):110-6.

13. Damron TA, Margulies BS, Strauss JA, O'Hara K, Spadaro JA, Farnum CE. Sequential histomorphometric analysis of the growth plate following irradiation with and without radioprotection. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(7):1302-13.

14. Damron TA, Spadaro JA, Tamurian RM, Damron LA. Sparing of radiation-induced damage to the physis: fractionation alone compared to amifostine pretreatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;47(4):1067-71.
15. Horton JA, Margulies BS, Strauss JA, Bariteau JT, Damron TA, Spadaro JA, et al. Restoration of growth plate function following radiotherapy is driven by increased proliferative and synthetic activity of expansions of chondrocytic clones. *J Orthop Res.* 2006;24(10):1945-56.
16. Wang Y, Zhang M, Middleton FA, Horton JA, Pritchard M, Spadaro JA, et al. Connective tissue growth factor and insulin-like growth factor 2 show upregulation in early growth plate radiorecovery response following irradiation. *Cells Tissues Organs.* 2007;186(3):192-203.
17. Damron TA, Horton JA, Pritchard MR, Stringer MT, Margulies BS, Strauss JA, et al. Histomorphometric evidence of growth plate recovery potential after fractionated radiotherapy: an in vivo model. *Radiat Res.* 2008;170(3):284-91.
18. Damron TA, Zhang M, Pritchard MR, Middleton FA, Horton JA, Margulies BM, et al. Microarray cluster analysis of irradiated growth plate zones following laser microdissection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;74(3):949-56.
19. Pritchard MR, Horton JA, Keenawinna LS, Damron TA. Microarray analysis of irradiated growth plate zones following laser microdissection shows later importance of differentially expressed genes during radiorecovery. *Cells Tissues Organs.* 2010;192(4):240-9.
20. Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 2016;30(1):1-17.

21. Fu V, Plouffe SW, Guan KL. The Hippo pathway in organ development, homeostasis, and regeneration. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;49:99-107.
22. Deng Y, Wu A, Li P, Li G, Qin L, Song H, et al. Yap1 Regulates Multiple Steps of Chondrocyte Differentiation during Skeletal Development and Bone Repair. *Cell Rep.* 2016;14(9):2224-37.
23. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003;423(6937):332-6.
24. Tchetina EV, Mwale F, Poole AR. Changes in gene expression associated with matrix turnover, chondrocyte proliferation and hypertrophy in the bovine growth plate. *Acta Naturae.* 2014;6(3):89-97.
25. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):a008334.
26. Hunziker EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech.* 1994;28(6):505-19.
27. Tsang KY, Tsang SW, Chan D, Cheah KS. The chondrocytic journey in endochondral bone growth and skeletal dysplasia. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102(1):52-73.
28. Roselló-Díez A, Joyner AL. Regulation of Long Bone Growth in Vertebrates; It Is Time to Catch Up. *Endocr Rev.* 2015;36(6):646-80.
29. Surmann-Schmitt C, Dietz U, Kireva T, Adam N, Park J, Tagariello A, et al. Ucma, a novel secreted cartilage-specific protein with implications in osteogenesis. *J Biol Chem.* 2008;283(11):7082-93.

30. Tagariello A, Luther J, Streiter M, Didt-Koziel L, Wuelling M, Surmann-Schmitt C, et al. Ucma--A novel secreted factor represents a highly specific marker for distal chondrocytes. *Matrix Biol.* 2008;27(1):3-11.
31. Barna M, Niswander L. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Dev Cell.* 2007;12(6):931-41.
32. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 2002;16(21):2813-28.
33. Pan Q, Wu Y, Lin T, Yao H, Yang Z, Gao G, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces chromatin remodeling and modification at the proximal promoter of Sox9 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379(2):356-61.
34. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997;89(5):747-54.
35. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006;127(3):469-80.
36. Zakany J, Duboule D. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17(4):359-66.
37. Martinez-Sanchez A, Dudek KA, Murphy CL. Regulation of human chondrocyte function through direct inhibition of cartilage master regulator SOX9 by microRNA-145 (miRNA-145). *J Biol Chem.* 2012;287(2):916-24.

38. Hallett SA, Ono W, Ono N. Growth Plate Chondrocytes: Skeletal Development, Growth and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23).
39. Li SW, Prockop DJ, Helminen H, Fässler R, Lapveteläinen T, Kiraly K, et al. Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev.* 1995;9(22):2821-30.
40. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12(2):69-78.
41. Yan Y, Frisén J, Lee MH, Massagué J, Barbacid M. Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev.* 1997;11(8):973-83.
42. Zhang P, Liégeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, et al. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature.* 1997;387(6629):151-8.
43. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:629-48.
44. Farquharson C, Jefferies D, Seawright E, Houston B. Regulation of Chondrocyte Terminal Differentiation in the Postembryonic Growth Plate: The Role of the PTHrP-Indian Hedgehog Axis. *Endocrinology.* 2001;142(9):4131-40.
45. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* 1996;273(5275):613-22.

46. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 1999;13(16):2072-86.
47. Mak KK, Kronenberg HM, Chuang PT, Mackem S, Yang Y. Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development.* 2008;135(11):1947-56.
48. MacLean HE, Guo J, Knight MC, Zhang P, Cobrinik D, Kronenberg HM. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) mediates proliferative actions of PTHrP in chondrocytes. *J Clin Invest.* 2004;113(9):1334-43.
49. Leung KK, Ng LJ, Ho KK, Tam PP, Cheah KS. Different cis-regulatory DNA elements mediate developmental stage- and tissue-specific expression of the human COL2A1 gene in transgenic mice. *J Cell Biol.* 1998;141(6):1291-300.
50. Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol.* 2003;162(5):833-42.
51. Ahmed YA, Tatarczuch L, Pagel CN, Davies HMS, Mirams M, Mackie EJ. Physiological death of hypertrophic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2007;15(5):575-86.
52. Tsang KY, Chan D, Cheah KSE. Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: Death or lineage extension? *Development, Growth & Differentiation.* 2015;57(2):179-92.
53. Pacheco R, Stock H. Effects of Radiation on Bone. *Current Osteoporosis Reports.* 2013;11(4):299-304.

54. Butler MS, Robertson WW, Jr., Rate W, D'Angio GJ, Drummond DS. Skeletal sequelae of radiation therapy for malignant childhood tumors. Clin Orthop Relat Res. 1990(251):235-40.
55. Goldwein JW. Effects of radiation therapy on skeletal growth in childhood. Clin Orthop Relat Res. 1991(262):101-7.
56. Robertson WW, Jr., Butler MS, D'Angio GJ, Rate WR. Leg length discrepancy following irradiation for childhood tumors. J Pediatr Orthop. 1991;11(3):284-7.
57. Pateder DB, Rosier RN, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, D'Souza M, et al. PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes. Exp Cell Res. 2000;256(2):555-62.
58. Margulies BS, Horton JA, Wang Y, Damron TA, Allen MJ. Effects of radiation therapy on chondrocytes in vitro. Calcif Tissue Int. 2006;78(5):302-13.
59. Anderson ND, Colyer RA, Riley LH, Jr. Skeletal changes during prolonged external irradiation: alterations in marrow, growth plate and osteoclast populations. Johns Hopkins Med J. 1979;145(3):73-83.
60. Hiranuma H, Jikko A, Iwamoto M, Fuchihata H. Effects of X-ray irradiation on terminal differentiation and cartilage matrix calcification of rabbit growth plate chondrocytes in culture. Bone. 1996;18(3):233-8.
61. Damron TA, Horton JA, Naqvi A, Margulies B, Strauss J, Grant W, et al. Decreased proliferation precedes growth factor changes after physal irradiation. Clin Orthop Relat Res. 2004(422):233-42.

62. Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, Goltzman D, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol.* 1994;126(6):1611-23.
63. Jikko A, Hiranuma H, Iwamoto M, Kato Y, Okada Y, Fuchihata H. Effects of X irradiation on metabolism of proteoglycans. *Radiat Res.* 1996;146(1):93-9.
64. Zhang M, Wang Y, Middleton FA, Horton JA, Farnum CE, Damron TA. Growth plate zonal microarray analysis shows upregulation of extracellular matrix genes and downregulation of metalloproteinases and cathepsins following irradiation. *Calcif Tissue Int.* 2007;81(1):26-38.
65. Wilsman NJ, Farnum CE, Leiferman EM, Fry M, Barreto C. Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics. *J Orthop Res.* 1996;14(6):927-36.
66. Hunziker EB, Schenk RK, Cruz-Orive LM. Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *J Bone Joint Surg Am.* 1987;69(2):162-73.
67. Nakanishi T, Nishida T, Shimo T, Kobayashi K, Kubo T, Tamatani T, et al. Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology.* 2000;141(1):264-73.
68. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis

- during skeletal development. *Development* (Cambridge, England). 2003;130(12):2779-91.
69. Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, et al. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*. 2002;143(5):1851-7.
70. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev*. 1995;9(5):534-46.
71. Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development*. 1995;121(4):1053-63.
72. Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. The *Drosophila* Mst ortholog, *hippo*, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*. 2003;114(4):457-67.
73. Jia J, Zhang W, Wang B, Trinko R, Jiang J. The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev*. 2003;17(20):2514-9.
74. Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DC, Schiripo TA, Haber D, et al. *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*. 2002;110(4):467-78.

75. Lai ZC, Wei X, Shimizu T, Ramos E, Rohrbaugh M, Nikolaidis N, et al. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*. 2005;120(5):675-85.
76. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell*. 2005;122(3):421-34.
77. Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Verstreken P, Hiesinger PR, Bellen HJ, et al. Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in Drosophila. *Development*. 2002;129(24):5719-30.
78. Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nature Cell Biology*. 2003;5(10):914-20.
79. Kim W, Jho EH. The history and regulatory mechanism of the Hippo pathway. *BMB Rep*. 2018;51(3):106-18.
80. Hilman D, Gat U. The Evolutionary History of YAP and the Hippo/YAP Pathway. *Molecular Biology and Evolution*. 2011;28(8):2403-17.
81. Seb -Pedr s A, Zheng Y, Ruiz-Trillo I, Pan D. Premetazoan origin of the hippo signaling pathway. *Cell Rep*. 2012;1(1):13-20.
82. Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell*. 2007;130(6):1120-33.
83. Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell*. 2010;19(4):491-505.

84. Noguchi S, Saito A, Nagase T. YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).
85. Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):211-26.
86. White SM, Murakami S, Yi C. The complex entanglement of Hippo-Yap/Taz signaling in tumor immunity. *Oncogene.* 2019;38(16):2899-909.
87. Zheng Y, Pan D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. *Dev Cell.* 2019;50(3):264-82.
88. Dey A, Varelas X, Guan KL. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(7):480-94.
89. Heng BC, Zhang X, Aubel D, Bai Y, Li X, Wei Y, et al. Role of YAP/TAZ in Cell Lineage Fate Determination and Related Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:735.
90. Kovar H, Bierbaumer L, Radic-Sarikas B. The YAP/TAZ Pathway in Osteogenesis and Bone Sarcoma Pathogenesis. *Cells.* 2020;9(4).
91. Wang D, He J, Huang B, Liu S, Zhu H, Xu T. Emerging role of the Hippo pathway in autophagy. *Cell Death Dis.* 2020;11(10):880.
92. Szulzewsky F, Holland EC, Vasioukhin V. YAP1 and its fusion proteins in cancer initiation, progression and therapeutic resistance. *Developmental Biology.* 2021.
93. Wu Z, Guan KL. Hippo Signaling in Embryogenesis and Development. *Trends Biochem Sci.* 2021;46(1):51-63.

94. Varelas X, Miller BW, Sopko R, Song S, Gregorieff A, Fellouse FA, et al. The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell*. 2010;18(4):579-91.
95. Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*. 2012;150(4):780-91.
96. Manderfield LJ, Aghajanian H, Engleka KA, Lim LY, Liu F, Jain R, et al. Hippo signaling is required for Notch-dependent smooth muscle differentiation of neural crest. *Development*. 2015;142(17):2962-71.
97. Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen BG, et al. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. *Dev Cell*. 2010;19(6):831-44.
98. Heng BC, Zhang X, Aubel D, Bai Y, Li X, Wei Y, et al. An overview of signaling pathways regulating YAP/TAZ activity. *Cell Mol Life Sci*. 2020.
99. Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *Febs j*. 2006;273(18):4264-76.
100. Chan EHY, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schäfer A, Nigg EA, Silljé HHW. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*. 2005;24(12):2076-86.
101. Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA. The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(1):50-8.

102. Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nature Communications*. 2015;6(1):8357.
103. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*. 2007;21(21):2747-61.
104. Misra JR, Irvine KD. The Hippo Signaling Network and Its Biological Functions. *Annu Rev Genet*. 2018;52:65-87.
105. Liu CY, Zha ZY, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, et al. The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase. *J Biol Chem*. 2010;285(48):37159-69.
106. Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(β -TRCP). *Genes Dev*. 2010;24(1):72-85.
107. Liang N, Zhang C, Dill P, Panasyuk G, Pion D, Koka V, et al. Regulation of YAP by mTOR and autophagy reveals a therapeutic target of tuberous sclerosis complex. *J Exp Med*. 2014;211(11):2249-63.
108. Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev*. 2013;27(4):355-71.
109. Zhang N, Bai H, David KK, Dong J, Zheng Y, Cai J, et al. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Dev Cell*. 2010;19(1):27-38.

110. Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, Tao C, et al. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2006;8(1):27-36.
111. Wang W, Huang J, Chen J. Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *J Biol Chem.* 2011;286(6):4364-70.
112. Karaman R, Halder G. Cell Junctions in Hippo Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(5).
113. Kim NG, Koh E, Chen X, Gumbiner BM. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(29):11930-5.
114. Yu J, Zheng Y, Dong J, Klusza S, Deng WM, Pan D. Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev Cell.* 2010;18(2):288-99.
115. Silvis MR, Kreger BT, Lien WH, Klezovitch O, Rudakova GM, Camargo FD, et al. α -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal.* 2011;4(174):ra33.
116. Vorhagen S, Niessen CM. Mammalian aPKC/Par polarity complex mediated regulation of epithelial division orientation and cell fate. *Exp Cell Res.* 2014;328(2):296-302.

117. Chen CL, Gajewski KM, Hamaratoglu F, Bossuyt W, Sansores-Garcia L, Tao C, et al. The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15810-5.
118. Grzeschik NA, Parsons LM, Allott ML, Harvey KF, Richardson HE. Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Curr Biol*. 2010;20(7):573-81.
119. Dutta S, Mana-Capelli S, Paramasivam M, Dasgupta I, Cirka H, Billiar K, et al. TRIP6 inhibits Hippo signaling in response to tension at adherens junctions. *EMBO Rep*. 2018;19(2):337-50.
120. Dobrokhotov O, Samsonov M, Sokabe M, Hirata H. Mechanoregulation and pathology of YAP/TAZ via Hippo and non-Hippo mechanisms. *Clin Transl Med*. 2018;7(1):23.
121. Ota M, Sasaki H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development*. 2008;135(24):4059-69.
122. Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, et al. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell*. 2009;16(3):398-410.
123. Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev*. 2012;26(1):54-68.

124. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011;474(7350):179-83.
125. Sansores-Garcia L, Bossuyt W, Wada K, Yonemura S, Tao C, Sasaki H, et al. Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *Embo j*. 2011;30(12):2325-35.
126. Kim NG, Gumbiner BM. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. *J Cell Biol*. 2015;210(3):503-15.
127. Wang L, Luo J-Y, Li B, Tian XY, Chen L-J, Huang Y, et al. Integrin-YAP/TAZ-JNK cascade mediates atheroprotective effect of unidirectional shear flow. *Nature*. 2016;540(7634):579-82.
128. Sorrentino G, Ruggeri N, Specchia V, Cordenonsi M, Mano M, Dupont S, et al. Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol*. 2014;16(4):357-66.
129. Mo JS, Meng Z, Kim YC, Park HW, Hansen CG, Kim S, et al. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat Cell Biol*. 2015;17(4):500-10.
130. Ma B, Chen Y, Chen L, Cheng H, Mu C, Li J, et al. Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. *Nat Cell Biol*. 2015;17(1):95-103.
131. Peng C, Zhu Y, Zhang W, Liao Q, Chen Y, Zhao X, et al. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by Glucose Sensor O-GlcNAcylation. *Mol Cell*. 2017;68(3):591-604.e5.

132. Hong AW, Meng Z, Yuan HX, Plouffe SW, Moon S, Kim W, et al. Osmotic stress-induced phosphorylation by NLK at Ser128 activates YAP. *EMBO Rep.* 2017;18(1):72-86.
133. Kim W, Kim M, Jho EH. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J.* 2013;450(1):9-21.
134. Park HW, Kim YC, Yu B, Moroishi T, Mo JS, Plouffe SW, et al. Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell.* 2015;162(4):780-94.
135. Cai J, Maitra A, Anders RA, Taketo MM, Pan D. β -Catenin destruction complex-independent regulation of Hippo-YAP signaling by APC in intestinal tumorigenesis. *Genes Dev.* 2015;29(14):1493-506.
136. Miller E, Yang J, DeRan M, Wu C, Su AI, Bonamy GM, et al. Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP. *Chem Biol.* 2012;19(8):955-62.
137. Heng BC, Aubel D, Fussenegger M. An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. *Biotechnol Adv.* 2013;31(8):1676-94.
138. Tschaharganeh DF, Chen X, Latzko P, Malz M, Gaida MM, Felix K, et al. Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2013;144(7):1530-42.e12.
139. Attisano L, Wrana JL. Signal integration in TGF- β , WNT, and Hippo pathways. *F1000Prime Rep.* 2013;5:17.
140. Reggiani F, Gobbi G, Ciarrocchi A, Sancisi V. YAP and TAZ Are Not Identical Twins. *Trends Biochem Sci.* 2020.

141. Webb C, Upadhyay A, Giuntini F, Eggleston I, Furutani-Seiki M, Ishima R, et al. Structural features and ligand binding properties of tandem WW domains from YAP and TAZ, nuclear effectors of the Hippo pathway. *Biochemistry*. 2011;50(16):3300-9.
142. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev*. 2008;22(14):1962-71.
143. Hansen CG, Moroishi T, Guan KL. YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol*. 2015;25(9):499-513.
144. Kim MK, Jang JW, Bae SC. DNA binding partners of YAP/TAZ. *BMB Rep*. 2018;51(3):126-33.
145. Jiao S, Wang H, Shi Z, Dong A, Zhang W, Song X, et al. A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer Cell*. 2014;25(2):166-80.
146. Koontz LM, Liu-Chittenden Y, Yin F, Zheng Y, Yu J, Huang B, et al. The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression. *Dev Cell*. 2013;25(4):388-401.
147. Deng X, Fang L. VGLL4 is a transcriptional cofactor acting as a novel tumor suppressor via interacting with TEADs. *Am J Cancer Res*. 2018;8(6):932-43.
148. Morin-Kensicki EM, Boone BN, Howell M, Stonebraker JR, Teed J, Alb JG, et al. Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Mol Cell Biol*. 2006;26(1):77-87.

149. Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, et al. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(3):F542-53.
150. Mitani A, Nagase T, Fukuchi K, Aburatani H, Makita R, Kurihara H. Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(4):326-38.
151. Galli GG, Carrara M, Yuan WC, Valdes-Quezada C, Gurung B, Pepe-Mooney B, et al. YAP Drives Growth by Controlling Transcriptional Pause Release from Dynamic Enhancers. *Mol Cell*. 2015;60(2):328-37.
152. Davis JR, Tapon N. Hippo signalling during development. *Development*. 2019;146(18).
153. Gao T, Zhou D, Yang C, Singh T, Penzo-Méndez A, Maddipati R, et al. Hippo signaling regulates differentiation and maintenance in the exocrine pancreas. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1543-53, 53.e1.
154. George NM, Day CE, Boerner BP, Johnson RL, Sarvetnick NE. Hippo signaling regulates pancreas development through inactivation of Yap. *Mol Cell Biol*. 2012;32(24):5116-28.
155. Mahoney JE, Mori M, Szymaniak AD, Varelas X, Cardoso WV. The hippo pathway effector Yap controls patterning and differentiation of airway epithelial progenitors. *Dev Cell*. 2014;30(2):137-50.
156. Lian I, Kim J, Okazawa H, Zhao J, Zhao B, Yu J, et al. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2010;24(11):1106-18.

157. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Murakami M, Qi X, McAnally J, et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(34):13839-44.
158. Heallen T, Morikawa Y, Leach J, Tao G, Willerson JT, Johnson RL, et al. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development*. 2013;140(23):4683-90.
159. Chen Y, Han H, Seo G, Vargas RE, Yang B, Chuc K, et al. Systematic analysis of the Hippo pathway organization and oncogenic alteration in evolution. *Scientific Reports*. 2020;10(1):3173.
160. Han Y. Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med*. 2019;17(1):116.
161. Pan J-X, Xiong L, Zhao K, Zeng P, Wang B, Tang F-L, et al. YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating β -catenin signaling. *Bone Research*. 2018;6(1):18.
162. Pan JX, Xiong L, Zhao K, Zeng P, Wang B, Tang FL, et al. YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating β -catenin signaling. *Bone Res*. 2018;6:18.
163. Karystinou A, Roelofs AJ, Neve A, Cantatore FP, Wackerhage H, De Bari C. Yes-associated protein (YAP) is a negative regulator of chondrogenesis in mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):147.
164. Seo E, Basu-Roy U, Gunaratne PH, Coarfa C, Lim DS, Basilico C, et al. SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. *Cell Rep*. 2013;3(6):2075-87.

165. Yang JY, Cho SW, An JH, Jung JY, Kim SW, Kim SY, et al. Osteoblast-targeted overexpression of TAZ increases bone mass in vivo. *PLoS One*. 2013;8(2):e56585.
166. Cui CB, Cooper LF, Yang X, Karsenty G, Aukhil I. Transcriptional coactivation of bone-specific transcription factor Cbfa1 by TAZ. *Mol Cell Biol*. 2003;23(3):1004-13.
167. Tang Y, Feinberg T, Keller ET, Li XY, Weiss SJ. Snail/Slug binding interactions with YAP/TAZ control skeletal stem cell self-renewal and differentiation. *Nat Cell Biol*. 2016;18(9):917-29.
168. Tang Y, Weiss SJ. Snail/Slug-YAP/TAZ complexes cooperatively regulate mesenchymal stem cell function and bone formation. *Cell Cycle*. 2017;16(5):399-405.
169. Song H, Kim H, Lee K, Lee DH, Kim TS, Song JY, et al. Ablation of Rassf2 induces bone defects and subsequent haematopoietic anomalies in mice. *Embo j*. 2012;31(5):1147-59.
170. Vanyai HK, Prin F, Guillermin O, Marzook B, Boeing S, Howson A, et al. Control of skeletal morphogenesis by the Hippo-YAP/TAZ pathway. *Development*. 2020;147(21).
171. Halder G, Dupont S, Piccolo S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(9):591-600.
172. Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol*. 2011;13(8):877-83.

173. Zhong W, Li Y, Li L, Zhang W, Wang S, Zheng X. YAP-mediated regulation of the chondrogenic phenotype in response to matrix elasticity. *J Mol Histol.* 2013;44(5):587-95.
174. Tang Y, Rowe RG, Botvinick EL, Kurup A, Putnam AJ, Seiki M, et al. MT1-MMP-dependent control of skeletal stem cell commitment via a β 1-integrin/YAP/TAZ signaling axis. *Dev Cell.* 2013;25(4):402-16.
175. Zhong W, Zhang W, Wang S, Qin J. Regulation of fibrochondrogenesis of mesenchymal stem cells in an integrated microfluidic platform embedded with biomimetic nanofibrous scaffolds. *PLoS One.* 2013;8(4):e61283.
176. Mia MM, Cibi DM, Binte Abdul Ghani SA, Singh A, Tee N, Sivakumar V, et al. Loss of Yap/taz in cardiac fibroblasts attenuates adverse remodeling and improves cardiac function. *Cardiovasc Res.* 2021.
177. Sharifi-Sanjani M, Berman M, Goncharov D, Alhamaydeh M, Avolio TG, Baust J, et al. Yes-Associated Protein (Yap) Is Up-Regulated in Heart Failure and Promotes Cardiac Fibroblast Proliferation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
178. Zheng Z, Li C, Shao G, Li J, Xu K, Zhao Z, et al. Hippo-YAP/MCP-1 mediated tubular maladaptive repair promote inflammation in renal failed recovery after ischemic AKI. *Cell Death Dis.* 2021;12(8):754.
179. Goto H, Nishio M, To Y, Oishi T, Miyachi Y, Maehama T, et al. Loss of Mob1a/b in mice results in chondrodysplasia due to YAP1/TAZ-TEAD-dependent repression of SOX9. *Development.* 2018;145(6).

180. Zhang M, Pritchard MR, Middleton FA, Horton JA, Damron TA. Microarray analysis of perichondral and reserve growth plate zones identifies differential gene expressions and signal pathways. *Bone*. 2008;43(3):511-20.
181. Engström H, Jansson JO, Engström C. Effect of local irradiation on longitudinal bone growth in the rat. A tetracycline labelling investigation. *Acta Radiol Oncol*. 1983;22(2):129-33.
182. Bakker B, van der Eerden BC, Koppelaar DW, Karperien M, Wit JM. Effect of x-irradiation on growth and the expression of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in the tibial growth plate of the rat. *Horm Res*. 2003;59(1):35-41.
183. Amling M, Neff L, Tanaka S, Inoue D, Kuida K, Weir E, et al. Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *The Journal of cell biology*. 1997;136(1):205-13.
184. Liu S, Li K, Wagner Florencio L, Tang L, Heallen TR, Leach JP, et al. Gene therapy knockdown of Hippo signaling induces cardiomyocyte renewal in pigs after myocardial infarction. *Sci Transl Med*. 2021;13(600).
185. Wang J, Liu S, Heallen T, Martin JF. The Hippo pathway in the heart: pivotal roles in development, disease, and regeneration. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(11):672-84.
186. Liu Q, Pan S, Liu S, Zhang S, Willerson JT, Martin JF, et al. Suppressing Hippo signaling in the stem cell niche promotes skeletal muscle regeneration. *STEM CELLS*. 2021;39(6):737-49.

187. Li Y, Yang S, Qin L, Yang S. TAZ is required for chondrogenesis and skeletal development. *Cell Discovery*. 2021;7(1):26.
188. Prein C, Warmbold N, Farkas Z, Schieker M, Aszodi A, Clausen-Schaumann H. Structural and mechanical properties of the proliferative zone of the developing murine growth plate cartilage assessed by atomic force microscopy. *Matrix Biology*. 2016;50:1-15.
189. Villemure I, Stokes IA. Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *J Biomech*. 2009;42(12):1793-803.
190. Smits P, Dy P, Mitra S, Lefebvre V. Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *The Journal of cell biology*. 2004;164(5):747-58.
191. Wang G, Woods A, Sabari S, Pagnotta L, Stanton LA, Beier F. RhoA/ROCK signaling suppresses hypertrophic chondrocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2004;279(13):13205-14.
192. Gill KS, Beier F, Goldberg HA. Rho-ROCK signaling differentially regulates chondrocyte spreading on fibronectin and bone sialoprotein. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(1):C38-C49.
193. Wong WY, Gilman K, Limesand KH. Yap activation in irradiated parotid salivary glands is regulated by ROCK activity. *PLOS ONE*. 2020;15(11):e0232921.
194. Kim N-G, Gumbiner BM. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK–Src–PI3K pathway. *Journal of Cell Biology*. 2015;210(3):503-15.

195. McKee C, Hong Y, Yao D, Chaudhry GR. Compression Induced Chondrogenic Differentiation of Embryonic Stem Cells in Three-Dimensional Polydimethylsiloxane Scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2017;23(9-10):426-35.
196. Kitazono Hammell MT, Bunin N, Edgar JC, Jaramillo D. Paraphyseal changes on bone-age studies predict risk of delayed radiation-associated skeletal complications following total body irradiation. *Pediatr Radiol*. 2013;43(9):1152-8.
197. Chung R, Xian CJ. Recent research on the growth plate: Mechanisms for growth plate injury repair and potential cell-based therapies for regeneration. *J Mol Endocrinol*. 2014;53(1):T45-61.
198. Margulies B, Morgan H, Allen M, Strauss J, Spadaro J, Damron T. Transiently increased bone density after irradiation and the radioprotectant drug amifostine in a rat model. *Am J Clin Oncol*. 2003;26(4):e106-14.
199. Pateder DB, Sheu TJ, O'Keefe RJ, Puzas JE, Schwarz EM, Constone LS, et al. Role of pentoxifylline in preventing radiation damage to epiphyseal growth plate chondrocytes. *Radiat Res*. 2002;157(1):62-8.
200. Damron TA, Margulies B, Biskup D, Spadaro JA. Amifostine before fractionated irradiation protects bone growth in rats better than fractionation alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;50(2):479-83.
201. Damron TA, Spadaro JA, Margulies B, Damron LA. Dose response of amifostine in protection of growth plate function from irradiation effects. *Int J Cancer*. 2000;90(2):73-9.

202. Bai H, Zhang N, Xu Y, Chen Q, Khan M, Potter JJ, et al. Yes-associated protein regulates the hepatic response after bile duct ligation. *Hepatology*. 2012;56(3):1097-107.
203. Shalhout SZ, Yang P-Y, Grzelak EM, Nutsch K, Shao S, Zambaldo C, et al. YAP-dependent proliferation by a small molecule targeting annexin A2. *Nature Chemical Biology*. 2021;17(7):767-75.
204. Szulzewsky F, Holland EC, Vasioukhin V. YAP1 and its fusion proteins in cancer initiation, progression and therapeutic resistance. *Developmental Biology*. 2021;475:205-21.
205. Snigdha K, Gangwani KS, Lapalikar GV, Singh A, Kango-Singh M. Hippo Signaling in Cancer: Lessons From Drosophila Models. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:85.
206. Ahmed AA, Mohamed AD, Gener M, Li W, Taboada E. YAP and the Hippo pathway in pediatric cancer. *Mol Cell Oncol*. 2017;4(3):e1295127.
207. Liu F, Lagares D, Choi KM, Stopfer L, Marinković A, Vrbanc V, et al. Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(4):L344-57.
208. Hu D, Jiang J, Ding B, Xue K, Sun X, Qian S. Mechanical Strain Regulates Myofibroblast Differentiation of Human Scleral Fibroblasts by YAP. *Front Physiol*. 2021;12:712509.
209. Paulino AC. Late effects of radiotherapy for pediatric extremity sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;60(1):265-74.

210. Hartley KA, Li C, Laningham FH, Krasin MJ, Xiong X, Merchant TE. Vertebral Body Growth After Craniospinal Irradiation. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. 2008;70(5):1343-9.



ÖZET

HİPPO-YAP/TAZ SİNYAL YOLAĞININ BÜYÜME PLAKLARININ İYONİZAN RADYASYONA ERKEN CEVABINDAKİ ROLÜ

Radyoterapi çocukluk çağı tümörlerinin tedavisinde major bir role sahiptir. Teknik gelişmelere rağmen radyosensitif bir doku olan büyüme plaklarının radyasyon maruziyeti çoğu hasta için kaçınılmazdır. Büyüme plağının radyasyon ile hasarı sonrası kompensatuar iyileşme yanıtının oluştuğu bilinmektedir. Fakat bu yanıt inkomplettir ve düzenleyici mekanizmaları hakkındaki bilgi kısıtlıdır. Çalışmamız rejeneratif süreçlerin major düzenleyicisi olan YAP/TAZ transkripsiyonel ko-aktivatörlerinin büyüme plaklarının radyasyona cevabındaki rolünü ortaya çıkarmayı amaçlamaktadır. Bu amaçla 36 adet 8 haftalık tavşanın sol alt ekstremitte distal femur ve proksimal tibial büyüme plaklarına 5 fraksiyonda 17.5 Gy radyoterapi verilmiştir. Tavşanlar sırasıyla 1, 7, 10, 14, 17 ve 21 gün takip süresi olan 6 farklı gruba ayrılmıştır. Takip süresi sonunda eksize edilen büyüme plaklarına histomorfolojik inceleme için hematoksilin eozin ve PTHrP, YAP, TAZ için immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar sağ taraflı kontrol büyüme plaklarındaki sonuçlarla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Nükleer YAP ve TAZ ekspresyon seviyeleri ilk hasar süresince belirgin azalarak 7. günde en düşük seviyeye inmektedir. İyileşme yanıtının ortaya çıkması ile birlikte YAP/TAZ ekspresyonları da belirgin yükselmektedir. YAP, TAZ ve PTHrP ekspresyon seviyeleri deney süresince radyoterapi gruplarında daha düşük seviyede izlenmiştir. YAP/TAZ ekspresyonundaki değişiklikler PTHrP ekspresyonundaki ve histomorfolojik değişikliklerle korelasyon göstermektedir. Bu bulgular iyonizan

radasyon sonra büyüme plağında ortaya çıkan hasarda YAP/TAZ aktivitesinin azalmasının ve hasar sonrası iyileşme yanıtında artan YAP/TAZ aktivitesinin düzenleyici olabileceğini göstermektedir. Yetersiz YAP/TAZ yanıtı inkomplet tamir yanıtının sebebi olabilir.

Anahtar Kelimeler: YAP, TAZ, iyileşme cevabı

ABSTRACT

ROLE OF THE HIPPO-YAP/TAZ SIGNALING PATHWAY ON EARLY RESPONSE OF GROWTH PLATE TO IONIZING RADIATION

Radiotherapy has a major role in the childhood malignancies. The radiation exposure of the growth plates, a highly radiosensitive tissue, is inevitable in despite of advanced radiotherapy techniques. There is a compensatory recovery response in growth plate after the ionizing radiation damage. Unfortunately, this repair response is incomplete and the regulatory mechanisms of radiorecovery doesn't well defined. Our study aims to discover the role of the YAP/TAZ transcriptional co-activators, a major regulator of tissue regeneration, in the response of the growth plate to radiotherapy. In line with this purpose, the distal femur and proximal tibial growth plates of left extremity of 36 weanling rabbits were irradiated with 17.5 Gy radiotherapy in 5 fractions. The rabbits were followed by 1, 7, 10, 14, 17 and 21 days, respectively, in different six groups. The hematoxylin-eosin staining for histomorphological assessment and the immunohistochemical staining for PTHrP, YAP and TAZ was performed. The obtained results were evaluated in comparison with the results of right-sided unirradiated control growth plates. The nuclear expressions of YAP/TAZ decreased during early radiation damage and reached a nadir at one week. The expressions of YAP/TAZ showed apparent increase synchronously with development of radiorecovery. The expressions of PTHrP, YAP and TAZ were lower than controls at each time point. The expression change of YAP/TAZ had correlation to histomorphological and PTHrP changes. These findings showed that YAP/TAZ can play a critical regulatory role both radiation

damage and early radiorecovery. Inadequate YAP/TAZ response may be the cause of incompleteness of radiorecovery process.

Keywords : YAP, TAZ, radiorecovery



EK-1 – ETİK KURUL ONAYI

Evrak Tarih ve Sayısı: 29.07.2020-E.80966



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Bekir Eren ÇETİN
Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Bekir Eren ÇETİN, Muhammed Ertuğrul ŞENTÜRK, Aylin SEPİCİ DİNÇEL ve Serap ÇATLI DİNÇ'ten oluşan, G.Ü.ET-20.043 kod numaralı ve *'Hippo-YAP/TAZ Sinyal Yolağının Büyüme Plaklarının İyonizan Radyasyona Erken Cevabındaki Rolü'* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-20.043 and entitled *"Role of the Hippo-YAP/TAZ Signaling Pathway on Early Response of Growth Plate to Ionizing Radiation"* is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Tavşan Yeni Zelanda
Hayvan Sayısı : 36

Ek: 1 Liste



Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ :26/06/2020		TOPLANTI SAYISI : 04	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIACIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Öğr.Gör.Dr.Seyda DİKER			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

EK-2 – ÖZGEÇMİŞ

ADI : Muhammed Ertuğrul

SOYADI : Şentürk

DOĞUM YERİ VE TARİHİ :

EĞİTİMİ

- Tıpta Uzmanlık, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Türkiye 2016 - Devam Ediyor
- Lisans, Fatih Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıp Pr. (Tam Burslu), Türkiye 2009 - Devam Ediyor
- Lisans, Turgut Özal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıp Pr. (Tam Burslu), Türkiye 2009 - 2015

YABANCI DİLİ : İngilizce

ÜYE OLDUĞU BİLİMSEL KURULUŞLAR

- TROD (Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği)

BİLİMSEL ETKİNLİKLERİ

SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

I. Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor Reduces Radiation-induced Periprosthetic Capsular Fibrosis.

Erpolat O. P. , Senturk E., Saribas S., Pasinlioglu B., Gulbahar O., Tuncer S., Demircan V., Catli Dinc S., Polat O., Elmas C.

The Journal of surgical research, cilt.263, ss.167-175, 2021 (SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi)

II. A Comparison of Ramipril and Bevacizumab to Mitigate Radiation-Induced Brain Necrosis: An Experimental Study.

ERPOLAT Ö. P. , Demircan N. V. , Sarıbas G. S. , Kuzucu P., Senturk E., ELMAS Ç., BÖRCEK A. Ö. , KURT G.

World neurosurgery, cilt.144, 2020 (SCI İndekslerine Giren Dergi)

III. Results of Chordoma Patients Treated by Different Approaches in a Single Institution.

AKMANSU M., KURT G., Demircan V., Senturk E.

Turkish neurosurgery, cilt.30, sa.3, ss.366-370, 2020 (SCI Expanded İndekslerine Giren Dergi)

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

I. Effects of palliative radiotherapy and bisphosphonate usage on bone turnover marker levels in cancer patients with osteolytic bone metastases

GÖKSEL F., AKMANSU M., ŞENTÜRK M. E. , DEMİRCİOĞLU F.

JOINT DISEASES AND RELATED SURGERY, cilt.32, sa.3, 2021 (Diğer Kurumların Hakemli Dergileri)

II. Dosimetric Evaluation of Two Different Total Body Irradiation Techniques Using Eclipse Treatment Planning System

ÇATLI DİNÇ S., DEMİRCAN N. V. , TURAN A. N. , ŞENTÜRK M. E. , KARAHACIOĞLU E., BORA H.

Selçuk Tıp Dergisi (Yayın kabul edildi basım aşamasında), 2020
(Diğer Kurumların Hakemli Dergileri)

III. Meme Kanserli Olgularda Adjuvan Radyoterapinin Tiroid Fonksiyonları Üzerine Etkisi

DEMİRCAN N. V. , ŞENTÜRK M. E. , ÇATLI DİNÇ S., AKYOL O.,
KILIÇ D.

Genel Tıp Dergisi, cilt.29, sa.3, ss.124-129, 2019 (Diğer Kurumların Hakemli Dergileri)

IV. Meme kanserli olgularda adjuvan radyoterapinin tiroid fonksiyonları üzerine etkisi

DEMİRCAN N. V. , ŞENTÜRK M. E. , ÇATLI DİNÇ S., AKYOL O.,
KILIÇ D.

Genel Tıp Dergisi, cilt.29, ss.124-129, 2019 (Diğer Kurumların Hakemli Dergileri)

V. THE EVALUATION OF DOSE DISTRIBUTION OF VERTEBRAL GROWTH PLATES IN PEDIATRIC PATIENTS WHO UNDERWENT CRANIOSPINAL RADIOTHERAPY

ÇATLI DİNÇ S., ŞENTÜRK M. E. , TURAN ÜÇGÜL A. N. ,
DEMİRCAN N. V. , BORA H.

Annals of Medical Research, cilt.26, sa.9, ss.1852, 2019 (Diğer Kurumların Hakemli Dergileri)

Kitap & Kitap Bölümleri

I. Radyoterapi ve Hipoksiyle Başa Çıkma Tedavileri

ÇETİN B. E. , ŞENTÜRK M. E.

Radyoterapiyle Eşzamanlı Tedaviler ve Güncel Yaklaşımlar,
Karahacıoğlu Eray, Çetin Bekir Eren, Editör, Türkiye Klinikleri, ss.30-35,
2021

**II. Preklinik ve Klinik Kanıtları ile Radyoterapi ve İmmünoterapi
Beraber Kullanımı**

ŞENTÜRK M. E. , AKMANSU M.

Radyoterapiyle Eşzamanlı Tedaviler ve Güncel Yaklaşımlar,
Karahacıoğlu Eray, Çetin Eren, Editör, Türkiye Klinikleri, ss.12-23, 2021

III. Radyoterapi ve Eşzamanlı Hipertermi Tedavileri

ŞENTÜRK M. E. , ERPOLAT Ö. P.

Radyoterapiyle Eşzamanlı Tedaviler ve Güncel Yaklaşımlar,
Karahacıoğlu Eray, Çetin Bekir Eren, Editör, Türkiye Klinikleri, ss.24-29,
2021

**Hakemli Kongre / Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan
Yayınlar**

**I. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Reduces Radiation
Induced Fibrosis in Peri-Capsular Implant.**

ERPOLAT Ö. P. , ŞENTÜRK M. E. , SARIBAŞ G. S. , PASİNLİOĞLU
B., GÜLBAHAR Ö., TUNCER S., DEMİRCAN N. V. , ÇATLI DİNÇ S.,
POLAT Ö., ELMAS Ç.

International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.
ASTRO., 24 - 28 Ekim 2020

**II. THE EFFECT OF PREBIOTICS, FIBER AND GLUTAMINE ON
THE PREVENTION OF ACUTE RADIATION ENTERITIS AND**

THEIR IMPACT ON QUALITY OF LIFE IN PATIENTS WITH PROSTATE CANCER

AKMANSU M., ŞENTÜRK M. E.

ESPEN 2020 VIRTUAL CONGRESS, 19 - 21 Eylül 2020

III. Meme Kanserli Olgularda Adjuvan Radyoterapinin Tiroid Fonksiyonları Üzerine Etkisi

DEMİRCAN N. V. , ŞENTÜRK M. E. , ÇATLI DİNÇ S., AKYOL O., KILIÇ D.

13. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, Türkiye, 27 Nisan - 01 Mayıs 2018

IV. Comparison of Nutritional Assesment Tests in Oncology Patients

AKMANSU M., ŞENTÜRK M. E. , YALMAN D.

41st ESPEN Congress on Clinical Nutrition and Metabolism, Krakow, Polonya, 31 Ağustos - 03 Eylül 2019, cilt.38, ss.199

V. Tüm Vücut Işınlamada Farklı Hasta Pozisyonlarının Tedavi Hacmi ve Kritik Organlar Üzerindeki Doz Dağılımına Etkisi

DEMİRCAN N. V. , ÇATLI DİNÇ S., TURAN A. N. , ŞENTÜRK M. E. , KARAHACIOĞLU E., BORA H.

23. Ulusal Kanser Kongresi, Türkiye, 17 - 21 Nisan 2019

VI. Effects of palliative radiotherapy and biophosphonate use on bone turnover marker levels in cancer patients with osteolytic bone metastases

göksel f., AKMANSU M., ŞENTÜRK M. E.

ESPEN Congress on Clinical Nutrition 2018, 1 - 04 Eylül 2018,
cilt.37, ss.184-185

VII. Atipik Menenjiom Tanılı Hastalarda Gross-Total Rezeksiyon Sonrası Uygulanan Radyoterapinin Etkisinin Değerlendirilmesi

ŞENTÜRK M. E. , ERPOLAT Ö. P. , ÇELTİKÇİ E., AKGÜL G.,
EMMEZ Ö. H. , KAYMAZ A. M.

13. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, Türkiye, 27 Nisan -
01 Mayıs 2018

VIII. Akciğer Radyoterapisinde Tedavi Alanı Doğruluk Kontrolünde Karina ve Vertebranın Karşılaştırılması

İLİ M., DEMİRCAN N. V. , ÇATLI DİNÇ S., ŞENTÜRK M. E. , BORA
H.

13. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, Türkiye, 27 - 01
Nisan 2018

IX. Glioblastom Tanılı Hastalarda IMRT ve Helikal Tomoterapi Tekniği Kullanılarak Eşzamanlı ve Ardışık Boost Radyoterapisinin Dozimetrik Olarak Karşılaştırılması

AKYOL O., ERPOLAT Ö. P. , GÜNAY E., ÇATLI DİNÇ S., ŞENTÜRK
M. E. , MERİÇ N.

16.Ulusal Medikal Fizik Kongresi, Türkiye, 28 - 30 Ekim 2017

Desteklenen Projeler

ÇATLI DİNÇ S., ŞENTÜRK M. E. , GÜLBAHAR Ö., ELMAS Ç.,
ERPOLAT Ö. P. , Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, ACE inhibitörlerinin
radyoterapi sonrası implant çevresindeki kapsüler değişiklikler üzerine etkisi,
2017 - 2019