

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOWN SENDROMLU VE SAĞLIKLI KONTROLLERİNDEKİ  
NOR AKTİVİTELERİNİN LENFOSİT İNTERFAZ VE  
METAFAZINDA KARŞILAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Nalan İMAMOĞLU**

**Tezi Yöneten  
Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Mayıs 2006  
KAYSERİ**

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOWN SENDROMLU VE SAĞLIKLI KONTROLLERİNDEKİ NOR  
AKTİVİTELERİNİN LENFOSİT İNTERFAZ VE METAFAZINDA  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Nalan İMAMOĞLU**

**Tezi Yöneten  
Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Bu tez Araştırma Fonu tarafından 01.11.06 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Mayıs 2006  
KAYSERİ**

**Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ** danışmanlığında **Nalan İMAMOĞLU** tarafından hazırlanan “**Down Sendromlu ve Sağlıklı Kontrollerindeki NOR Aktivitelerinin Lenfosit İnterfaz ve Metafazında Karşılaştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

**26.05.2006**

**JÜRİ :**

**İmza**

**Üye : Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ (Danışman)**

**Üye : Prof.Dr.Ahmet ÇOLAK**

**Üye : Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ**

**Üye : Prof.Dr.Munis DÜNDAR**

**Üye : Doç.Dr.Nurhan CÜCER**

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Enstitü Müdürü**  
**Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU**

## **TEŞEKKÜR**

Tez çalışmalarım süresince yardım ve önerilerini esirgemeyen, sıkıntıya düştüğüm anlarda her türlü desteği sağlayan, değerli hocam tez yöneticim Sayın Prof.Dr. Halil DEMİRTAŞ'a, çalışmalarım boyunca beni destekleyen ve yönlendiren hocalarım Sayın Prof.Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ ve Doç.Dr. Nurhan CÜCER'e teşekkürü borç bilirim. Ayrıca bu araştırma sırasında bana destek olan arkadaşım Arş.Gör. Zuhâl HAMURCU'ya da teşekkür ederim.

Bu araştırmanın yapılması ve tezin hazırlanması sırasında, her aşamada maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ve yoğun çalışma dönemlerinde beni anlayışla karşılayan, sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**DOWN SENDROMLU VE SAĞLIKLI KONTROLLERİNDEKİ NOR  
AKTİVİTELERİNİN LENFOSİT İNTERFAZ VE METAFAZINDA  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**ÖZET**

Trizomi 21'li (Down sendromlu, DS'lu) hastalarda çekirdekçik oluşturan bölgelerin (NORs) ifadelerinin ayarlanması tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmanın amacı, DS'lu bireylerin ve sağlıklı kontrollerin gittikçe artacak şekilde uyarılan lenfositlerinde metafaz kromozomlarında ve interfaz çekirdekçiklerindeki NORs ifadelerini karşılaştırmaktır.

Alışılmış periferik kan kültürü (72 saat) ve kromozom hazırlama işlemi, DS'lu hasta (N=30) ve sağlıklı kontrollerinden (N=24) alınan kan örneklerinin, aynı fakat konsantrasyonu gittikçe artan şekilde: 0.37 ml, 0.75 ml, 1.48 ml ve 2.21 ml fitohemaglutinin (FHE) içeren 100 ml'lik ortamlara ekilmesi ile yapılmıştır. Birey ve konsantrasyon başına aktif NORs taşıyan kromozomların (AgNOR+ kromozom) ortalamalarını hesaplamak ve interfazda NOR alanı/Total Çekirdek alanı (NORa/TÇa) oranını belirlemek için konsantrasyon başına art arda gelen 100 metafaz ve 50 interfaz çekirdeği analiz edilmiştir.

DS'lu hastaların lenfositlerindeki AgNOR(+) kromozom sayısının ve NORa/TÇa oranının, sağlıklı kontrollerdeki durumun tersine, kültür ortamındaki FHE konsantrasyonuna uygun olarak arttığı bulunmuştur.

Sonuç olarak DS'luların lenfositleri, kontrol hücrelerinin kısıtladığı NOR ifadelerini azalan yönde ayarlayamamaktadırlar. Bu in vitro bulgular, uterusdaki organogenez sırasında gereksiz rRNA ve AgNOR protein üretimine dayalı atık enerjinin neden olduğu DS'lu fenotipini açıklamada ipucu verebilecektir. Bu sonuçlar bize, DS lenfositlerindeki rutin NOR'u doğru değerlendirmemizde/ yorumlanmamızda yardımcı olabilirler.

**Anahtar kelimeler:** Down sendromu, FHE konsantrasyonu, gümüş boyama, interfaz NORs, metafaz NORs.

**COMPARISON OF THE NOR ACTIVITIES BETWEEN DOWN SYNDROME PATIENTS AND HEALTHY CONTROLS THROUGH INTERPHASE AND METAPHASE OF LYMPHOCYTES**

**ABSTRACT**

The regulation of the nucleolus organizer regions (NORs) expression in trisomy 21 (Down syndrome, DS) cells is not fully explained. The objective of this work is to compare the NORs expression on metaphase chromosomes and in interphase nucleoli in gradiently stimulated lymphocytes of DS patients and healthy controls.

Conventional peripheral blood culture (72h) and chromosome preparation procedure have been used except that blood samples from DS patients (N=30) and healthy controls (N=24) have been cultivated in the same but gradiently increasing phytohemagglutinin (PHA) concentration containing: 0.37 ml, 0.75 ml, 1.48 ml and 2.21 ml of PHA / 100 ml of medium. 100 consecutive metaphases and 50 interphase nucleus per concentration have been analyzed to score the means of the active NORs bearing metaphase chromosomes (AgNOR+ chromosome) number and to determine ratio of the NOR area/ Total Nucleus area (NORa/TNa) in interphase nucleoli per the individual and the concentration.

It's found that AgNOR(+) chromosome number and NORa/TNa ratio in DS patients' lymphocytes increase in concordance to the gradient of the PHA concentration in the culture medium unlike the case in the healthy controls.

In results, DS's lymphocytes do not down-regulate their NOR expression in the limit of the controls' cells. These *in vitro* results may serve as a clue for the explanation of DS phenotype due to the wasted energy, producing unnecessary rRNA transcripts and AgNOR proteins *in utero* during the organogenesis. These results may also help us to take precaution in routine work of the NORs evaluation/ interpretation in DS lymphocytes.

**Key words:** Down syndrome, interphase NORs, metaphase NORs, PHA concentration, silver stain.

**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	I
KABUL ONAY SAYFASI .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLO LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR .....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. ÇEKİRDEKÇİK OLUŞTURAN BÖLGELER (Nucleolar Organizer Regions; NORs) .....	4
2.2.1. İnterfaz ve Metafaz NOR'ları .....	6
2.2. GÜMÜŞ NİTRAT BOYAMA (AgNOR BOYAMA) VE NOR'LARLA İLİŞKİSİ ...	8
2.3. AgNOR BOYAMANIN STANDARTLAŞTIRILMASININ ÖNEMİ .....	13
2.4. NOR PROTEİNLERİ (AgNOR PROTEİNLERİ) .....	15
2.4.1. Nükleofosmin (B23 proteini, neumatrin ya da NO38) .....	19
2.4.2. Nükleolin (C23 proteini) .....	20
2.4.3. RNA Polimeraz I Alt Birimleri .....	21
2.4.4. UBF (Transkripsiyon Faktörü) .....	21
2.4.5. 135 kDa'lık AgNOR Proteini .....	21
2.5. AgNOR PROTEİNLERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	22
2.6. İNSAN T-LENFOSİT İNTERFAZ ÇEKİRDEKÇİKLERİNİN (NÜKLEOLUS) YAPISI VE FONKSİYONU .....	23
2.7. RİBOZOM OLUŞUMU .....	27
2.8. FİTOHEMAGLUTİNİN İLE T-LENFOSİTLERİN AKTİVASYONU .....	28
2.9. DOWN SENDROMU (TRİZOMİ 21; MONGOLİZM).....	32

	<b><u>Sayfa No</u></b>
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. GEREÇLER.....	35
3.2. YÖNTEM.....	37
3.2.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi.....	37
3.2.2. Lenfosit Kültür Ortamının Hazırlanması .....	37
3.2.2.1. Kültür İşleminin Uygulanması.....	38
3.2.2.2. Kültür İşleminde Kullanılan Çözeltiler .....	39
3.2.3. G Bandlama .....	39
3.2.4. Giemsa Boyama.....	40
3.2.5. AgNOR Boyama.....	40
3.2.6. FHE Konsantrasyonuna Göre T-Lenfositlerdeki Metafaz ve İnterfaz NOR Aktivitelerinin Değişiminin Değerlendirilmesi .....	42
3.2.6.1. Işık Mikroskobu ile Metafaz NOR'larının Analiz İşlemleri..	42
3.2.6.2. Bilgisayarla İnterfaz NOR'larının Ölçüm İşlemleri.....	43
3.2.7. FHE Konsantrasyonuna Göre Mitotik İndeks Değişiminin Değerlendirilmesi.....	49
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM .....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. FİTOHEMAGLUTİNİN (FHE) KONSANTRASYONU İLE NOR AKTİVİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ .....	51
4.1.1. DS'lu ve Sağlıklı Bireylerin FHE Konsantrasyonuna Göre Metafaz NOR Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	51
4.1.2. DS'lu ve Sağlıklı Bireylerin FHE Konsantrasyonuna Göre İnterfaz NOR Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	58
4.2. FİTOHEMAGLUTİNİN (FHE) KONSANTRASYONUNUN MİTOTİK İNDEKSE ETKİSİ.....	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
6. KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ	



**TABLO LİSTESİ**

	<b><u>Sayfa no</u></b>
<b>Tablo 4.1 :</b> Her bir Down sendromlu hastanın FHE konsantrasyonuna göre ardışık 100 metafaz alanında bulunmuş AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları .....	52
<b>Tablo 4.2 :</b> Her bir sağlıklı kontrolün FHE konsantrasyonuna göre ardışık 100 metafaz alanında bulunmuş AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları .....	54
<b>Tablo 4.3 :</b> DS'lu ve sağlıklı kontrollerinin her bir FHE konsantrasyonuna göre genel metafaz AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları .....	55
<b>Tablo 4.4 :</b> Her bir Down sendromlu hastanın FHE konsantrasyonuna göre 50 interfaz alanında ölçülmüş NORa/TÇa oranı ortalamaları.....	58
<b>Tablo 4.5 :</b> Her bir sağlıklı kontrolün FHE konsantrasyonuna göre 50 interfaz alanında yüzde (%) olarak ölçülmüş NORa/TÇa oranı ortalamaları .....	60
<b>Tablo 4.6 :</b> DS'lu ve sağlıklı kontrollerinin her bir FHE konsantrasyonuna göre genel interfaz NORa/TÇa oranı ortalamaları .....	61
<b>Tablo 4.7 :</b> 30 DS'luda FHE konsantrasyonuna göre Mİ değerleri (%) .....	64
<b>Tablo 4.8 :</b> 24 kişilik kontrol grubunda FHE konsantrasyonuna göre Mİ değerleri (%).....	66

*ŞEKİL LİSTESİ*

Sayfa no

- Şekil 4.1** : Kültür ortamındaki FHE konsantrasyonu ile metafazda bulunan AgNOR(+) kromozom sayısı arasındaki ilişkiyi gösteren regressiyon grafikleri. .... 56
- Şekil 4.2** : Kültür ortamındaki FHE konsantrasyonu ile interfazda bulunan NORa/TÇa oranları arasındaki ilişkiyi gösteren regressiyon grafikleri. .... 62

## RESİM LİSTESİ

Sayfa no

- Resim 3.1** : Analiz işleminde kullanılan ışık mikroskobu - video kamera – bilgisayar düzeneği ..... 43
- Resim 3.2** : Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek olan lenfosit çekirdeği..... 45
- Resim 3.3** : NOR bölgeleri belirlenmiş lenfosit çekirdeği..... 46
- Resim 3.4** : NOR bölgeleri hesaplanmış lenfosit çekirdeği ..... 47
- Resim 3.5** : Çekirdek ve NOR bölgeleri belirlenmiş lenfosit çekirdeği..... 48
- Resim 4.1** : Down sendromlu bir bireye ait AgNO<sub>3</sub> ile boyanmış akrosentrik kromozomlar ..... 57
- Resim 4.2** : Sağlıklı bir bireye ait AgNO<sub>3</sub> ile boyanmış akrosentrik kromozomlar ..... 57
- Resim 4.3** : Down sendromlu bir bireye ait AgNO<sub>3</sub> ile boyanmış T-lenfosit interfaz çekirdeği ..... 63
- Resim 4.4** : Sağlıklı bir bireye ait AgNO<sub>3</sub> ile boyanmış T-lenfosit interfaz çekirdeği ..... 63

**KISALTMALAR**

<b>NOR</b>	: Nucleolus Organizer Region (Çekirdekçik oluşturan bölgeler)
<b>NORa</b>	: NOR alanı
<b>AgNOR</b>	: Argyrophilic NOR (Gümüş seven NOR)
<b>AgNOR(+)</b>	: AgNOR boyası ile boyanan akrosentrik kromozomlar
<b>AgNOR(-)</b>	: AgNOR boyası ile boyanmayan akrosentrik kromozomlar
<b>rDNA</b>	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
<b>rRNA</b>	: Ribozomal Ribonükleik Asit
<b>DNAaz</b>	: Deoksiribonükleik Asit Nükleaz
<b>RNAaz</b>	: Ribonükleik Asit Nükleaz
<b>RNA pol I</b>	: Ribonükleik Asit Polimeraz I
<b>mRNA</b>	: messenger Ribonükleik Asit
<b>tRNA</b>	: transfer Ribonükleik Asit
<b>pre-rRNA</b>	: Precursor Ribozomal Ribonükleik Asit
<b>RNP</b>	: Ribonükleo Protein
<b>UBF</b>	: Üst Bölgeye Bağlanma Faktörü
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	: Gümüş Nitrat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DS</b>	: Down Sendromu
<b>MI</b>	: Mitotik İndeks
<b>FHE</b>	: Fitohemaglutinin
<b>TÇa</b>	: Toplam Çekirdek Alanı
<b>FC</b>	: Fibrillar Centre
<b>DFC</b>	: Dense Fibrillar Component
<b>GC</b>	: Granular Component
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>nm</b>	: nanometre
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>ml</b>	: Mili litre
<b>g</b>	: Gram
<b>kDa</b>	: kilo Dalton
<b>Mb</b>	: Mega byte
<b>Kb</b>	: kilo byte
<b>rpm</b>	: Dakika Başına Dönme Sayısı

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

NORs (Nucleolus Organiser Regions), insanda bulunan beş çift akrosentrik kromozomların ikincil boğumlarına yerleşmiş ardışık olarak yinelenen rRNA gen familyasıdır. Down Sendrom (DS)'lu hastalar, taşıdıkları fazladan 21. kromozomdan dolayı fazladan bir rRNA gen familyasına sahiptirler. İnterfazda transkripsiyonel olarak aktif olan (rRNA sentezleyen) NOR'lar, metafazda da gümüş (AgNOR) boyama ile gösterilebilmektedir. Dolayısı ile AgNOR boyama, ya doğrudan doğruya interfaz çekirdekçiğini ya da metafaz kromozomları üstündeki NOR bölgeleri belirlemek için kullanılmaktadır.

Mutat trizomi 21 ya da Down sendromu (DS), zigot oluşumu ile birlikte başlayan, kök hücrelerindeki ifadesini, beyin dokusu da dahil, embriyogenez, organogenez ve doğum sonrası evrelerinde de sürdüren, bağışıklık yetmezliği, hızlı yaşlanma, zeka kusuru, gelişme geriliği ve yüksek lösemi riski ile kendisini gösteren, çok sık rastlanan ve çok çalışılmış bir sendromdur. Ancak, diğer kusurlarla birlikte, zeka kusurunu oluşturan etmenler de henüz tam olarak açıklanamamıştır. DS iyi bilinen kalıtsal hastalıklardan biri olmasına karşılık NOR ifadesi ile DS arasındaki ilişki de yeterince bilinmemektedir.

Görüntü analizi yöntemi kullanarak mitojenle uyarılmış DS lenfositlerinin sağlıklı kontrollere göre interfazda daha fazla NOR yüzeyi taşıdıklarını önceden göstermiştik. DS'lu ile sağlıklı bireylerin uyarılmış lenfositlerinin interfaz NOR'ları arasındaki fark o kadar açık ve nettir ki ışık mikroskopta ve orta derecedeki bir büyütmede bile ayırt edilebilirler.

Fitohemaglutinin (FHE) ile lenfositlerin uyarılması sonucunda rRNA sentezinde belirgin bir artışın olduğu ve çekirdekçiğin gümüşle boyanırılığının önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir. DS'lu ve sağlıklı bireylerin lenfosit hücrelerinde, FHE ile uyarılma sonucunda akrosentrik kromozomlar üzerinde bulunan rRNA genlerinin (NOR bölgelerinin) ve interfaz çekirdekçiğini oluşturan NOR alanlarının aktiflik ya da inaktifliğinin ortamdaki FHE konsantrasyonuna bağlı olarak değişip değişmediğini araştırmak çalışmamızın ilk amacını oluşturmaktadır. Bu çalışmamızda, sağlıklı kontrollerdeki aktif NOR taşıyan kromozom sayısında ve interfaz NOR alanlarında bir değişme olmazken, DS'lu lenfositlerindeki metafaz AgNOR(+) kromozom sayısının ve interfaz NOR alanının, ortamdaki FHE konsantrasyonuna göre arttığını gösterdik. DS'lu bireylerin FHE ile uyarılmış lenfositlerinde NOR ifadesinin kontrolündeki bu dengesizlik, gereksiz rRNA kopyaları ve NOR proteinleri sentezindeki boşa harcanan enerji yüzünden, fetal yaşamda DS fenotipinin oluşumuna bir açıklama da getirmektedir. Daha da ötesi bu gözlem, sadece DS'luların başka bir özelliğini açığa çıkartmakla kalmamakta, aynı zamanda DS'lulardaki NOR analizlerinin güvenilir biçimde yapılabilmesi için lenfosit kültür koşullarının standartlaştırılması gerektiğini de ortaya koymaktadır.

Mitojenle lenfosit uyarımı, sık kullanılan bir laboratuvar uygulaması olmasına karşılık kullanılan uyarıcı, örneğin FHE'nin konsantrasyonu laboratuvarlara/çalışma gruplarına göre önemli ölçüde değişmektedir. İnsan ve özellikle de bebek lenfositlerinin uyarımında yararlanılabilecek optimum FHE konsantrasyonunu belirtir kapsamlı bir çalışmaya da rastlanılamamaktadır.

Ayrıca, kullanılan FHE'nin tek hedefinin lenfositleri mitozu teşvik olmasına karşılık, bu maddenin hangi formda (M formu, P formu..) bulunduğu/bulunacağı da çalışan kişilere göre değişmektedir. FHE tipi ve konsantrasyonunun laboratuvarlar arasında standartlaştırılması bazı analiz sonuçlarının güvenilirliği için de gereklidir çünkü bunlardan bazılarının örneğin DS'luların NOR sonuçları, ortamdaki FHE miktarına göre de değişmektedir.

Bu veriler ışığında, FHE konsantrasyonunun mitotik indekse (Mİ) etkisi de araştırılmış ve hem DS'lu hem de kontrollerinin kan kültürleri için optimum FHE konsantrasyonu bulunmaya çalışılmıştır. Böylece, faydasız ve gereksiz yere fazladan FHE kullanımı önlenerek ekonomik kazanç da sağlanmış olacaktır. Mevcut çalışmada, 0-8 yaş arası DS'lu (N=30) ve kontrollerinden (N=24) oluşma 54 kişinin kanları 4 farklı FHE konsantrasyonlu (0.37 ml, 0.75 ml, 1.48 ml ve 2.21 ml FHE / 100 ml'lik ortam) kültür ortamına ekilerek FHE konsantrasyonuna göre her iki grubun Mİ'leri bulundu ve sonuçlar literatür ışığında tartışıldı.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. ÇEKİRDEKÇİK OLUŞTURAN BÖLGELER**

#### **(Nucleolar Organizer Regions; NORs )**

Nucleolar Organizer Regions (NORs): Çekirdekçik oluşturan bölgeler, ilk kez Heitz (1931) ve McClinton (1934) tarafından tanımlanmışlardır (1).

NOR'lar, insanlarda bulunan beş çift akrosentrik kromozomların yani 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozom çiftlerinin kısa kollarında bulunan DNA ilmikleridirler ve metafaz akrosentrik kromozomlarının ikincil boğumu (secondary constriction) olarak nitelendirilen satellit saplarında bulunan ribozomal DNA'ları (rDNA) ifade ederler. Bu bölgeleri içeren akrosentrik kromozom bölgeleri "çekirdekçik oluşturan bölgeler" (NORs) olarak isimlendirilirler (1-14). NOR'lar, maya hücrelerinden yüksek yapılı ökaryotların somatik hücrelerine kadar ardışık olarak yinelenmiş ribozomal genlerin, onlarca, yüzlerce ve hatta binlerce kopyasını içerirler (15). rRNA'ya çevrilen bu DNA ilmikleri, interfaz boyunca bazen tek NOR'lu bir çekirdekçiğe neden olurlar (2). Bir çekirdekçiğin oluşumuna, bir kromozomdan daha fazla sayıdaki kromozomda bulunan transkripsiyonel olarak aktif NOR'lar katılabilirler (15).

rDNA yüksek oranda guanin-sitozin içeriğine sahiptir (16) ve rDNA'nın replikasyonu çekirdekçiklerde meydana gelir (2). Memeli rDNA'sının transkripsiyon birimi 13.000 baz çiftinden oluşur ve ortalama 4 µm uzunluğa sahiptir (6, 17). İnsan diploid hücrelerinde NOR'lar, ribozomal RNA (rRNA) için şifrelenen ardışık olarak yinelenen çok sayıdaki ribozomal genlerin yaklaşık 300-400 kopyasını içerirler (1, 3-7, 9-12, 15, 17, 18). Akrosentrik kromozomların ikincil boğumlarında bulunan bu genler, baştan sona kadar onlarca ardışık tekrarlar halinde düzenlenirler (6, 15, 19). Her ribozomal gen birimi, genellikle kopyalanan bir sekans ve kopyalanmayan dış bir bölgeden oluşur (6, 15). rRNA genleri transkripsiyon boyunca çekirdekçikte yerleşim gösterirler ve RNA polimeraz-I tarafından kopyalanırlar (3, 6, 15). Ribozomal genlerin önemli bir kesiminin transkripsiyonel olarak inaktif olduğu genel olarak kabul edilmiştir (15).

NOR'lar, rDNA'nın çok sayıda kopyalarını içeren kromozomal bölgelerdir ve NOR başına rDNA kopyalarının sayısı farklılık gösterir (7, 10, 11, 16, 20-22). Başka bir ifadeyle, farklı bireylerdeki kopyaların dağılımı ve sayısındaki farklılıkların yanı sıra bir bireyde farklı kromozomlar üzerindeki gen kopyalarının sayısında da farklılıklar vardır (7). Normal hücrelerin çekirdekçiklerinde rDNA'nın sadece bir kısmı bulunur. Buna karşın, eğer hücreler hızlı çoğalma potansiyeline sahiplerse, çekirdekçiklerde daha fazla rDNA bulunur (2).

rDNA kısa kollarını yitirmemiş tüm akrosentrik kromozomlarda bulunduğu halde (10, 19) transkripsiyonel olarak hepsinde aktif değildir (10). NOR aktivasyonu, hücresel aktivite için bir göstergedir (23). Transkripsiyonel olarak inaktif olan NOR'lar, aktif olanlardan belirli bir uzaklıkta ve çekirdekçiklerin dışında bulunurlar. Çekirdekçik içinde bulunan rDNA, transkripsiyonel olarak aktiftir (10, 23, 24). Bitki çekirdeğinde, inaktif rDNA çekirdekçiğin dışında kalır ve bu olgun lenfositlerdeki modele benzer (24).



Bunun yanında, oldukça arjirofilik (gümüş sever) olan non-histon asidik proteinlerin özel bir grubu da, NOR'larla aynı bölgelere yerleşim gösterirler ve böylece NOR'ların, gümüş nitrat boyama tarafından oldukça açık ve hızlı bir şekilde görünmelerine izin verirler (1, 2, 18, 25-27). Bununla birlikte, inaktif rDNA ile değil, aktif rDNA ile birleşmiş olan proteinler gümüşü indirgerler (28). Gümüşle boyanan NOR'lar, "AgNORs" olarak ve Arjirofilik NOR'larla birleşmiş proteinler de "AgNOR proteinleri" olarak bilinirler (1, 18). Arjirofilik NOR'lar (AgNORs), çekirdekçiklerdeki nükleik asit-arjirofilik non-histon protein kompleksleridir (2).

### **2.2.1. İnterfaz ve Metafaz NOR'ları**

Metafaz NOR'ları her zaman, kromozomal boğumlar içinde kısmen bir bütün haline gelmiş küresel ya da uzatılmış yapılar olarak görünürler. Bu şekildeki metafaz NOR'ları, kromozomların içinde kısmen bir bütün haline gelmiş şişkinliklere ya da kabartılara benzetilebilirler. Bu yapılar her zaman çiftler olarak bulunurlar. Gümüşle boyanabilen bu çiftler, muhtemelen her bir kardeş kromatid üzerindeki rDNA genleri ile birleşmiş, gümüşle boyanabilen maddenin iki setine karşılık gelirler (29).

Mitoz boyunca metafaz akrosentrik kromozomları üzerindeki NOR'lar (ribozomal genler), NOR proteinleri olarak adlandırılan gümüşle boyanan çekirdekçik proteinlerinin bir grubuyla birleşmiş olarak bulunurlar (4, 15, 24, 26, 29, 30-34).

İnterfaz boyunca NOR'lar, metafaz NOR'larına karşılık gelen interfazı temsil eden çekirdekçiğin ipliksi bölgelerinde (fibrillar component) bulunurlar (1, 4, 8, 15, 26, 35, 36). Metafaz ve İnterfaz NOR'ları arasında sayısal bir ilişki yoktur; bir çok metafaz NOR'ları bir tek interfaz NOR'unda kümelenmiş olabilir (1).

İnterfaz NOR'u, rRNA sentezi için yapısal ve görevsel bir birimdir. Ribozomal transkripsiyon için gerekli olan tüm bileşenler; nükleozomal olmayan tamamen genişlemiş bir yapıdaki (yani transkripsiyon için hazır) rRNA genleri, RNA polimeraz-I, üst bölgeye bağlanma faktörü (UBF) ve topoizomeraz-I, interfaz NOR'larının sınırları içinde bulunurlar. Bununla birlikte interfaz NOR'larının esas bileşenleri AgNOR proteinleridir (1).

Metafaz kromozomları üzerindeki NOR bölgeleri ile birleşmiş halde olan gümüşle boyanabilen proteinlerin miktarı, interfaz NOR'larında bulunan proteinlerin miktarından daha azdır (4, 25, 33).

İnterfaz NOR'larının sadece bir bölümünün transkripsiyonel olarak aktif olduğu bilinmektedir (37). İnterfaz NOR'larının büyüklüğü ve sayısı, çekirdekçik içindeki rRNA transkripsiyonel aktivitesine uygun olarak oldukça değişkenlik gösterir. Ribozom yapımı çok düşük düzeyli hücrelerin çekirdekçikleri (dinlenme halindeki lenfositlerdeki gibi), geniş bir tek interfaz NOR'u tarafından temsil edilirlerken, aktive edilmiş hücrelerin çekirdekçikleri (fitohemagglutininle uyarılmış lenfositlerdeki gibi), çok sayıda küçük interfaz NOR'ları sergileyebilirler (1). İnterfaz AgNOR'larının sayısı, sürekli olarak çoğalan hücrelerde, çoğalmanın hızıyla ve rRNA sentez etkinliği ile ilişkilidir (1, 35).

Mitotik NOR'lardan bazıları, bir önceki interfazda transkripsiyonel olarak aktif olan ribozomal genleri içerir. Fakat bazı NOR'lar, transkripsiyonel mekanizma ve/veya gümüş boyamanın bileşenleri için pozitif değildir. Böyle NOR'lar, transkripsiyon için yetersizdirler (15).

Çekirdekçik içinde gümüş boyalı interfaz NOR'ları tarafından kaplanan bölge, ribozom üretiminin seviyesi ve total çekirdekçik alanı ile ilgilidir (1, 17).

1961'den beri insandaki 10 akrosentrik kromozomun kısa kollarının saplar taşıdığı ve yumru şeklinde satellitleri olduğu kabul edilmektedir. Bu bölgeler çekirdekçiğin yapımında işe karıştıkları için önemli ölçüde sitogenetik öneme sahiptirler (38). İnsan hücrelerinin metafazlarında,

NOR taşıyan akrosentrik kromozomların kısa kolları sık sık bir arada bulunurlar. Buna “satellit birleşmesi” adı verilir. Daha fazla miktarda rDNA içeren NOR’ların daha sık olarak satellit birleşmelerine katıldıkları ve yine aynı şekilde aktif NOR’ların inaktif olanlardan çok daha fazla sıklıkta bu birleşmelere katıldıkları öne sürülmüştür (7, 39).

Akrosentrik kromozom sentromerleri ve rDNA’nın, interfaz çekirdekçiklerinde bitişik şekilde yan yana buldukları gösterilmiştir (40). Akrosentrik kromozom birleşmesinin dolaşımdaki lökositlerde interfaz da bile mevcut olduğu belirtilmektedir (2). İnsan interfaz hücrelerinde AgNOR’lara karışmış olan akrosentrik kromozomların oranı ve AgNOR’ların sayısı, hücre tiplerine göre değişiklik gösterebilir. Bu, malignant değişiklik içeren hücre fenotipinin belirlenmesinde ve rDNA transkripsiyonunda önemli bir rol oynayabilir (2).

Bununla birlikte, insan interfaz hücrelerindeki çekirdekçikler (interfaz NOR’u) ve metafaz NOR’u arasındaki ilişki hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (2).

## **2.2.GÜMÜŞ NİTRAT BOYAMA (AgNOR BOYAMA) VE NOR’LARLA İLİŞKİSİ**

Gümüş nitrat, 1800’lü yılların sonlarından beri sitolojik bir boya olarak kullanılmaktadır (41). Kromozom preparatlarında AgNOR boyama (nucleolar gümüş boyama) ilk olarak Carleton (1920) tarafından gösterilmiştir (41). AgNOR boyama tekniği, sitogenetik preparatlarda çekirdekçik oluşturan bölgeleri ortaya çıkarmak için Goodpasture ve Bloom (1975) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik, Howell ve Black (1980) tarafından basitleştirilerek ışık ve elektron mikroskobu alanlarına uygulanmıştır (34). Ploton ve arkadaşları (1986) daha sonra, bir formik asit gümüş nitrat boyama metodu uygulayarak, rutin sitohistolojik örneklerde interfaz NOR’larının tam yerleşimlerini göstermişlerdir (1).

NOR'lar, gümüş ile seçici olarak boyanan arjirofilik (gümüş-sever) proteinlerin bir kısmını içeren çekirdekçik bileşenleri olarak tanımlanırlar. Gümüş boyamadan sonra NOR'lar, yalnızca çekirdekçik boyunca yerleşim gösteren siyah lekeler olarak kolayca ayırt edilebilirler (1, 2, 5, 18). NOR'ların arjirofilik olması (gümüş sevmesi), ribozomal DNA genlerinin etrafında yerleşim gösteren ve gümüş için yüksek bir yatkınlığa sahip olan bir grup nükleolar nonhiston proteinler (AgNOR proteinleri) 'den dolayıdır (18, 25).

AgNOR proteinlerini görülebilir hale getirmek için kullanılan ilk gümüş boyama metodları, art arda gelen iki basamaktan oluşmaktaydı. Bunlar; Gümüş nitratla ( $\text{AgNO}_3$ ) bir doyurma basamağı ve indirgeyici bir ajanla (amonyak ya da formik asit gibi) geliştirme basamağıdır. Howell ve Black (1980), doyurma ve geliştirmenin aynı anda meydana getirildiği tek basamaklı bir gümüş boyama metodunu önerdiler. Howell ve Black'in orijinal tekniğinde, gümüş boyanma  $70^\circ\text{C}$ 'de 2 dakikada meydana gelmektedir. Boyanma reaksiyonunu daha iyi kontrol etmek ve non-spesifik boyanmadan kaçınmak için Ploton ve arkadaşları (1986), daha düşük bir sıcaklık ve daha uzun bir boyanma süresi ileri sürdüler. Güvenirliliği ve özgüllüğünden dolayı bu gümüş boyama metodu, rutin sito-histopatolojide AgNOR proteinini görülebilir hale getirmek için sıklıkla kullanılır olmuştur (1, 18). Bu yöntem kullanılarak, interfaz NOR'ları oldukça iyi tanımlanan siyah lekeler olarak görünürler (1, 2, 18, 35). Ultra yapısal düzeyde çok sayıdaki siyah lekeler (yaklaşık 5 nm çapında), sadece interfazik çekirdekçiklerin aktif bölgelerinde (yani ipliksi merkez ve yoğun ipliksi bölgelerinde) bulunurlar (1, 5). Bu bölgelerin içinde çok küçük gümüş lekelerinin birikimi, optik seviyede çekirdekçiklerin içinde 1-2  $\mu\text{m}$  çapında yuvarlakça yapılar yada NOR granülleri olarak görünür (5). Bu siyah lekelerin sayısı ve büyüklüğü ışık mikroskobu kullanımında oldukça değerlidir (1). AgNOR lekelerinin sayısı hücre çoğalmasının iyi bir göstergesidir. Bu AgNOR lekelerinin sayısı ne kadar fazla olursa, hücre döngüsünün o kadar kısa olduğu öne sürülmüştür (5).

Gümüş boyama tekniği, asidik bir ortamda gümüş nitratin, NOR merkezlerinde NOR proteinleri tarafından metalik gümüş indirgenmesine dayanır (24). Ancak gümüş nitrati metalik gümüş indirgeyen asıl madde, rDNA ya da rRNA olmayıp bu bölgelere özgü proteinler (NOR proteinleri)dir. Çünkü, NOR boyama DNAaz ya da RNAaz' lardan etkilenmezken pronase, trypsin ya da papain gibi proteolitik enzimlerden etkilenmektedir (11, 13, 16, 24, 27, 34, 41). Bu sonuçlar, gümüş iyonlarının, asidik olan proteinlere bağlandığını göstermektedir (4, 11, 12, 27, 32, 34, 35, 42). Sonuç olarak, gümüşle pozitif olarak boyanan madde, rDNA'nın kendisi değil, rDNA bölgeleri ile birleşmiş bulunan asidik proteinlerdir (8, 17, 29, 43). Bununla birlikte, inaktif rDNA ile değil, aktif rDNA ile birleşmiş olan proteinler gümüşü indirgerler. Bu indirgenme, ışık mikroskobu ile hücrelerdeki NORs olarak isimlendirilen aktif rDNA bölgelerini görmek için kullanılan gümüş boyama için esastır (28). Gümüşle boyanabilen madde, aktif NOR'ların etrafında biriken ribonükleoproteinin asidik bir protein bileşenidir (11, 12, 32, 35). Gümüş boyanmaya neden olan materyalin, interfaz boyunca üretildiği ve profaz'da NOR'ların etrafında biriktiği öne sürülmektedir (11).

Gümüşle boyanan proteinlerin bir kısmı, çekirdek ekstrakt'lardan elde edilen jel elektroforezinde gösterilmiştir. Gümüşle proteinlerin bağlanma reaksiyonu sülfidril ve disülfid grupları vasıtasıyla meydana geliyor gibi görünmektedir (26, 38). Fosfat grupları da gümüş boyamada işe karışabilmektedirler. Gümüşle bağlanan iki major AgNOR proteinleri, nükleolin (C23) ve B23'dür (26, 29, 35, 38, 44). C23 ve B23, çekirdekçiğin fosforlanan ana asidik fosfoproteinleridir. Bu proteinlerin küçük fosforlanan birimleri olan fosfoserin ve fosfotreonin gümüş boyamada işe karışabilmektedirler (29, 38). Defosforilasyon, kısmi proteolizis ya da maskelenmeden sonra bu proteinler gümüş için yatkınlıklarını kaybedebilirler (29). Bunun yanı sıra, nükleolinin karboksi kısmının değil, amino terminal bölgesinin AgNOR boyamada işe karıştığı gösterilmiştir (26, 30). Proteinin bu kısmında, tekrarlanmış

ve araya serpiştirilmiş 20-30 aspartik yada glutamik asit halkalarının art arda diziliminden oluşan 4 büyük asidik alan bulunur (26). Nükleolar protein B23'ün de, nükleolinin amino terminal kısmında bulunanlara benzer uzun asidik alanlara sahip olduğu gösterilmiştir (26). Nükleolinin amino terminal bölgesindeki asidik amino asitlerin konsantrasyonu, gümüş iyonlarının indirgenmesinden dolayısıyla AgNOR boyanmadan sorumludur (26, 30, 34). Nükleolinin, N-terminal bölgesindeki asit tekrarlarını ortaya çıkaran AgNOR boyama, tüm nükleolini ortaya çıkarmayı mümkün hale getirir ve nükleolinin miktarına bağlı lineer bir cevap sağlar. Bu iki major AgNOR proteinlerinin yanı sıra diğer minör proteinler de genel boyanmadan sorumludurlar. Bu iki majör proteinlerin evrensel boyanmanın %60-75'inden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (44).

AgNOR boyama, diğer proteinlerde de asidik alanlarla ilişkilidir (30) ve asidik bölgeler, çekirdekçik proteinlerinde sıklırlar (26). AgNOR proteinlerinin, nükleolinde olduğu gibi, glutamik ve aspartik asit köklerinden oluşan uzun tekrar alanlarına sahip olduğu öne sürülmüştür. Bu asidik bölgeler; transkripsiyon faktörlerinde, sentromerik proteinlerde, nükleoplazminde, HMG-1 ve HMG-2'de ve diğer çekirdekçik proteinlerinde bulunmuşlardır (26).

Çekirdekçik içindeki interfaz NOR'larının gümüşle boyanmasının şiddeti, hücrelerin transkripsiyon aktivitesine bağlıdır (30, 32). Bu yüzden, çekirdekçik içindeki gümüş boyalı interfaz NOR'ları tarafından kaplanan bölgenin görüntü analizi ile değerlendirilmesi, rutin sitohistopatolojik örneklerde çekirdekçik büyüklüğü ve görevi hakkında kesin bilgi edinmeye izin verir (1).

İnterfazda ya da mitoz sırasında transkripsiyonel olarak aktif olan NOR'ların pozisyonu, gümüş boyama ile gösterilebilmektedir (10, 13, 25, 41, 42). Ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel bölgesi ile gümüş boyanırılıığı arasında doğrudan bir ilişki vardır (6, 12, 14, 25, 30, 32, 41, 42). AgNOR boyama, aktif (AgNOR boyama pozitif) ve baskılanmış

(AgNOR boyama negatif) olan genleri tahmin etmek için iyi bir işaretir (20, 32).

Mitotik NOR'ların gümüşle boyanabilmesi için, NOR kromatininin hücre döngüsünün bir önceki interfazında transkripsiyonel olarak aktif olması gerektiği öne sürülmektedir (11-13, 15, 21, 23, 25, 42). Metafaz kromozomlarının gümüşle boyanmasının, daha önceki interfazda NOR'ların transkripsiyonel aktivitesini gösterdiği bilinmektedir (8, 23, 25, 36).

NOR boyamanın iki özelliğinden biri, sadece aktif rDNA bölgelerini boyayıp, inaktif (rRNA sentezlemeyen) bölgeleri boyamamasıdır. Transkripsiyonel aktivitenin gümüş boyanırılığı için gerekli olduğu belirtilmektedir (42). Bir diğer özelliği ise aktiflik ya da inaktifliğin kalıtsal oluşudur. Kültürü yapılmış lenfosit hücrelerinde NOR'ların gümüşle boyanabilirliği, belirli sınırlar içerisinde kalıtılabilir bir özelliktir (11-13, 21). Başka bir ifade ile örneğin anne ve babada 13.kromozomlardaki rDNA'lar rRNA sentezlemiyorlarsa yani AgNO<sub>3</sub> ile boyanmıyorlarsa bu özellik çocuklarında da aynen görülecektir.

İnterfazik hücrelerde çekirdekçikler, gümüş tarafından yoğun bir şekilde etiketlenirler. Buna karşın, diğer hücre kesimleri gümüşten tamamen yoksundur. Bu yüzden reaksiyon, çekirdekçik bileşenleri için oldukça spesifik görünmektedir. Etiketleme, sayısı ve dağılımı, bir hücreden diğerine değişen granüller oluşturur ve bu granüllerden bazıları da zincire benzer yapılar oluşturur (26). Gümüş boyama aynı zamanda çekirdekçiklerin yapısını ve büyüklüğünü göstermek için de kullanılır. Çok sayıdaki çalışmalarda gümüşle boyanmış çekirdekçiklerin büyüklüğü, yapısı ve sayısı, hücresel çoğalma ve malignansinin parametreleri olarak kullanılmaktadır (5, 23, 35).

### **2.3.AgNOR BOYAMANIN STANDARTLAŞTIRILMASININ ÖNEMİ**

NOR'un gümüşle boyanabilirliği çeşitli faktörler tarafından büyük ölçüde etkilenir. Bunlar; boyama reaksiyonunun süresi, sıcaklığı ve kullanılan fiksatiflerdir. NOR'u gümüşle boyamanın fiksatife bağımlılığı çok sayıda araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Alkol bazlı fiksatifler, formalin içeren fiksatiflerin yaptıklarından daha yoğun ve spesifik görülebilen AgNOR proteini verirler (18). AgNOR proteinlerinin seçici boyanması için en iyi fiksatifin etanolle birlikte olduğu öne sürülmüştür (35). Formalinle fiksasyonun genellikle düşük kaliteli gümüş boyamaya yol açtığı ve bunun da muhtemelen hücresel proteinler üzerinde bu fiksatifin maskeleyici bir etkisi yüzünden olduğu belirtilmiştir (18). Daha da ötesi, formalinle fikse edilmiş örneklerde boyama reaksiyonu, aynı zamanda kullanılan formalinin (tampon olarak ya da olmayarak) tipine, fiksasyon süresine ve doku içine fiksatifin geçişine bağlıdır. Derenzini ve Trere (1991), morfometrik bir çalışmada, aynı tümör örneğinden alınan ve farklı olarak fikse edilmiş örneklerde AgNOR proteini alanını karşılaştırarak, NOR' un boyanabilirliği üzerinde çeşitli fiksatiflerin etkisini değerlendirdiler. Bu çalışma, saf etanolle ya da methcarn solusyonu (3:1 hacim/hacim metanol:asetik asit) ile fikse edilen örneklerin ortalama AgNOR protein alanınının, formalinle fikse edilmiş örneklerde ölçüleninkinden iki kat daha fazla olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar, farklı olarak fikse edilen histolojik örneklerden elde edilen AgNOR protein değerlerinin kesinlikle birbirleri ile karşılaştırılmaz (kıyaslanamaz) olduğunu açıkça göstermektedir (18).

NOR'un seçiciliği, sıcaklıktan ve aynı zamanda boyama reaksiyonunun süresinden büyük ölçüde etkilenmektedir (18). İki değişken birbiri ile ters orantılıdır; sıcaklık ne kadar yüksek olursa seçici bir NOR'un görülebilir bir hale gelmesi için gerekli olan zaman o kadar kısaldır. Bunun yanında diğer araştırmalar, boyama reaksiyonunun, seçici bir NOR'un görülebilmesi için gerekli olan optimal zamandan daha fazla uzatıldığında, gümüş tortularının (çökeleklerinin) hacim olarak arttığını



ve gümüşle homojen olarak boyanan tüm çekirdekçik görününceye kadar birleştiklerini göstermişlerdir (18).

Bununla birlikte çeşitli gümüş boyama metodlarının farklı sonuçlara neden olacağı belirtilmektedir. Gümüş boyama ile elde edilen sonuçların, ön işlemler ve fiksatiflerin kullanımından etkilendiği oldukça iyi bilinmektedir (29). Standartlaştırılmış bir gümüş boyama protokolünün bulunmayışı, bireysel çalışmalarda gerçek yapıların değerlendirilmesinde çok fazla yanlış yorumlara yol açmıştır. Aynı tümör tipleri için farklı araştırmacılar tarafından bildirilen kesin AgNOR sayıları, güçlükle karşılaştırılabilir durumdadır ve bu araştırmalar tarafından ortaya çıkarılan sonuçların bazen birbirini tutmadığı görülmektedir. Bunun sonucunda da aynı tümör tipinde bireysel çalışmalar arasında fikir ayrılığına neden olmaktadır. Bu farklı verilerin elde edilmesinin başlıca nedenleri;

1. NOR'u gümüşle boyamada farklı uygulamaların kullanılması,
2. AgNOR proteini ölçümlendirmesi için farklı yöntemlerin kullanılmasıdır (18).

Bütün bunlar, NOR boyanabilirliğini etkileyebilecek çok sayıdaki değişkenler göz önüne alındığında, boyama protokolünün, farklı laboratuvarlar arasında tekrarlanabilir veriler elde edebilmek için kesinlikle standardize edilmeye ihtiyacı olduğunu gösterir. AgNOR boyamada kesin bir standart elde etmek ve tüm laboratuvarlarda karşılaştırılabilir veri üretmek için, 1993'de Berlin'de toplanan ilk "Onkolojide AgNORs" çalışmayı süresince, "AgNOR'u değerlendirmede uluslar arası komite" kuruldu ve ilk kez AgNOR proteinini değerlendirmek için bir kılavuz belirlendi. Komite tarafından önerilen standartlaştırılmış gümüş boyama şekli; önceden ısıtılmış solüsyonlar kullanarak 37°C sabit bir sıcaklıkta, karanlıkta yapılan boyama bölümlerinden oluşmaktadır (18).

## **2.4.NOR PROTEİNLERİ (AgNOR PROTEİNLERİ)**

Sitokimyasal reaksiyonlarla ortaya çıkarılabilen AgNOR proteinlerinden bazıları, ilk kez 1970'lerde tanımlandı (30).

AgNOR proteinleri, elektron mikroskobu ile interfaz süresince, özellikle çekirdekçik içinde rDNA'nın gösterildiği yerler olan, ipliksi merkez (FC) ve yoğun ipliksi bölge (DFC) de bulunurlar (24-26, 29, 33, 37, 43) ve interfaz çekirdeğinde granüllü bölgeden dışarı atılırlar (24). Farklı miktarlardaki AgNOR proteinleri ince bir filament ile oluşan granüllere bağlanırlar (43). FC ve DFC, mitotik NOR'ların interfaz karşılığıdır (1, 4, 8, 15, 26, 29, 35, 36).

Mitozun tüm fazları boyunca AgNOR proteinleri, kondanse kromatinin kendisi içinde değil sadece kondanse kromatinle birleşmiş olan ipliksi kümelerin içine yerleşim gösterirler. AgNOR proteinleri, interfaz ve metafaz süresince rDNA genleri ile birleşirler. Mitozun bazı basamakları boyunca (metafaz dışında), AgNOR proteinlerinden bazıları NOR'u terk edebilir ve ayrı bölgelerde toplanabilir (25).

AgNOR proteinleri, çoğalmayan hücrelerdeki ifadeleri çok düşük olmasına karşılık, hızlı bir şekilde çoğalan hücrelerde birikme yaparlar (30, 44). Bu yüzden AgNOR proteinleri, aktif ribozomal genlerin işaretleridir (24, 26, 30, 34, 43). AgNOR proteinleri, mitoz süresince kromozomlardaki NOR'larla ve interfaz süresince çekirdekçiklerdeki ribozomal genlerle birleşmiş olarak kalırlar ve miktarları, hücrelerin ribozomal transkripsiyonel durumuna ve/veya hücre katlanma süresine bağlı olarak değişir (24-26, 30, 34, 43). Bu proteinler, kromozomların NOR'larında gümüş boyama ile gösterilebilirler (32). NOR proteinleri, diğer bir çok hücre proteinlerinin boyanmadan kaldığı asidik şartlar altında gümüşü indirgeme yetenekleri ile ayırt edilirler. Gümüşe özgün yatkınlıkları vardır (26, 39, 43).

Ribozomal genlerin (rDNA) transkripsiyonu ve çekirdekçiğin işlenmesi, AgNOR proteinlerinin varlığına bağlıdır (17, 23, 26, 35). AgNOR proteinlerinin yokluğunda rRNA sentezi meydana gelmez (1). Bu proteinlerin varlığı ya da yokluğu, aktif ve inaktif NOR'lar arasında in situ ayırt edilmesi için bir kriterdir (26). Bu yüzden bu proteinlerin miktarı, transkripsiyonel aktivitenin derecesini yansıtır (17, 26). AgNOR proteinlerinin, ribozomal transkripsiyonel birimlerin sadece transkribe edilen kısmıyla birleştikleri yani aktif ribozomal gen transkripsiyonuna bağlı oldukları gösterilmiştir (26, 43). İnterfaz çekirdekçiklerindeki AgNOR proteinlerinin, yoğun kromatin yapıları ile değil, oldukça dekondanse olmuş yapılarla sürekli olarak birleştikleri in situ ultra yapısal sitokimyasal araştırmalarla gösterilmiştir (33).

AgNOR proteinlerinden en azından bir kısmı, çekirdekçik transkripsiyon aktivitesinden (pre-rRNA sentezinden) tamamen bağımsızdırlar (17, 33, 35, 43). Bu proteinler muhtemelen, ribozomal kromatinin sürekliliği için, fonksiyonel bir rolden ziyade, yapısal bir rol oynamaktadırlar (17, 33, 35, 43). Bu proteinler, histonların rDNA'ya bağlanmalarını engelleyerek, sürekli genişlemiş bir kromatini devam ettirebilirler (37). AgNOR proteinleri, çoğalan hücrelerde G<sub>1</sub> fazı boyunca meydana gelen ribozomal kromatindeki yapısal değişikliklerde anahtar bir rol oynarlar. Yeni sentezlenen AgNOR proteinleri, DNA sentezi başlamadan önce gözlenen ribozomal kromatin dağılmasından sorumludurlar (33).

AgNOR proteinlerinin miktarı, hücre çoğalmasının bir göstergesidir (1, 30, 35, 44, 45). Çünkü bu proteinlerin miktarı, hücre döngüsü evreleri ile ilişkilidir (26, 30, 32, 44) ve bu miktar, düzenli olarak hücre döngüsü boyunca değişir (45). Hücre katlanma zamanı ne kadar kısalırsa, interfaz AgNOR'larının miktarı da o kadar artar (1, 32, 44). AgNOR proteinlerinin miktarı şematik olarak; G<sub>1</sub> fazı için düşük, S-G<sub>2</sub> fazları için yüksektir (30, 44). G<sub>0</sub> fazında AgNOR proteinlerinin miktarı, G<sub>1</sub> fazındaki hücrelerde bulunanlardakinin yarısı kadardır (44).

Nükleolin ve protein B23'ün miktarları, nükleolar aktivite ve hücre çoğalmasına bağlı olarak değişir (32). Çoğalan hücrelerde, nükleolin ve nükleofosminin miktarı, erken G<sub>1</sub> fazında derece derece artar, S fazının sonunda maksimum değere ulaşır ve geç G<sub>2</sub> fazına kadar sabit kalır (1, 44).

İnterfaz AgNOR protein miktarı ve hücre katlanma zamanı arasındaki ilişki; çoğalan hücrelerin, kardeş hücreler için yeterli ribozom üretmek zorunda olmaları ve hücre döngüsü ne kadar kısalsın, birim zaman başına yapmak zorunda oldukları ribozomun da o kadar çok olması göz önüne alınarak açıklanabilir. İnterfaz AgNOR'larının sayısı, rRNA transkripsiyonel aktivitesi ile ilişkili olduğundan, interfaz AgNOR miktarının da aynı zamanda hücre katlanma zamanı ile ilgili olması tutarlı bir sonuçtur (1).

İnterfaz AgNOR'larının miktarsal dağılımının değerlendirilmesi, hem diagnostik hem de prognostik amaçlar için tümör patolojisinde kullanılmaktadır (1, 2, 18, 35). AgNOR parametresinin, tümörlerin bir çok tipinde bağımsız bir prognostik faktör olarak, kanser hastalığının klinik akıbetini tanımlamada güvenilir bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Klinik sonucu etkileyen en önemli faktörlerden biri, tümör kütlesi büyüme oranı olduğu için, AgNOR değeri, bulunduğu kişide tümör hastalığının ilerleyişi hakkında bilgi sahibi olmak için değerli bir parametreyi temsil eder (1, 35).

AgNOR proteinlerinin ölçümü, kanser hücresi çoğalma hızının basit bir tahmini olarak kullanılabilir (23, 32, 35, 44). İnterfaz boyunca mevcut olan AgNOR proteinlerinin miktarının, düzenli olarak hücre çoğalması ve çekirdekçik etkinliğini değerlendirmek için kullanıldığı ve kanser hücresinin erken tanısı için bir ölçüt olduğu belirtilmektedir (13, 32, 34). Malign hücreler, malign olmayan (benign ya da normal) hücrelerle karşılaştırıldıklarında daha fazla miktarda AgNOR proteini bulundurulur. Kanser dokularında AgNOR proteini ifadesi, hücre duplikasyon (katlanma) oranı ile ilişkilidir (4, 18, 35). Çünkü hücre

dublikasyon aktivitesi ve AgNOR proteinlerinin miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (23, 35, 44). Gümüşle boyanan AgNOR proteinlerinin miktarı ne kadar fazla olursa, hücre çoğalması da o kadar hızlı olur (4, 35). Bu yüzden AgNOR boyama tekniğinin, tümörlerin erken tanısında, kısmi olarak malign tümörlerden benign tümörleri ayırt etmede ve benign tümörün şiddetini değerlendirmede faydalı bir test haline geldiği öne sürülmektedir. AgNOR boyama prosedürünün spesifikliğı ve kolaylığı bu tekniğın, insan patolojisinde, hücre biyolojisinde ve gelişen biyolojide geniş bir kullanım alanı sağladığı belirtilmektedir (34).

Ökaryotik hücreler, rRNA sentezini hızlı bir şekilde düzenleyen bir mekanizmaya (downregulation) sahiptirler. Bu düzenlenme, memeli hücreleri temel amino asitlere ihtiyaç duyduğu zaman gözlenir ve mekanizmanın kontrolüne ribonükleoproteinler katılmaktadırlar (13).

Transkripsiyon ve proliferasyon (çoğalma) boyunca ortaya çıkarılan major AgNOR proteinleri; nükleolin (C23 proteini) ve Nükleofosmin (B23 proteini)'dir (25, 26, 30, 33, 44). C23 proteini ve B23 proteini, çekirdekçiklerde en bol bulunan AgNOR proteinleridir (26, 31, 32).

İnsan hücrelerinde interfaz boyunca daha fazla miktarda ifade edilen AgNOR proteinleri; Nükleolin ve Nükleofosmin ve bunların yanında gümüş boyanmanın küçük bir miktarından sorumlu olan 42, 40 ve 29 kDa'luk polipeptidlerdir (1, 30, 32, 35).

Mitoz boyunca AgNOR proteinleri ya sitoplazmada kromozomların etrafına dağılmış olarak çözünmüş halde ya da NOR'lar içinde ribozomal genlerle birleşmiş haldedirler (30, 32). İnsan hücrelerinde mitoz boyunca metafaz kromozomları üzerindeki NOR'larla birleşmiş major AgNOR proteinleri; RNA polimeraz-I'in en büyük alt birimi, 135 kDa'luk NOR proteini, UBF transkripsiyon faktörü ve 50 kDa'luk bir proteindir (1, 30, 32). Mitoz boyunca kromozomlarla birleşmiş AgNOR proteinlerinin miktarının, total AgNOR proteinlerinin %5-10'u olduğu tahmin edilmektedir (32).

Bunun yanında, Nükleolin ve Nükleofosmin, hem kromozomal hem de sitoplazmik ekstraktlarda ortaya çıkarılmıştır. Total nucleolinin %2-5'i kromozom ekstraktları ile birleşmiştir (30, 32). B23 proteini, insan mitotik hücrelerinde genellikle kromozomların periferinde ve kromozomal ekstraktlardan daha fazla miktarda sitoplazmada bulunur. (30, 32). Bu proteinlerden bazıları metafaz kromozomları üzerindeki NOR'larla birleşmiş olarak kalırken, bazıları da sitoplazmada çözünmüş olarak bulunurlar. AgNOR proteinlerinden çoğunluğu, mitoz boyunca sitoplazmada bulunur (30). Fakat burada, kromozom izolasyonu için gerekli olan hipotonik şok boyunca, bazı proteinlerin sitoplazma içine salıverildiği ihtimali göz ardı edilemez (32).

#### **2.4.1. Nükleofosmin (B23 proteini, neumatrin ya da NO38)**

İnterfazda major AgNOR proteinlerinden biri olan protein B23, 35-40 kDa'luk moleküler ağırlığı ile ribozomal olmayan RNA'ya bağlanan bir fosfoproteindir. İnsanlarda ve ratlarda B23, en az iki izoformda sentezlenir. Bunlar; B23'ün major nükleolar formu olan 37-38 kDa'luk B23.1 ve 35-36 kDa'luk B23.2'dir. Bu her iki izoformu bir tek gen tarafından şifrelenir (45).

Ön-ribozomal partikül organizasyonunun ileri basamakları ile meşgul olan B23, aynı zamanda ön-ribozomların çekirdek birikiminde de görev yapar (1, 30, 31, 35, 45). B23'ün hücre gelişiminin düzenlenmesinde (45) ve nükleo-sitoplazmik transport sürecinde de işe karıştığı ileri sürülmektedir (31). Ayrıca B23, oldukça bol bulunan çekirdekçik fosfoproteinidir (31).

Ultra yapısal seviyede, B23 esas olarak ön-ribozomların toplandığı çekirdekçik içi bir bölge olan granüler bölgede bulunur. Aktif olarak çoğalan hücrelerde bu bölge, çekirdekçik hacminin yaklaşık olarak %60'ını oluşturur. Halbuki çoğalmayan hücrelerde (insan periferik kan lenfositlerinde olduğu gibi) bu bölge önemli ölçüde azalmıştır. Bu yüzden, protein B23 miktarının in vitro çoğalması için aktive edilmiş normal lenfositlerde aynı zamanda lenfoproliferatif hastalıklı hastalarda

artması beklenilebilir (45). B23'ün immüno-boyama modelinin, hücre çoğalma durumunun güvenilir bir immüno-sitokimyasal marker'i olabileceği ifade edilmiştir. Daha da ötesi, B23'ün immüno-lokalizasyonu çoğalma için lenfosit aktivasyonunda Ki-67'den daha erken bir gösterge olarak yardımcı olabilir ve böylece prognostik amaçlar için klinik pratikte uygulanabilir. B23'ün miktarının değerlendirilmesi farklı kan kanserlerinde teşhis için önemli olabilir ve hastalığın gidişini tahmin etmeye yardımcı olabilir (45).

#### **2.4.2. Nükleolin (C23 proteini)**

rRNA moleküllerinin transkripsiyonunda ve işlenmesinde önemli bir rol oynayan 105 kDa'luk bir fosfoproteindir (1, 30, 33, 35). Nükleolin, önribozom birleşmesinde işe karışan ve aynı anda her yerde mevcut olan çok fonksiyonlu bir proteindir ve hem interfazda nükleolar kromatinle hem de mitoz süresince metafazik kromozomlar üzerindeki NOR'larla birleşmiş olarak bulunur (26).

Nükleolin, önemli çekirdekçik proteinlerinden biridir ve bir çok görev, farklı yapısal ve fonksiyonel modeller içeren bu proteine atfedilmiştir. Nükleolin, RNA polimeraz-I tarafından ribozomal genlerin transkripsiyonel kontrolünde ve RNA polimeraz-I'i rRNA'ya bağlamada işe karışabilmektedir (26, 31, 33).

Bununla birlikte, nükleolinin; rRNA'nın yapımında esas olarak da erken olgunlaşma sürecinde ve DNA topoizomeraz-I'e bağlandığı için rDNA'nın transkripsiyonu sürecinde işe karıştığı belirtilmiştir (26, 44). Nükleolinin aynı zamanda, B lenfositlerde immünoglobulin sınıf değişikliği için pol-II'nin transkripsiyonel regülasyonunu yöneten genlerden uzakta çok sayıda çekirdekçik dışı görevlerde de bulunduğu öne sürülmüştür (31). Nükleolinin, H<sub>1</sub> histonuna bağlanarak, kromatin dekondensasyonuna neden olması, onun yapısal bir göreve de sahip olduğunu göstermektedir (33, 35).

Nükleolin'in, amplifiye edilen çekirdekçik ve nükleoplazma arasında bir set oluşturarak bu iki bölgeyi birbirinden ayırdığı öne sürülmektedir (46). C23 proteini, metafaz süresince kısmi proteolizis ya da defosforilasyona oldukça duyarlıdır (25).

Nükleolinin ifade edilmesi, major AgNOR proteinleri arasında hücre döngüsüne en bağımlı olanıdır ve nükleolinin ifadesi hücre döngüsü boyunca düzenlenir (26, 44). Bu yüzden, nükleolinin derişimi, hücre çoğalmasını değerlendirmede bir araç olabilir (44).

#### **2.4.3. RNA Polimeraz-I Alt Birimleri**

180 kDa'luk AgNOR proteini, RNA polimeraz-I'in en büyük alt birimidir. Transkripsiyon (çoğalan hücreler) ve transkripsiyonun inaktif olduğu durum (tavuk eritrositleri gibi çoğalmayan hücreler) boyunca çekirdekçiklerdeki boyanmaya katılabilirler (32). Ribozomal genlerle birleşmiş olan mitotik AgNOR proteinleri, interfaz boyunca AgNOR boyamanın temel düzeyini oluştururlar (32).

#### **2.4.4. UBF (Transkripsiyon Faktörü)**

97-94 kDa'luk protein, RNA polimeraz-I'in transkripsiyon faktörü, UBF'dir. RNA polimeraz-I üst bölgeye bağlanma faktörü (UBF)'nün mitoz boyunca ribozomal genlerle birleşmiş olarak kaldığı bilinmektedir (32).

#### **2.4.5. 135 kDa'luk AgNOR Proteini**

Kromozomal ekstraktlar, 135 kDa'luk bir AgNOR proteini içerirler. Bu protein oldukça fosforile edilmiştir ve bir AgNOR proteini olarak ilk önerilen proteindir. Bu protein NOR'ların temel bir bileşenidir ve çoğalmanın bir marker'ı olduğu öne sürülmektedir. Fakat fonksiyonu bilinmemektedir. Çekirdekçik ekstraktlarında bir AgNOR proteini olarak bulunur (32).



## **2.5.AgNOR PROTEİNLERİNİN ÖLÇÜMÜ**

AgNOR lekelerinin ölçümlendirilmesi, NOR sayısı ya da NOR alanı gibi kesin bir değer olarak, NOR index'ini belirler (5). AgNOR proteinlerinin ölçümü için iki metod önerilmiştir; Counting (sayma) metodu ve morfometrik metod (5, 18, 44, 47).

Sayma metodu; doğrudan mikroskopta yüksek büyütmede (1000X), kesit kalınlığının bir ucundan diğer ucuna dikkatlice odaklayarak, hücre başına her bir gümüş boyalı lekenin sayımıdır (5, 18). Bu yaklaşımın tartışılmaz avantajı, uygulamak için kolay ve ucuz olmasıdır. Fakat bununla birlikte, hızlı bir şekilde çoğalan kanser hücrelerinde sıkça olduğu gibi, tek AgNOR lekeleri bir arada kümelenmelerinde ya da kısmen birbirlerinin üstünü örttüklerinde (çakıştıklarında) sayma metodu, subjektif ve tekrarlanabilmesi güç hale gelir. Daha da ötesi, özellikle kanser hücrelerinde her bir gümüşle boyalı lekenin boyutunu dikkate almaksızın yapılan AgNOR sayımı çok değişken olabilir (4, 18). Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için Derenzini ve arkadaşları (1989) ile Rüschoff ve arkadaşları (1990) morfometrik metodu önermişlerdir (18).

Morfometrik metod; bilgisayar yardımlı görüntü analizi ile nükleer kesitin yandan çekilen resmi içinde gümüşle boyalı yapılar tarafından kaplanan alanın, otomatik ya da yarı otomatik ölçümüdür. Sayma metoduna göre morfometrik metod; daha hızlı, daha doğru, daha yinelenebilir ve daha nesnel bir metottur (4, 18). Bu metodun uygulanabilirliğindeki tek sınırlılık, uygun aletlere ( ışık mikroskobu üzerine monte edilmiş bir CCD kameradan oluşması ve özel morfometrik bir bilgisayar yazılımı ile donatılmış bilgisayara bağlı olması) ihtiyaç göstermesi ve bilgisayar kullanımına ve istatistiğe biraz aşına olmayı gerektirmesidir (18).

Kullanılan fiksatif, sıcaklık ve boyama reaksiyonunun süresi, NOR boyanabilirliğini büyük ölçüde etkiler (4, 18). Gerek sayma gerekse morfometrik metodlardan elde edilen AgNOR değerleri, büyük ölçüde bu değişkenlerin belli koşullarına bağlıdır. Fakat bununla birlikte, sayma yönteminin aksine morfometrik yöntem, farklı fiksatiflerin yada gümüş boyama protokollerinin kullanımı ile üretilen boyanma değişikliklerini dengeleyebilir. Gerçekten de, kanser hücrelerinin ortalama AgNOR alanı ile ilgili olarak, farklı fiksatiflerle fikse edilmiş ya da farklı boyama prosedürlerine göre boyanmış tümör örnekleri arasında karşılaştırılabilir veri elde etmek mümkündür (18).

İlk “Onkolojide AgNOR” çalışmayı süresince, “AgNOR’ değerlendirilmede uluslar arası komite” AgNOR ölçümlendirmesi için, görüntü analizinin kullanımı şiddetle önermiş ve 1994’de Regensburg’da bulunan çalıştay boyunca, sito-histolojik örneklerde AgNOR protein analizi için tercih edilen metod olarak görüntü analizi gösterilmiştir (18).

## **2.6.İNSAN T-LENFOSİT İNTERFAZ ÇEKİRDEKÇİKLERİNİN (NÜKLEOLUS) YAPISI VE FONKSİYONU**

Çekirdekçik, ökaryotik hücrelerde hücre çekirdeği içinde düzenlenen, rRNA sentezinin, işlenmesinin ve ribozom üretiminin meydana geldiği, çekirdek altı zarsız büyük bir organeldir (3, 15, 31, 33, 46, 48-51). Bu bölgede, aktif rDNA, RNA polimeraz-I tarafından hızlı bir şekilde kopyalanırlar (3). Hem ribozomal genlerin düzeni hem de ribozomal gen ifadesinde işe karışan polimeraz, çekirdekçiğin organizasyonunu ve yerleşimini güçlü bir şekilde etkiler (15). Çekirdekçiklerin varlığı rRNA gen transkripsiyonuna bağlıdır (50). Kararlı durumdaki çekirdekçik, materyalin içeri akışını, transkripsiyon ve işlenme olaylarını, ribozomal alt ünitelerin dışarı atılmasının yanı sıra aynı zamanda birleşmesini içerir (15, 31).

İnsan hücrelerinin çekirdekçiklerinde yaklaşık 350 protein tanımlanmıştır (15). İnsan hücresinin çekirdekçığı, RNA ve proteinlerin yüksek konsantrasyonlarından dolayı, ışık ve elektron mikroskobu ile morfolojik olarak oldukça iyi ayırt edilebilen en dikkat çekici yapıdır (2, 15) ve bize kromatin organizasyonu ve transkripsiyonu arasındaki ilişkileri açığa çıkarmada en iyi olanakları sağlar (51).

Çekirdekçik, rRNA öncül moleküllerinin sentezlendiği ve olgun hale geldiği yer olmasının yanı sıra, rRNA öncül molekülleri burada spesifik ribozomal ve ribozomal olmayan proteinlerle düzenli olarak birleşerek ön-ribozomal molekülleri oluştururlar (3, 5, 15, 31, 46, 49). Her bir çekirdekçik, olgunlaşmanın çeşitli basamaklarındaki ön-ribozomal parçacıkların bir kümesini içerir (3, 17, 23). Neticede, hemen hemen olgunlaşan ribozomal alt birimler çekirdekçikten serbest bırakılırlar ve nükleer por komplekslerinden geçerek protein biyosentezinde önemli rol oynadıkları sitoplazma içine taşınırlar (46, 49). Çoğu yüksek ökaryotik hücre tiplerinde çekirdekçik, nükleer zarın yakınına yerleşmiştir. Bu yerleşim sitoplazmaya ribozomal partiküllerin transportunu kolaylaştırabilir (52).

Çekirdekçik, sitoplazmik yapıların farklılaşmasını düzenlemede merkezi bir rol oynar. Kabaca nükleer yapıda işe karışan ana değişiklikler, interkromatinik materyal ve kondanse kromatinin; dağılımı, nispi miktarı, şekli ve büyüklüğüdür. Örneğin, kuşlarda eritrosit farklılaşması boyunca nükleer büyüklük azalır, kondanse kromatin toplanması çoğalır ve çekirdeğin interkromatinik alanı belirgin olarak azalır. Hücre döngüsünde kromatin toplanmasının düzenlenmesi interfaz boyunca olur (53).

Çekirdekçik diğer önemli fonksiyonlarla da ilgilidir. Bunlar; gelişme ve hücre döngüsü kontrolü, tümör oluşumu, yaşlanma, ribozomal olmayan RNA'ların ve/veya ribonükleoproteinlerin (RNP) olgunlaşması ve/veya birleşmesi ve ribozom-dışı makro molekül ya da makro molekül komplekslerinin nükleolar alışverişleridir (3, 15, 49). Bunun yanında

çekirdekçikler, geniş ölçüde mRNA işlenmesi ve mitozun yanı sıra hücrel fonksiyonları da düzenlerler (50).

İnterfaz çekirdekçiklerinin yapısal birleşimi hücre tarafından kontrol edilir ve bütünlüğü çekirdek ya da matriks sistem tarafından sağlanır. Çekirdekçiklerin oluşumunda, matriks sistemin yanında rDNA'da major bir rol oynar (2). Çekirdekçiklerde ribozomal genler, ipliksi merkez ve yoğun ipliksi bölgede yerleşim gösterirler (33, 36, 43).

Çekirdekçikğin şekli, hücrenin tipine, gelişimsel basamağına, metabolik, fonksiyonel ve fizyolojik durumuna bağlıdır (3, 15, 17, 31). Elektron mikroskopunda, mayanın yanı sıra bitki ve hayvan somatik hücrelerinin çekirdekçikleri ayrıntılı olarak içten dışa doğru üç temel bölümden oluşur (11, 15, 17, 31, 51, 52, 54). Bunlar;

**1. İpliksi Merkez (Fibrillar Center, FC, Core Structure):** Büyüklüğü, sayısı ve ultrayapısal görünüşü oldukça değişkendir (17, 29). Elektron mikroskobu görünümü, genellikle dairesel şekildedir ve çok az RNA içerir (3, 15). DNA, RNA pol-I ve diğer proteinleri içeren ve açık boyanan transkripsiyon bölgeleridir (51, 52). Elektron mikroskobu görünüşüne ve diğer bazı kriterlere (hem interfaz FC'lerde hem de mitotik NOR'larda; ribozomal genlerin, pol I ve UBF'nin bulunması gibi) göre, FC'ler NOR'lara benzer ve mitotik NOR'ların interfaz karşılığı olarak değerlendirilirler (1, 15).

FC'ler esas olarak, memeli hücrelerinde aktif ribozomal genlerin düzenlenmesinde yapısal bir rol oynamalarına rağmen, inaktif genlerin depoları olarak görev yapabilmeleri de muhtemeldir (15).

**2. Yoğun İpliksi Bölge (Dense Fibrillar Component, DFC):** Gümüşle boyanabilen proteinlerin yanı sıra, DNA ve RNA'nın her ikisini de içeren ipliksi merkezin çevresinde, yoğun boyanan bir bölgedir (3, 29, 52). DFC bazen, FC içine çıkıntılarla intranükleolar bir retikulum oluşturabilir (15, 29). DFC'ler, yüksek yoğunluklarda ribonükleo-proteinleri içerirler (15). rDNA transkripsiyonunun ve rRNA işlenmesinin ilk basamakları-

nın, muhtemel olarak bu bölgede meydana geldiği ve böylece, bu bölgenin RNA sentez bölgesi olabileceği belirtilmiştir (23, 52).

**3. Granüllü Bölge (Granular Component, GC):** FC'lerin ve DFC'nin etrafını kuşatan ve çekirdekçiğe şeklini veren, çekirdekçiğin en dış çevresindeki bölgedir (15, 29, 33). Ribonükleer protein partiküllerini toplar ve ön-ribozomların farklı aşamalarını içerir (3, 15, 23, 33). Granüllü bölge, rRNA transkriptlerinin olgun bir biçime hazırlandığı bölgedir (15, 52). Metabolik olarak aktif hücrelerin çekirdekçiğinin ana gövdesi GC olarak isimlendirilir (3).

FC'ler ve DFC, interfaz boyunca gümüşle boyanan NOR (AgNOR) proteinlerinin seçici olarak yerleşim gösterdikleri bölgelerdir (26, 29, 33, 37). Elektron mikroskopunda görülen interfaz çekirdeğinde, gümüş granüllerinin çökmesinin en fazla çekirdekçiğin ipliksi merkezi üzerinde meydana geldiği öne sürülmektedir (11, 26, 29). Bununla birlikte FC ve DFC arasındaki geçiş tabakasının, en muhtemel transkripsiyon bölgesi olduğu bildirilmesine rağmen, aktif rRNA genlerinin tam olarak nerede bulunduğu ve rRNA transkripsiyonunun tam olarak hangi bölgede yapıldığı hala tartışmalı durumdadır (23, 31, 51, 54).

Çekirdekçik, ileri ökaryotik hücre döngüsü boyunca geniş ölçüde yapısal değişikliklere maruz kalır. En çarpıcı değişiklikler, mitoz süresince ortaya çıkar. Profazda, parçalanır ve telofazda, iki kardeş hücrenin yeniden şekillenen çekirdeğinde yeniden ortaya çıkar (29, 31, 46, 49). Mitozdan sonra çekirdeğin yeniden oluşumu, yeniden başlayan rRNA sentezini yansıtır (15, 31, 49). Sonuç olarak çekirdekçiğin varlığı, rRNA gen transkripsiyonuna bağlıdır (50).

Bir hücredeki çekirdekçik sayısı bazı faktörlere bağlı olarak değişebilir;

1. Bir hücrede en fazla gözlenebilen çekirdekçik sayısı, en çok bu hücredeki NOR sayısı kadar olabilir.
2. Çekirdekçiğin sayısı hücrenin fonksiyonel durumundaki değişikliklerle ilişkilidir. Önceden inaktif olan NOR'ların aktivasyonu sonucunda artabilir, ya da diğer yandan, özellikle daha uzun süreli interfazda aktif NOR'ların birleşmesi sonucunda azalabilir.
3. Çekirdekçiğin sayısı, sık sık meydana gelen mitotik bölünmelerden dolayı artabilir (10).

## **2.7.RİBOZOM OLUŞUMU**

Ribozom oluşumu, rDNA'nın transkripsiyonunu, öncül rRNA'nın işlenmesini ve ribozomal proteinlerle rRNA'ların birleşmesini içeren bir süreçtir (3, 15, 48). Ribozom oluşumu çekirdekçikte meydana gelir (3, 15, 49, 55). Ribozom oluşumu, hücrelerdeki major bir enerji ve biyosentetik talebin yanı sıra, hücre adaptasyon, gelişme ve çoğalma için de gereklidir. Bu nedenlerle, ribozom oluşumu arz ve talebin dengelenmesi için tam düzenlenmeyi gerektirir (50, 55).

Olgun 80S ökaryotik ribozomu, 60S (büyük) ve 40S (küçük) olmak üzere iki alt birimden oluşur. Ribozomun her bir alt birimi, uzun bir ön-rRNA molekülüyle birleşmiş yaklaşık 80 ribozomal proteinlerden oluşur (13, 15, 48, 50, 55). Ribozom sentezi boyunca, polisistronik bir ön-rRNA kopyasının, 40S alt birimi olgun 18S rRNA'ya ve 60S alt birimi de 5,8S ve 28S rRNA'ya işlenir. Ek olarak, rRNA'lar, bağımsız olarak kopyalanan 5S rRNA ile ve 80 ribozomal proteinlerle birleşmek zorundadırlar (48, 49). rRNA'nın ağırlıklı görevi yapısaldır ve katalitik aktiviteye sahiptir. Hücre içindeki total RNA'nın %80'inin oluşturur (55). rRNA, her bir translasyon evresi boyunca mRNA ya da tRNA ile karşılıklı olarak birbirini etkiler. rRNA'daki mutasyonlar, protein sentezinin özgüllüğünü etkileyebilir (13).

Ribozomların birleşmesi, yaklaşık 80 farklı ribozomal proteinin sitoplazmadan çekirdekçik içine sürekli bir akışını ve tamamlanmış ribozomal alt birimlerin zıt yönde dışarı (çekirdekçikten sitoplazmaya) gönderimini gerektirir (31). Tam bir ribozomun birleştirilmesi ve sentezi, hücrenin her yerinde meydana gelen kompleks bir seri yollar içerir. RNA polimerazın üç tipi de ribozomal bileşenlerin sentezinde işe karışır. RNA polimeraz-I (pol-I); 28S, 18S ve 5,8S rRNA'ların sentezini yapar (15, 55) ve bu rRNA'lar ökaryotik ribozomun yapı iskelesi ve katalitik kalbidirler ve bir tek ön-rRNA olarak sentezlenirler (50). RNA polimeraz-II; ribozomal proteinler için ön-mRNA'ların sentezini, RNA polimeraz-III'de; ribozom yapımının çeşitli basamakları için gerekli olan küçük RNA'ların yanı sıra geri kalan 5S rRNA'nın sentezini yapar. Bunların çoğunun ana ilkesi, ön-ribozomal parçacıklar halinde toplandıkları yer olan çekirdekçikte bir arada olmaktır. Bu kompleksler, nükleoplazma içinden geçerler, nüklear porlar vasıtasıyla sitoplazmaya çıkarlar ve sitoplazmada olgun ribozomlar haline gelirler (15, 55).

## **2.8.FİTOHEMAGLUTİNİN İLE T-LENFOSİTLERİN AKTİVASYONU**

Fitohemaglutinin (FHE), *Phaseolus vulgaris* (red kidney beans)'den elde edilen bir mukoproteindir (56, 57). Bu madde esas olarak, eritrosit kümeleştirmesi (aglutinasyon) yeteneğinden dolayı kültürleri hazırlamada, tüm kandan lökositleri ayırma aracı olarak kullanılır. Aynı zamanda bu madde, monosit ve büyük lenfositlerin başkalaşımını uyararak mitozu başlatabilme yeteneğine de sahiptir. Dolayısıyla lökositlerin mitotik potansiyelini uyararak, mitotik aktivitenin özgün bir başlatıcısı olarak da görev yapar. FHE'nin varlığında hücre bölünmesi meydana gelir, yokluğunda ise mitoz görülmez (56).

Bununla birlikte FHE'nin, uyarılmış hücreler üzerinde, bazı konsantrasyonlarında hücrede değişikliklere yol açan sitotoksik etkiye sahip olduğu da belirtilmiştir (45). *In vitro* olarak, FHE ile uyarılmış lenfositlerin daha ileri kültürlerinde, etkili bir hücre ölümünün meydana geldiği gösterilmiştir (45).

Normalde, kemik iliği gibi dokular in vivo olarak nispeten yüksek bir mitotik indekse sahiptirler ve böylece, her zaman, birkaç saat içinde uyarıya yanıt verebilen, bölünebilme yeteneğinde olan bir çok hücre içerirler. Karaciğer hücreleri gibi hücreler ise normalde, çok düşük mitotik aktiviteye sahiptirler ve uyarıya ancak birkaç günlük bir süreden sonra yanıt verebilirler. Bu süre boyunca organları oluşturan farklılaşmış hücreler, alışılmış özgün görevlerinden, mitotik protein ve diğer maddelerin sentezine doğru yön değiştirirler. FHE, bu kültür sisteminde yön değiştirme sürecini başlatan bir maddedir. Diğer taraftan, bölünme yeteneğindeki lökositler (kemik iliği, lösemik blastlar gibi), kendi kendine mitotik süreç için FHE'nin varlığına gerek duymazlar (56).

İnsan periferik kan T-lenfositleri, normalde hücrelerin Go fazında dinlenme halinde olduğu bir topluluktur. Bu hücreler, FHE ile muamele edilerek hücre bölünme döngüsüne yani çoğalmaya teşvik edilebilirler (57, 58). Periferik kan lenfositleri, FHE gibi mitojenlerle uyarıldığında blast benzeri (genç) hücreler halinde gelişirler ve küçük lenfositler büyük lenfoblastlara dönüşürler (10, 15, 17, 57, 59, 60). Bu hücrelerin çekirdekçiği aktivasyon boyunca önemli değişikliklere uğrar (10, 15, 59, 60) ve çekirdekçikler gittikçe artan bir gevşemeye maruz kalırlar (17). FHE ile uyarılma, lenfositlerin çekirdekçiklerinde değişikliklere yol açar ve FHE ile uyarılmış ve uyarılmamış lenfositlerin interfaz çekirdekçikleri arasında farklılıklar bulunur (10, 15, 23, 60).

Uyarılmamış (dinlenme halindeki) insan periferik kan lenfositleri, genellikle halka şeklinde küçük bir çekirdekçik içerirler (10, 15, 23, 60). Uyarılmamış lenfositlerde görülen bu halka şeklindeki bir adet küçük çekirdekçik gümüş boyamayla da gösterilebilmektedir (10, 23, 60). İnaktif (uyarılmamış) hücrelerde NOR'lar sıklıkla küçük ve bir adet olarak görünürler. İn situ hibridizasyon sonuçları, uyarılmamış lenfositlerde çekirdekçiklerin dışında belirgin birkaç rDNA bölgelerinin bulunduğunu ve bütün NOR'ların bir çekirdekçiğin oluşumunda görev



almadıklarını göstermiştir. Yani, bekleme durumundaki lenfositlerde NOR'ların sadece bir kaç transkripsiyonel olarak aktiftir (10, 23, 60).

Hücre aktivasyonu arttığında, dinlenme halindeki lenfositlerin halka biçimindeki çekirdekçığının büyüklüğü, şekli, iç organizasyonu ve sayısı değişir (15). Küçük çekirdekçığın sayısı, FHE uyarımından sonra ilk birkaç saat boyunca artar ve bunu bir kaç halka yapılı büyük çekirdekçiklerin gelişimi izler (10, 15, 60). Çekirdekçığın sayısındaki bu artış, daha önce inaktif olan NOR'ların aktifleştiklerini göstermektedir (10, 23, 60).

Lenfositlerin FHE gibi mitojenler ile uyarımı süresince hücrel aktivasyon teşvik edilir. Önceden inaktif olan NOR'lar transkripsiyonel olarak aktif hale gelir ve aktivasyon kazanan NOR' lar birbirleri ile birleşirler. Böylece, FHE ile uyarılmadan sonra, çekirdekçiklerin oluşumuna katılan NOR'ların sayısı artar (23). Çekirdek içindeki NOR'ların faaliyetlerinde meydana gelen bu artışın, NOR'ların transkripsiyonel aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir (10). Böylece, uyarılmamış lenfositlerde bütün NOR'lar çekirdekçığın oluşumunda görev almazlar ve bu yüzden hepsi transkripsiyonel olarak aktif değildirler (10, 23).

NOR'ların bu birleşmesi, FHE uyarımından sonra meydana gelen ilk mitozda gözlenen yüksek frekanstaki akrosentrik bileşmeleriyle de uyumludur. Aktifleşmiş NOR'ların birleşmesi, NOR taşıyan akrosentrik kromozomların çekirdek içinde her tarafa hareket edebilmesi anlamına gelir (10).

FHE ile uyarılmış lenfositlerde, çekirdekçığın nükleer zar ile bağı sona ermiştir. Oysa, uyarılmamış lenfositlerde çekirdekçığın nükleer zarla bağının kopması nadir görülen bir olaydır (10).

Uyarılmadan önce T-lenfositler, büyüklük ve morfoloji bakımından homojen görünürler (~6 µm çapında). Uyarılmamış çekirdekte kondanse kromatin, tüm nükleer hacmin yaklaşık yarısını kaplar. Bu kromatinin hacmi, uyarılma boyunca çekirdeğin büyüklüğünde meydana gelen

artış gibi, önemli ölçüde değişmez. Uyarılmış çekirdek içindeki esas hacim değişimi interkromatinik (ökromatin) bölge ile temsil edilir (53).

FHE ile uyarılmadan sonra, T-lenfositlerin hem hücre büyüklüğünde hem de morfolojisinde önemli değişiklikler meydana gelir ve heterojen bir dağılım gösterirler (58). Uyarılmadan sonraki morfolojik değişiklikler, rRNA sentezindeki aktivasyonun tipik işaretleri olan çekirdekçik hacminde bir artış ve ağımsı yoğun çekirdekçiklerin görünüşü gibi çekirdekçik yapısındaki değişiklikleri gösteren birden fazla çekirdekçikli hücrelerin görünmesini içerir (23). FHE ile uyarılmış lenfositlerde, çekirdekler belirgin bir şekilde değişir ve büyüklükleri de artar (45, 53). Aktive edilmiş (uyarılmış) hücrelerde geniş çekirdekçik çok ince bölgelerden oluşan narin ağımsı (reticulate) bir yapı sergilerler (10, 23). Bu uyarılmaya heterokromatik bölgeler, geniş ölçüde biçimlerini değiştirerek eşlik ederler (53).

Lenfositlerin mitojenik uyarılmaya ilk yanıtı, interkromatinik materyalin miktarındaki artış nedeni ile çekirdek hacminde büyük bir artıştır. Hacim olarak büyürler ve çekirdek/sitoplazma hacim oranı azalır. İnterkromatinik materyaldeki değişikliğe, kromatinin membranla birleşmiş büyük kümelerden, küçük ayrı kümelerin oluşumuna değişmesi eşlik eder ki bunlar daha sonra, büyük ölçüde genişlemiş matriks'le dolu bölgenin içine yayılırlar. Bu yapısal yeniden düzenlenme boyunca, kondanse kromatinin miktarında önemli bir değişiklik olmaz ve kesinlikle azalmaz (53).

Lenfositlerin FHE ile uyarılması sonucunda rRNA sentezinde belirgin bir artış meydana gelir (10, 17, 23, 30, 57, 61). Bu da önceden inaktif rRNA genlerinin transkripsiyon için güçlendirildiği ve aktif olarak sentezlenen rRNA genlerinin sayısının arttığı anlamına gelir (17). Lenfositlerin FHE ile uyarılmasından sonra çekirdekçiğin gümüşle boyanırılıığı artış göstermektedir (10, 23, 61).

## **2.9.DOWN SENDROMU (TRİZOMİ 21; MONGOLİZM)**

Down sendromu (DS)'nun klinik belirtileri ilk kez, 1866 yılında John Langdon Down tarafından bildirilmiştir. Kromozomal düzensizlikler ise, ilk kez 1959 yılında Lejeune ve arkadaşları tarafından, DS ve üçüncü bir 21. kromozom arasında bir ilişki olduğunu keşfetmeleri ile ortaya çıktı (62).

DS, 21. kromozomun fazladan bir kopyası ile ortaya çıkan en yaygın kromozom anomalilerinden biridir (63-68). DS, yaklaşık 700 canlı doğumda bir görülürken bu oranın son yıllarda 1000 canlı doğumda bire indiği belirtilmiştir (62). DS'nu tanımlayan özelliklerin, 21. kromozomun uzun kolu (21q) içinde bulundurulan bazı genlerin, fazladan bir kopyalarının bulunmasından dolayı, bu genlerin aşırı ifade edilmeleri sonucunda oluştuğu varsayılmaktadır (64, 65). 21q, yaklaşık 37 Mb (37.000 kb)'dır ve insan genomunun %1'i kadarını oluşturur. 21. kromozomun kısa kolu (21p), diğer dört çift akrosentrik kromozomlara oldukça homologdur ve 21p'nin tamamen bulunmaması, klinik fenotiplerle birleşmez. Çünkü, t(21;21)'den dolayı oluşan trizomi 21'de, 21p yer değiştiren (transloke olan) kromozomlardan çıkarılmıştır ve bu trizominin klinik özellikleri diğer serbest trizomi 21'den farklı değildir (69). 21.kromozom en küçük insan kromozomudur (69, 70).

Trizomi 21, mental retardasyonun (zeka geriliğinin) en yaygın otozomal genetik nedenidir (63, 65, 67-69, 71). Mental retardasyona ve yüze ait özelliklere ek olarak, çok sayıda diğer fenotipler de DS ile birleşmiştir. Bunlar; erken yaşlanma, doğuştan gelen kalp hastalığı, Alzhemier hastalığının erken başlangıcı, immün sistem yetersizlikleri ve çocukluk lösemisinin artmış riskidir (62, 63, 65, 67, 71-74). DS'lu çocukların fiziksel özellikleri; dar damak, eklemlerin aşırı bükülgenliği, yassı burun kemiği, birinci ve ikinci ayak parmakları arasında boşluk, kısa geniş eller, kısa boyun, anormal diş, kısa beş parmak, açık ağız, enine buruşuk avuç içi ve çıkıntılı dil gibi diğer fiziksel bulguları içerir (72).

DS'unun göze çarpan fenotiplerinden birisi de, azalmış yaşam beklentisidir (66, 70, 71, 74). DS'luların ortalama ölüm yaşı, yaklaşık olarak 35'tir (70, 74). Fakat bununla birlikte, DS'lu 17.897 bireyde yapılan son bir araştırmada, ortalama ölüm yaşınının 49'a yükseldiği belirtilmektedir (62). DS'lu yetişkinlerde, normal yaşlanmayla birleşen klinik belirtilerden çoğu vaktinden önce meydana gelir ve Alzheimer hastalığının nöropatolojik bulguları gelişir (66, 70, 71, 74, 75). DS'lu yetişkinlerde Alzheimer hastalığının başlangıcı, genel popülasyonda yaşlanan yetişkinlerden 20 ya da daha fazla yıl daha erken başladığı bilinmektedir. 40 yaşına kadar hemen hemen tüm DS'lu bireyler, nöropatolojik bulgulara sahip olurlar (71, 74, 76, 77).

Trizomi 21'in, DS'na nasıl yol açtığı ile ilgili iki temel hipotez bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; kompleks DS fenotipinin görünüşüne katkıda bulunan ve 21. kromozom tarafından şifrelenen 300'den fazla genlerin fazladan birer kopyalarının bulunması ve bunun sonucunda da bu genlerden bazılarının aşırı ifade edilmeleridir (63, 65, 68). İkincisi ise; bu genlerin ürünlerinin, doğrudan ya da daha muhtemel olarak dolaylı bir şekilde, diğer genlerin ifadelerini ya da gen ürünlerini etkilemesidir (63).

18 Mayıs 2000'de, 21. kromozomun uzun kolunun tüm sekansı yapılmış ve böylece bu kromozom üzerindeki her genin teşhisi mümkün olmuştur (63). 21. kromozomun önceden 225 olan gen içeriğinin şimdi 329 olduğu tahmin edilmektedir. Bu genlerden 165'i deneysel olarak doğrulanmış genler, 150'si ifade edilen sekansların etiketlenmiş veri tabanına dayanan gen modelleri ve 14'ü de bilgisayar tahminleridir (62). Ek olarak, 21. kromozomun rRNA'ya şifrelenen gerçek kısmının, gen şifreleyen sekanslar tarafından işgal edilen kısımdan önemli ölçüde daha fazla bir dizilişe sahip olabileceği belirtilmiştir (62).

DS'nun oluş mekanizması, mayozun I. yada II. bölünmesinde meydana gelen ayrılama (non disjunction) yada anafazda geri kalma (anaphase lag) dan kaynaklanır (13, 66).

Down sendromlular sitogenetik olarak üç çeşittirler.

**1. Serbest trizomi 21;** Bu sendroma sahip bireylerin çoğunda (%95) 21. kromozomdan üç tane bulunur (13, 66, 69, 78). Bu serbest trizomi 21, mayoz evresinde ayrılamamadan oluşur (69).

**2. Translokasyon tipi trizomi 21;** DS'lu hastaların daha düşük bir kısmında (%1-5), 21. kromozomun bir kopyası diğer akrosentrik kromozomlara (D ve G grubu) transloke olur. Yani 21. kromozomun uzun koluyla (21q) diğer bir akrosentrik kromozomun uzun kolu sentromerde birleşmişlerdir ve kısa kollar da kaybolmuştur. Bu translokasyon "Robertsonian tipi translokasyon" olarak da bilinir. En çok 14. kromozom ile 21. kromozom arasında görülür (66, 69, 78). Translokasyonun, mayoz I'deki crossing-over 'dan önce meydana gelmiş olması, en olası mekanizmadır (69).

**3. Mozaik tip trizomi 21;** Bu hastaların bazı hücreleri normal kromozom kuruluşuna sahipken bazı hücreleri de üç tane 21.kromozoma sahiptirler. Başka bir ifadeyle, hücrelerden bir kısmı 46, bir kısmı da 47 kromozomludur. DS'lu bireylerin %1'inde görülür (13, 66, 69, 78).

## **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1. GEREÇLER**

#### **Demirbaş Malzemeler**

1. Etüv (Heto/Cell Hause 200)
2. Santrifüj (Nüve NF 815)
3. Su banyosu (Termal)
4. Vorteks (Janke&Kunkel VF2)
5. Mikroskop (Nikon Labophot 2, Olympus model CHK)
6. Fotomikroskop (Olympus)
7. Manyetik karıştırıcı (Janke&Kunkel)
8. Dengeleme terazisi
9. Hassas terazi (Kern S 2000)
10. Derin dondurucu (Uğur Derby)
11. Buzdolabı (Arçelik)
12. Bunzen beki
13. Zaman ayarlayıcı
14. Dispenser (Brand-Dispensette)
15. pH metre (NEL Mod 821)

16. Mikroskop ataşmanlı video kamera (Sony CCD-IRIS siyah beyaz video kamera SSC-M370CE)
17. Bilgisayar (Escort pentium II)
18. Bilgisayar yazıcısı (Epson stylus Color 640)
19. Kamera adaptörü (Sony YS-W130P)

### **Sarf Malzemeler**

1. Hams F<sub>10</sub> Medyum-Sıvı (Biological Industries, 01-090-1B)
2. Fetal Calf Serum (=FCS, Biological Industries, 04-001-1B)
3. Fitohemagglutinin-M (=PHA-M, Biological Industries, 12-006-1H)
4. L-Glutamin (Biological Industries, 03-020-1B)
5. Heparin (Nevparin®, 5000 IU/ml, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi)
6. Antibiyotik (Penisilin-Streptomisin, Biological Industries, 03-031-1C)
7. Kolşisin (Biological Industries, 12-004-1D)
8. Giemsa (Merck, 540040512)
9. Tripsin toz (Sigma, 1:250, T-4799)
10. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, 9021622)
11. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Merck, K1690176)
12. Glasiyal asetik asit (Merck, 247K18855556)
13. Metanol (Merck, 502K5275408)
14. Lamel yapıştırıcı (Entellan®, Merck, 640171987)
15. İmmersiyon yağı (İmmersiöl®, Merck, 09403569)
16. Alkol (% 96'lık saf alkol, Tekel)
17. Aseton (Merck, K11415613)
18. Ksilol (Merck, 207K03755385)
19. NaCl (Merck, 2448989)
20. KCl (Merck, 340TA611835)
21. AgNO<sub>3</sub> (Carlo Erba, 320904)
22. Etanol (Merck, K21078586)
23. Jelatin (Merck, 5214525)
24. Formik asit (Merck, K30486663)
25. pH Universal İndikatör pH 0-14 (Merck)

26. Distile su
27. Çeşitli cam laboratuvar malzemesi
28. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü (Grainer, polystrene)
29. Filtre kâğıdı (Whatman Filter Papers 25mm)
30. Enjektör 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml, 50ml (Sterijen)
31. Pastör pipeti
32. Lam (Objektträger)
33. Lamel (Menzel-Glasser 24x32mm)
34. Alüminyum Folyo
35. Fotoğraf filmi (Ilford 50 ASA siyah-beyaz, Fuji 100 ASA renkli)
36. Fotoğraf kartı (Ilford siyah-beyaz, Fuji Color Paper renkli)

## **3.2. YÖNTEM**

### **3.2.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi**

Tıbbi Genetik ünitesi ve Pediatri Anabilim Dalı'na Down Sendromu (DS) kuşkusu ile baş vuran 0-8 yaş arasındaki bireylerin periferik kanlarından lenfosit kültürü yapılmış ve kültür sonucunda elde edilen preparatlar G-bandlama yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Işık mikroskobu ile yapılan analiz sonucunda sadece 47,XX(XY)+21 karyotipine sahip olan 30 DS'lu birey kontrol grubu ile karşılaştırmak üzere seçilmişlerdir. Yine Pediatri Anabilim Dalı'nda yapılan muayenede hiç bir anomalisi bulunamayan, G-bandlama yöntemi ile yapılan kromozom analizi sonucunda da herhangi bir kromozom kusuru görülemeyen ve 46,XX(XY) karyotipine sahip olan 0-8 yaş arası 24 kişi de kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

DS'lu bireyler 15 kız ve 15 erkekten, sağlıklı bireyler ise 14 kız ve 10 erkekten oluşmaktadır.

### **3.2.2. Lenfosit Kültür Ortamının Hazırlanması**

Mevcut çalışmada DS'lu (30) ve kontrollerinden (24) oluşma 54 kişinin kanları, 4 farklı Fitohemaglutinin (FHE) konsantrasyonlu ortama ekilerek, her iki grubun T-lenfositlerinde FHE konsantrasyonunun interfaz ve metafaz NOR aktivitesine etkisi araştırılmıştır.



FHE konsantrasyonunun NOR aktivitesine etkisini incelemek üzere, 100 ml'lik Ham's F10 medyum içerisine; 30ml Fetal Calf Serum, 1 ml L-Glutamin, 1ml Penisilin-Streptomisin ve 1ml Heparin sabit olmak üzere sırasıyla 0.5 ml, 1 ml, 2 ml ve 3 ml FHE içeren 4 farklı kültür ortamı hazırlandı. Buna göre FHE'nin 4 farklı kültür ortamındaki yüzde (%) oranı hacim/hacim olarak sırasıyla; 0.37, 0.75, 1.48 ve 2.21 şeklindedir.

Steril şartlarda hazırlanan ortam, 10'ar ml'lik steril kültür tüplerine 5'er ml olacak şekilde eşit miktarlarda dağıtılarak -20 °C' de saklanmıştır.

### **3.2.2.1. Kültür İşleminin Uygulanması**

Çalışmamızda T-lenfositlerin üremesi için uygulanan kültür işleminde aşağıdaki basamaklar sırasıyla takip edilmiştir;

1. DS'lu ve sağlıklı bireylerden steril şartlarda, 1/10 – 1/20 oranında heparinize edilmiş enjektöre, yaklaşık 2-3 ml periferik kan alınmış ve oda sıcaklığında yaklaşık 3 - 4 saat bekletilmiştir.
2. Steril ortamda içinde 5ml medyum bulunan ve her birinde farklı bir konsantrasyonda FHE bulunan 4 farklı kültür ortamına, enjektör içindeki heparinize kanın yaklaşık 0.3–0.5 ml'si dışarı atıldıktan sonra 12'şer damla (~0.3 ml) ekim yapılarak 72 saatlik inkübasyon için 37 °C'lik etüve konulmuştur.
3. Tüplere 70'inci saatte 1'er damla final konsantrasyonu 0.1 µg/ml olacak şekilde kolşisin eklenerek iyice karıştıncaya kadar çalkalanıp etüve yeniden konulmuştur.
4. 72'inci saatte tüpler etüvden çıkartılarak 6 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Süpernatanı atılarak üzerine 37 °C'deki hipotonik çözültiden damla damla 6ml ilave edilerek 20 dakika 37 °C'lik etüvde bekletilmiştir.
6. Etüvden çıkarılan tüpler yeniden 6 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatanı atılmıştır.

7. İlk fiksasyon işlemi, tüplere damla damla 6ml soğuk fiksatif eklenerek ve 30 dakika +4 °C'de bekletilerek yapılmıştır.
8. Bekleme işleminin ardından tüpler 6 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatanı atılmıştır.
9. İlk fiksasyonda uygulanan işlemler ikinci ve üçüncü fiksasyonda da yinelenmiştir.
10. Fiksasyon işlemlerinin ardından dipte kalan hücre süspansiyonundan preparatların hazırlanmasına geçilmiştir.
11. Preparatlar, -8 °C sıcaklıkta % 70'lik etanol içinde saklanan lamaların gazlı bezle silindikten sonra, üzerlerine 7-8 damla hücre süspansiyonundan damlatılması ve havada kurutulmasıyla hazırlanmıştır.

Hücre süspansiyonlarından hazırlanan preparatlara daha sonra Giemsa boyama, G-bandlama ve AgNOR boyama tekniği uygulanmıştır.

### **3.2.2.2. Kültür İşleminde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Hipotonik Çözelti**

0.075 M KCl : 1.398 g KCl tartılarak üzeri distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

#### **Fiksatif Çözeltisi**

3:1 oranında metanol:Asetik asit karışımı: Kullanımdan en fazla yarım saat önce hazırlanarak -8°C'ye kaldırılmış ve soğuk olarak kullanılmıştır.

### **3.2.3. G Bandlama**

#### **G-Bandlamada kullanılan Çözeltiler**

##### **Sörensan Tamponu (pH=6.8)**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>'den 18.96 g,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>'den 18.16 g,

tartılıp 1000 ml distile suda çözülmüş ve üzeri distile su ile 2000 ml'ye tamamlanmıştır.

### **Tripsin Çözeltisi**

1:250'lik tripsinden 0.06 g tartılarak üzerine 50 cc Sörensan tamponundan eklenmiştir.

### **G-Bandlama Yöntemi**

Preparatlar, 37 °C'deki kuru etüvde 3 gün bekletilerek eskitilmişlerdir. Eskitilmiş preparatlar bandlanma durumlarına göre değişen sürelerle göre tripsin solüsyonunda tutulmuşlardır. Preparatlar tripsin solüsyonundan çıkarılır çıkarılmaz 2-3 saniye Sörensan tamponunda çalkalanmışlardır. Sörensan tamponundan çıkarılan preparatlar % 5'lik Giemsa boyasında, 6 dakika boyandıktan sonra, havada kurutulup, üzerleri entellan kullanılarak lamel ile kapatılmıştır.

### **3.2.4. Giemsa Boyama**

#### **Kullanılan Çözeltiler**

#### **Sörensan Boya Tamponu (pH=7.0)**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>'den 8.65 g,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>'den 5.26 g,

tartılarak üzeri distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır.

#### **% 5'lik Giemsa Çözeltisi**

**Hazırlanışı:** Sörensan boya tamponundan 95 ml alınarak, üzerine 5 ml Giemsa boyası eklenmiş ve hazırlanan boya çözeltisi filtre kâğıdından süzölmüştür.

**Boyama İşlemi :** Hazırlanan preparatlar % 5'lik Giemsa çözeltisi içinde 6 dakika bekletilerek boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.5. AgNOR Boyama**

#### **Kullanılan Çözeltiler**

#### **% 50'lik AgNO<sub>3</sub> Çözeltisi (Ağırlık/ağırlık olarak ~ % 33'lük)**

1 g AgNO<sub>3</sub>'ün 2 ml bidistile su içinde çözölmesiyle hazırlanmıştır.

Çözelti +4 °C' de ve karanlıkta saklanmıştır.

**% 1'lik Formik asit Çözeltisi**

1ml formik asitin üzeri distile su ile 100ml' ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

**% 2'lik Jelatinli Formik asit Çözeltisi**

Oda sıcaklığında 98 ml % 1'lik Formik asit içinde 2 g jelatinin çözünmesiyle (% 2'lik jelatin) elde edilmiştir. Elde edilen karışım filtre kâğıdından süzölmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

**Gümüş Boyama Çözeltisi**

% 50'lik AgNO<sub>3</sub>'den 1 ml (iki hacim)

% 2'lik Jelatinli Formik asit'den 0.5 ml (bir hacim)

alınarak, ışık görmeyen etrafı alüminyum folyo ile kaplanmış bir tüp içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır.

Gümüş Boyama solusyonu her kullanımda yeniden hazırlanmıştır.

**% 2'lik Giemsa Çözeltisi**

**Hazırlanışı:** Sörensan boya tamponundan 98 ml alınarak, üzerine 2 ml Giemsa boyası eklenmiş ve hazırlanan boya çözeltisi filtre kâğıdından süzölmüştür.

**AgNOR Boyama İşlemi**

Luther E. Lindner tarafından kullanılan gümüş boyama metodu (9) hafif değiştirilerek AgNOR boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde sıcaklık 37°C'ye çıkarılırken, süre 15 dakikaya düşürölmüştür.

Preparatlar ilk önce 1-2 dakika distile suda bekletilerek üzerlerindeki asetik asit dilüe edilmiş ve daha sonra havada kurutulmuştur. Havada kurutulan preparatlar daha sonra içinde distile su ile ıslatılmış kurutma kâğıdının bulunduğu petri kabının içerisinde yerleştirilmiştir. Preparatların üzerine pastör pipeti ile % 50'lik AgNO<sub>3</sub> ve jelatin/formik asit karışımından oluşan gümüş boyama solüsyonundan 3-4 damla damlatılmış ve üzerleri lamelle kapatılmıştır. Sonra hızlı bir şekilde petri kabının kapağı kapatılarak, etrafı ışık almayacak şekilde aliminyum

folyo ile sarılıp 37 °C'deki etüvde 15 dakika bekletilmiştir. 15. dakikanın sonunda etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller düşünceye kadar distile su ile yıkanmış ve % 2'lik Giemsa solüsyonunda 10 saniye süreyle boyanmıştır.

Sonuçta tüm preparat üzerindeki bütün bölgelerde hedeflediğimiz kalitede homojen NOR boyanmalar elde edilmiştir.

### **3.2.6. FHE Konsantrasyonuna Göre T-Lenfositlerdeki Metafaz ve İnterfaz NOR Aktivitelerinin Değişiminin Değerlendirilmesi**

DS'lu ve sağlıklı bireylerin T-lenfositlerinde FHE konsantrasyonuna göre metafaz ve interfaz NOR aktivitelerinin değişimini araştırmak için, dört farklı konsantrasyonda FHE içeren medyumlardan hazırlanmış ve AgNOR boyama işlemi uygulanmış her bir preparattan 100 metafaz ve 50 interfaz alanı incelenmiştir. Her iki grupta FHE konsantrasyonuna göre T-lenfositlerdeki metafaz NOR aktivitelerinin değişimi ışık mikroskobu ile interfaz NOR aktivitelerinin değişimi de bilgisayar yardımı ile değerlendirilmiştir.

#### **3.2.6.1. Işık Mikroskobu ile Metafaz NOR'larının Analiz İşlemleri**

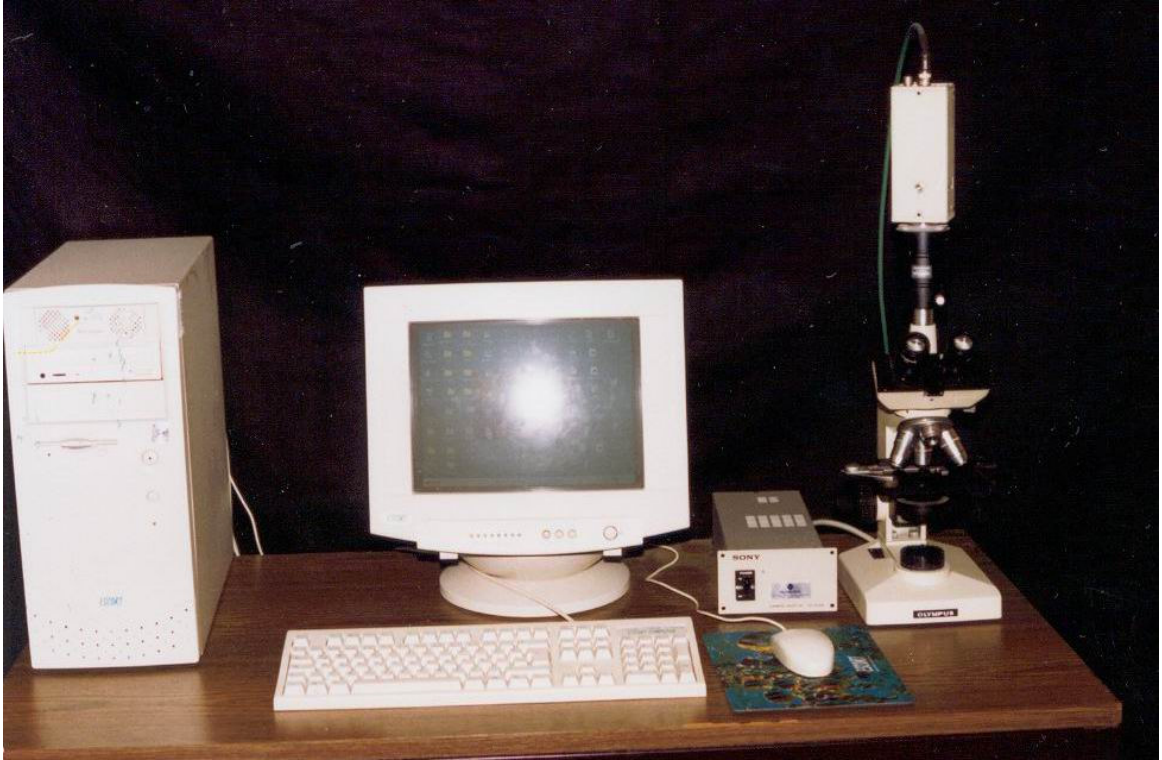
FHE konsantrasyonuna göre metafaz NOR aktivitelerinin değişimini değerlendirmek için, AgNOR boyalı her bir preparattan 100 metafaz alanı, doğrudan ışık mikroskobu altında ve yüksek büyütmede (1000X) incelenmiştir. AgNOR boyama ile boyanmış her bir metafaz alanında, gümüşle boyalı (Ag+) metafaz akrosentrik kromozom sayıları (aktif NOR taşıyan, AgNOR(+) kromozom sayıları) kaydedilerek, FHE konsantrasyonuna göre her iki grubun T-lenfositlerindeki metafaz NOR aktivitelerinin değişimi değerlendirilmiştir.

### 3.2.6.2. Bilgisayarla İnterfaz NOR'larının Ölçüm İşlemleri

FHE konsantrasyonuna göre her iki grubun T-lenfositlerindeki interfaz NOR aktivitelerininin değişimini değerlendirmek için, AgNOR boyalı her bir preparattan 50 interfaz alanı, gümüşle boyalı lenfosit interfaz çekirdekçığının lenfosit çekirdeğine oranı ( $NOR \text{ alanı} / \text{Toplam çekirdek alanı} = NORa / T\check{C}a$ ) şeklinde, bilgisayarda özel olarak hazırlanmış görüntü analizi yöntemi kullanılarak yüzde olarak ölçülmüştür. Bilgisayarda ölçüm işlemleri için aşağıdaki basamaklar sırasıyla takip edilmiştir.

#### Görüntülerin Elde Edilmesi

Analiz işleminde kullanılacak olan lenfosit çekirdeklerinin görüntüleri ışık mikroskobundan (100 x 10 büyütme) bilgisayar ortamına bir video kamera (Sony SSC-M370CE) aracılığı ile aktarılmıştır (Resim 3.1). Kameradan alınan görüntüler, analizi yapılmak üzere bitmap türü resim formatında bilgisayarda saklanmıştır.



**Resim 3.1.** Analiz işleminde kullanılan ışık mikroskobu - video kamera - bilgisayar düzeneği

#### Görüntülerin Standardizasyonu

Görüntülerin analizi için Delphi dilinde yazılan bir bilgisayar programı kullanılmıştır. Analiz işlemine başlamadan önce elde edilen resimlerdeki ışık yoğunluğunun birbirlerinden farklı olduğu göz önünde bulundurularak görüntü yoğunluğunun standardizasyonu için eşitlik 3.1 uygun bir algoritmayla resim üzerindeki bütün noktalara uygulanmıştır.

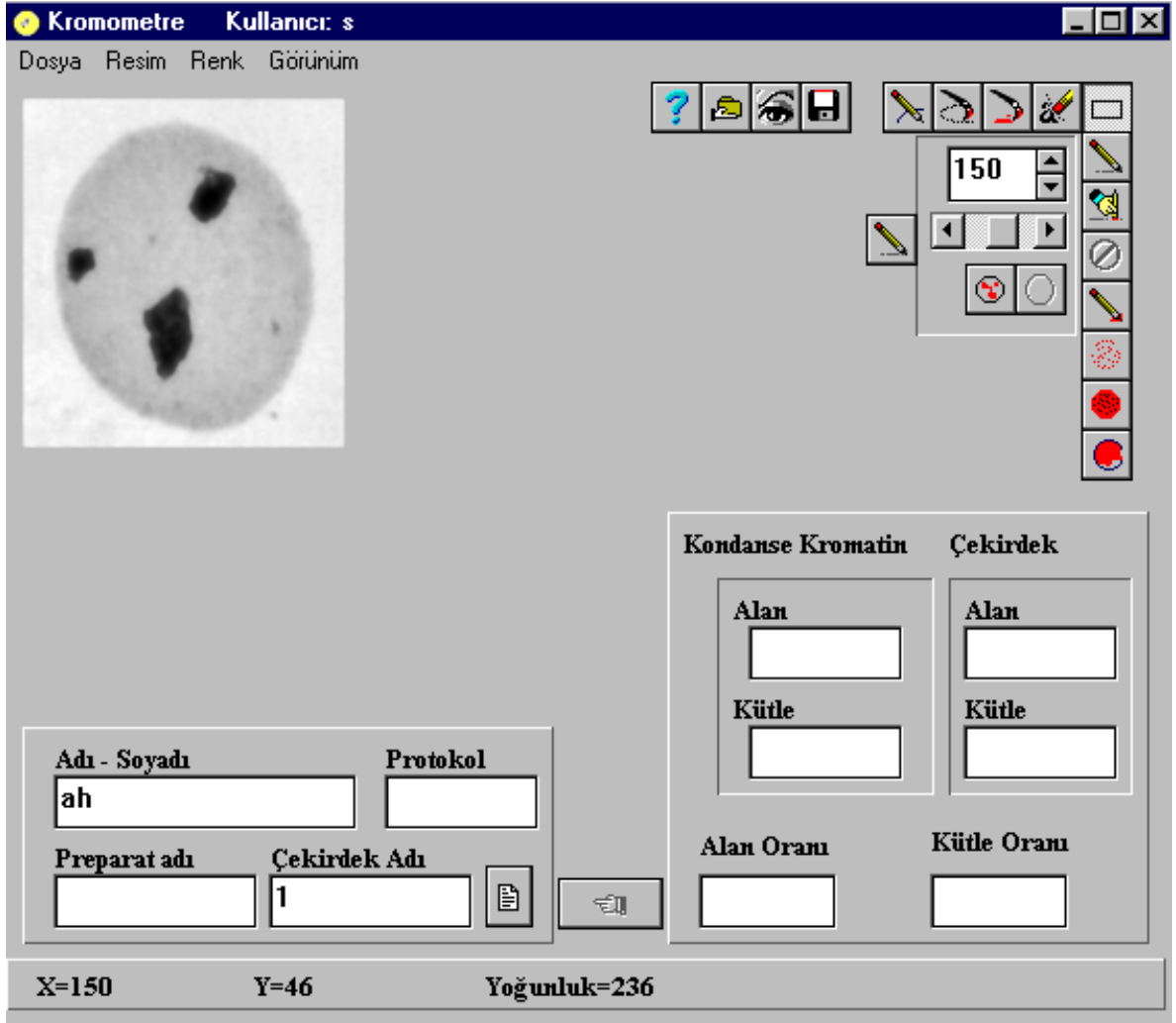
$$P_s = [(P_o - P_{min}) / (P_{max} - P_{min})] \times 255 \quad 3.1$$

Eşitlikte  $P_s$  noktanın standardize edilmiş değerini,  $P_o$  noktanın asıl değerini,  $P_{max}$  resim üzerinde en yüksek parlaklık değerine sahip noktanın değerini,  $P_{min}$  resim üzerinde en düşük parlaklık değerine sahip noktanın değerini göstermektedir.

### **Görüntülerin Analizi**

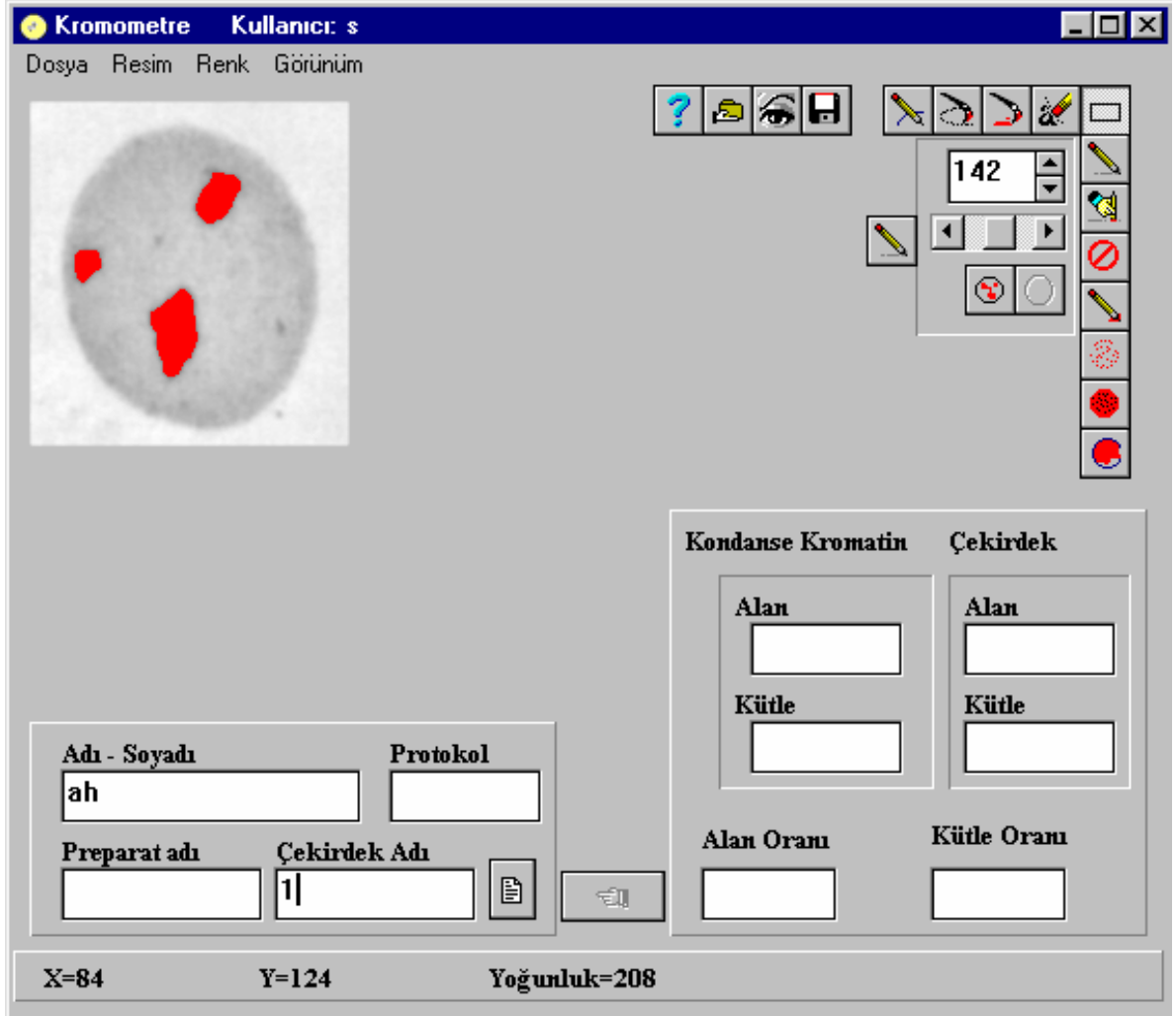
Standardize edilen görüntüler aynı programla analiz edilmişlerdir. Analiz işleminde kullanılan programın görüntüsü Resim 3.2'de görülmektedir.

**a) NOR Bölgelerinin Belirlenmesi** : Analiz programı yardımıyla NOR içeren bölgelerin seçimi için programa bir eşik değer girilerek bu eşik şiddetine uygun bir şekilde çevresindeki noktalardan daha yoğun olarak ayrılan noktaların belirlenmesi sağlanmıştır. Bu yolla seçilen bölgeler dışında NOR bölgesi olduğu düşünülen bölgeler ise programdaki çeşitli araçlar sayesinde seçime dahil edilmiş veya fazla seçilmiş olan bölgeler seçimin dışında bırakılmıştır. NOR bölgelerinin belirlenmesinde bilgisayar programı yol gösterici olarak kabul edilip analiz yapan kişinin kararları esas alınmıştır. Resim 3.3, NOR bölgeleri belirlenmiş bir lenfosit çekirdeğini göstermektedir. Daha sonra belirlenen bu NOR bölgeleri hesaplanarak, çekirdek alanının belirlenmesine geçilmiştir. Resim 3.4 NOR bölgeleri hesaplanmış bir lenfosit çekirdeğini göstermektedir.

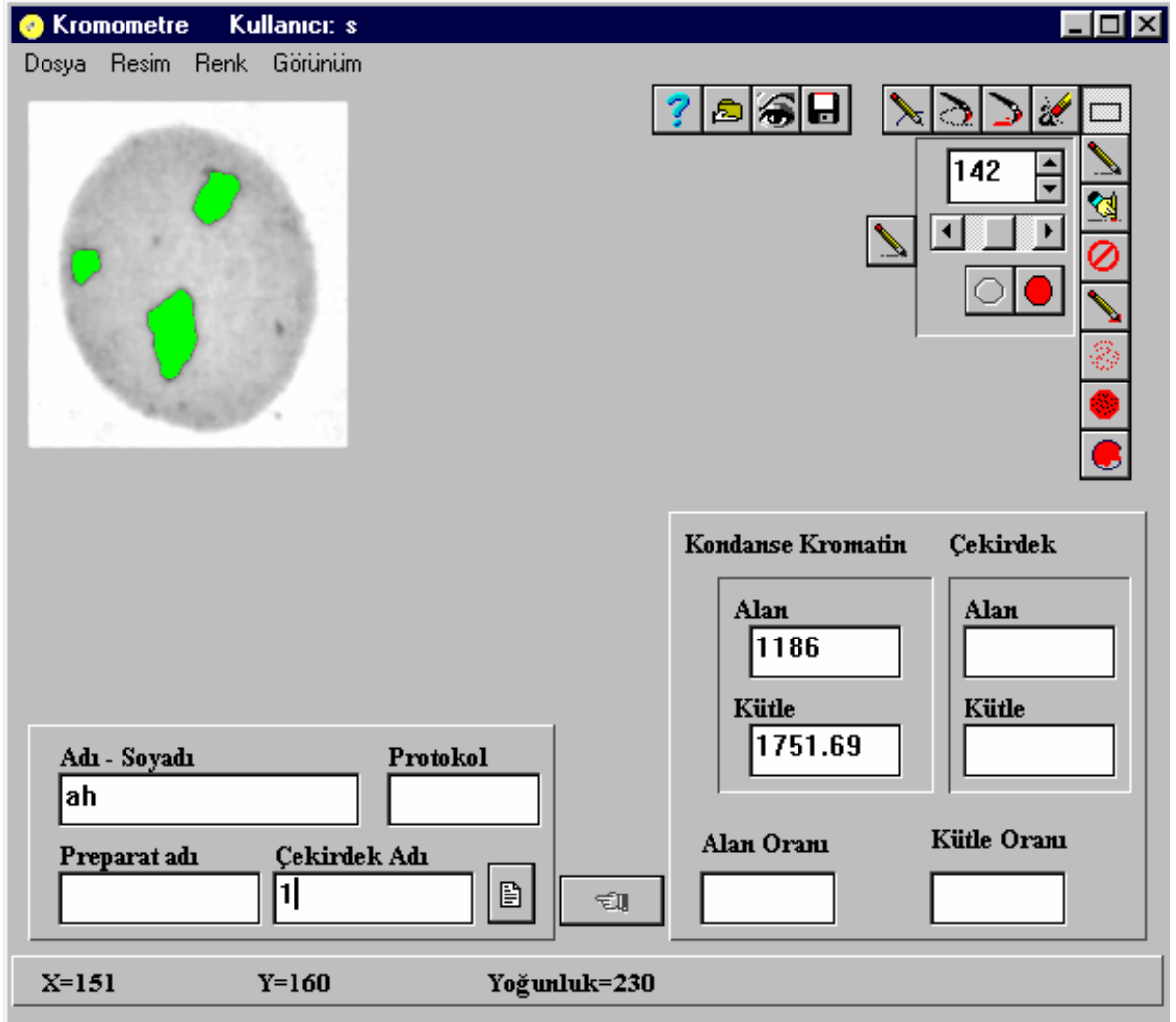


**Resim 3.2.** Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek olan lenfosit çekirdeği



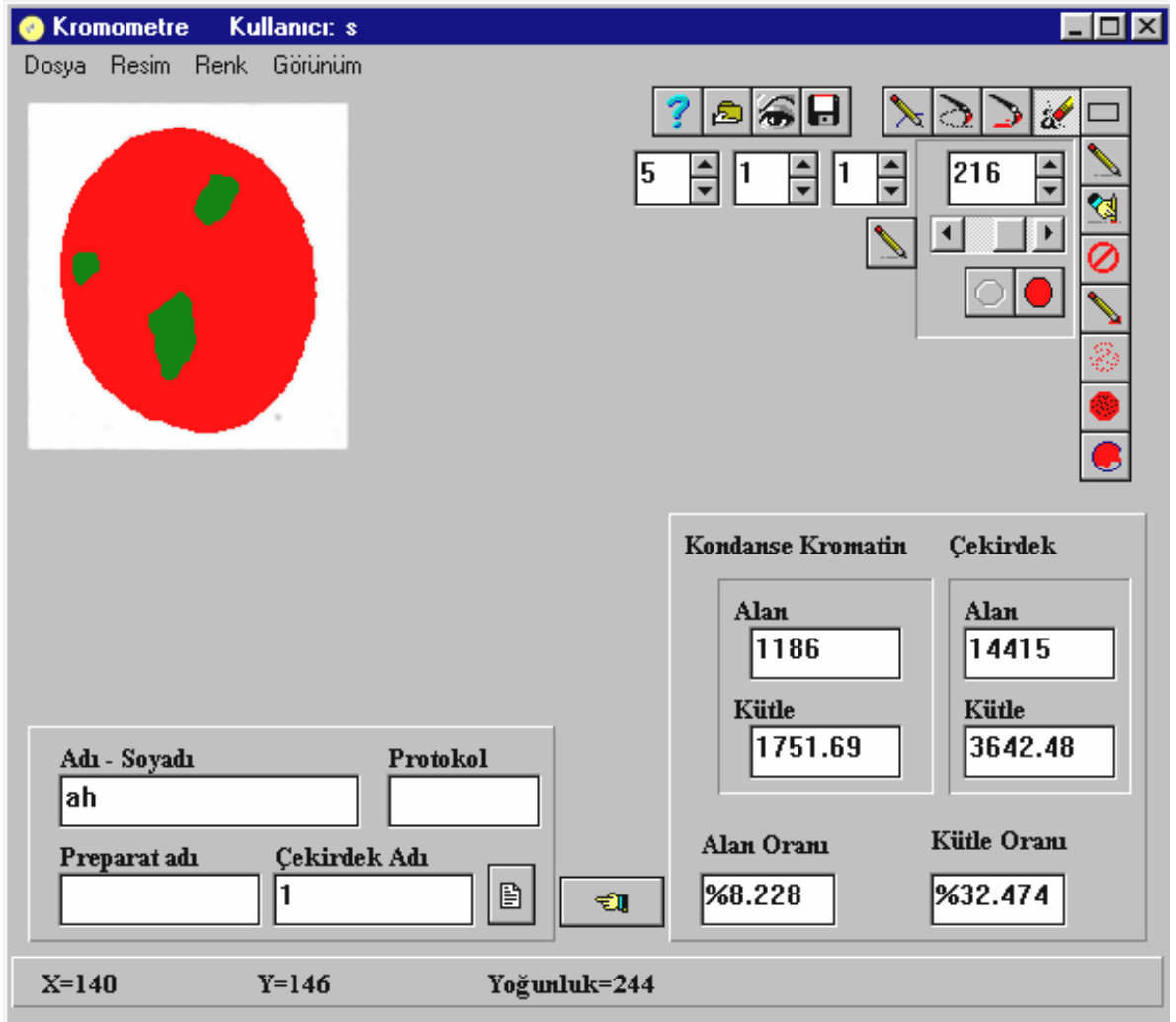


**Resim 3.3.** NOR bölgeleri belirlenmiş lenfosit çekirdeği



**Resim 3.4.** NOR bölgeleri hesaplanmış lenfosit çekirdeği

**b) Çekirdek Alanının Belirlenmesi** : Çekirdek alanının belirlenmesi için de NOR bölgesinin belirlenmesine benzer bir yol izlenerek verilen eşik değere göre bilgisayarın çekirdek bölgesini seçmesi istenmiştir. Özellikle sitoplazma gölgesi bulunduran bazı görüntülerde çekirdeğin ayırt edilmesi oldukça güç olduğundan bu tür görüntülerde çekirdeğin sınırları elle çizilip programın belirlenen alanı çekirdek bölgesi olarak görmesi sağlanmıştır. Resim 3.5 çekirdek ve NOR bölgeleri belirlenmiş bir lenfosit çekirdeğini göstermektedir.



**Resim 3.5.** Çekirdek ve NOR bölgeleri belirlenmiş lenfosit çekirdeği

**c) Parametrelerin Hesaplanması** : Çalışmamızda bu ölçümlerin parametresi olarak, NOR yüzey alanının bütün çekirdek yüzey alanına

oranı kullanılmıştır. Bu parametrenin hesaplanması için kullandığımız bilgisayar programı sayesinde öncelikle NOR bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı ve çekirdek bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı hesaplanarak, içerisinde NOR bölgesinin de dahil olduğu çekirdek alanına göre NOR alanının yüzde oranı hesaplanmıştır.

Ölçümü yapılan hücrelerin büyüklükleri çalışmamızda önemli bir role sahip olduğu için bütün hücrelerin büyüklükleri de  $\mu\text{m}$  olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplama için yapılan kalibrasyon işleminde 100 hücrenin çapları mikrometre sayesinde ölçülüp bu hücrelerin bilgisayardaki görüntülerinin yatay ve düşey eksenindeki nokta sayısı göz önünde bulundurularak  $1\mu\text{m}^2$  büyüklüğündeki alan için 56.53 değerinde bir kalibrasyon katsayısı hesaplanarak çekirdek alanları  $\mu\text{m}^2$  türünden ifade edilmiştir. Elde edilen alan değerinden bu alana sahip olan dairenin çapı  $\mu\text{m}$  türünden hesaplanmıştır. Hesaplanan bu çap değerleri mikrometre ile yapılan ölçümlerle karşılaştırılarak ölçülen değerlere oldukça yakın değerlerde bulunduğu tespit edilmiştir.

### **3.2.7. FHE Konsantrasyonuna Göre Mitotik İndeks Değişiminin Değerlendirilmesi**

FHE konsantrasyonunun mitotik indekse (Mİ) etkisini incelemek üzere 4 farklı kültür ortamı hazırlandı. Buna göre FHE'nin 4 farklı kültür ortamındaki %'si hacim/hacim olarak sırasıyla; 0.37, 0.75, 1.48 ve 2.21 şeklindedir. Yaşları 0 – 8 yıl arasında değişen 30 DS'lu ile aynı yaş grubundan 24 kontrolün her birinin kanları bu farklı FHE konsantrasyonundaki ortamlara ekildiler. 70. saatte başlayan rutin işlemlerden sonra her bireyin farklı ortamlardaki Mİ'leri, ışık mikroskobu altında her konsantrasyondan (preparattan) yaklaşık 5000-6000 hücre sayılarak % olarak belirlendi. Böylece her iki grubun da FHE konsantrasyonuna göre Mİ'leri bulunmuştur.

### **3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM**

Ortamdaki FHE konsantrasyonuna göre interfazdaki NOR alan oranı ortalaması ve metafazdaki AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamasının DS lu ve sağlıklı bireylerdeki istatistiksel karşılaştırılması, ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır. Kültür ortamındaki FHE konsantrasyonu ile hem interfazlarındaki NOR alan oranı hem de metafazlarındaki AgNOR(+) kromozom sayısı arasındaki bağlantının derecesini bulmak için ise aynı programdaki lineer regresyon analiz yöntemi kullanıldı. FHE konsantrasyonunun mitotik indekse etkisini belirlemek için, hem DS'lu hem de kontrol gruplarında genel ortalamalar alınmış ve sonuçlar Student t-testi karşılaştırılmıştır.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. FİTOHEMAGLUTİNİN (FHE) KONSANTRASYONU İLE NOR AKTİVİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

#### **4.1.1. DS'lu ve Sağlıklı Bireylerin FHE Konsantrasyonuna Göre Metafaz NOR Aktivitelerinin Karşılaştırılması**

DS'lu ve sağlıklı bireylerin T-lenfositlerinde FHE konsantrasyonuna göre metafaz NOR aktivitelerinin değişimini değerlendirmek için, her birey için 100 AgNOR boyalı metafaz alanı, doğrudan ışık mikroskobu altında ve yüksek büyütmede (1000X) incelenmiş ve bireysel AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de karşılıklı olarak verilmiştir. Tablo 4.3'de ise her iki grubun FHE konsantrasyonuna göre genel AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları verilmiştir. AgNOR boyası ile boyanan akrosentrik kromozomlar AgNOR(+), boyanmayanlar da AgNOR(-) olarak ifade edilmişlerdir.

**Tablo 4.1.** Her bir Down sendromlu hastanın FHE konsantrasyonuna göre ardışık 100 metafaz alanında bulunmuş AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları (K:Kız, E:Erkek). En alt satırda da genel ortalamalar gösterilmiştir.

Hasta	Yaş	Cins	AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları (ml FHE/100 ml'lik ortam)			
			0.37 ml (%) (X ± SS)	0.75 ml (%) (X ± SS)	1.48 ml (%) (X ± SS)	2.21 ml (%) (X ± SS)
1) KT	8 ay	E	8.88±1.19	9.07±0.91	9.89±1.00	10.14±0.78
2) UA	2 ay	E	8.14±0.82	8.16±0.87	9.16±0.91	9.75±0.82
3) TB	13 gün	K	7.32±0.78	7.92±0.80	8.78±0.81	8.43±0.82
4) BK	1 ay	K	10.01±0.85	10.33±0.73	10.48±0.64	10.45±0.66
5) İK	1 ay	E	8.46±0.89	8.59±1.01	9.18±1.00	9.56±0.73
6) MK	5.5 ay	E	8.55±0.87	8.92±0.92	9.17±0.71	9.42±0.59
7) İÜ	1 ay	E	7.64±0.98	8.11±0.86	8.74±0.94	8.99±0.97
8) KB	0-15 gün	K	8.83±0.88	9.22±0.73	9.19±0.79	9.41±0.73
9) AS	~1 yıl	K	8.59±0.89	8.77±0.93	9.21±0.74	9.42±0.68
10) SD	~1 yıl	K	8.16±0.86	8.35±0.85	8.96±0.75	9.15±0.67
11) LT	2 ay	K	8.15±0.87	8.50±0.81	8.91±0.68	9.20±0.67
12) DB	Premat.	K	9.11±0.89	9.25±0.86	9.63±0.81	9.73±0.84
13) SÇ	1 yıl	K	9.90±0.89	9.86±0.88	10.27±0.69	10.43±0.61
14) KT	1 yıl	K	8.71±0.97	9.09±0.82	9.38±0.71	9.58±0.70
15) SE	6 ay	E	8.94±1.05	9.20±0.97	9.81±0.86	9.85±0.83
16) LG	6 ay	K	9.28±0.83	9.43±0.80	9.74±0.68	9.86±0.68
17) AL	55 gün	E	8.21±0.73	8.17±0.73	8.73±0.62	8.98±0.55
18) FP	8 yıl	E	7.22±0.80	7.58±0.76	8.37±0.69	8.56±0.66
19) KK	3 yıl	K	8.37±0.91	8.46±0.86	9.13±0.79	9.37±0.60
20) EP	18 gün	E	8.55±0.98	8.77±1.06	9.58±0.96	9.76±0.97

**Tablo 4.1'in devamı**

<b>21) EB</b>	0-15 gün	E	8.80±1.21	9.11±1.11	9.81±0.94	9.81±0.98
<b>22) FE</b>	13 ay	E	9.14±0.84	9.24±0.79	9.56±0.72	9.72±0.65
<b>23) FK</b>	4 ay	K	8.15±0.96	8.36±0.89	9.00±0.75	9.15±0.72
<b>24) BE</b>	6 ay	K	7.57±0.80	8.01±0.89	8.72±0.88	8.95±0.81
<b>25) BN</b>	1.5 yıl	K	7.32±0.78	7.43±0.92	8.19±0.87	8.46±0.83
<b>26) YD</b>	9 ay	E	7.11±0.78	7.22±0.84	7.88±0.77	8.31±0.68
<b>27) AT</b>	3 ay	E	7.23±0.76	7.31±0.92	8.06±0.85	8.25±0.70
<b>28) MB</b>	3.5 ay	E	7.05±0.76	7.31±0.87	7.97±0.69	8.21±0.74
<b>29) SN</b>	10 ay	K	8.42±0.87	8.86±0.73	9.36±0.60	9.45±0.61
<b>30) MS</b>	9 ay	E	7.85±0.95	8.78±0.97	9.15±0.82	9.28±0.73
<b>Genel ortalamalar</b>			<b>8.32±1.18</b>	<b>8.58±1.15</b>	<b>9.13±1.02</b>	<b>9.32±0.95</b>

Tablo 4.1'in sonunda bulunan genel ortalamalar, DS'lu hastalarda AgNOR(+) kromozom ortalamalarının kültür ortamındaki FHE konsantrasyonu ile birlikte arttığını göstermektedir. 0.37 ml FHE/100 ml' lik ortamda 8.32±1.18 iken, 2.21 ml FHE/100 ml'lik ortamda 9.32±0.95 [ortalama ± Standart sapma (X±SS)] olarak bulunmuştur. Bu artış az ya da çok tüm bireylerde de görülmektedir. DSlu'larda FHE konsantrasyonuna göre en az AgNOR(+) kromozom artış ortalaması, 0.44 kromozom ile BK (4)'de, en çok ortalama artış da 1.61 kromozom ile UA (2)'da görülmektedir. En az FHE konsantrasyonundan (% 0.37) en çok FHE konsantrasyonuna (% 2.21) genel ortalama artış ise ~1 kromozom kadardır. FHE konsantrasyonu ile AgNOR+ kromozom sayısı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.000).

**Tablo 4.2.** Her bir sağlıklı kontrolün FHE konsantrasyonuna göre ardışık 100 metafaz alanında bulunmuş AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları (K:Kız, E:Erkek). En alt satırda da genel ortalamalar verilmiştir.



Hasta	Yaş	Cins	AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları (ml FHE/100 ml'lik ortam)			
			0.37 ml (%) (X ± SS)	0.75 ml (%) (X ± SS)	1.48 ml (%) (X ± SS)	2.21 ml (%) (X ± SS)
1) KB	~1 ay	K	7.90±0.44	7.95±0.41	7.98±0.13	8.04±0.32
2) İH	2 yıl	K	6.96±0.53	6.88±0.71	6.92±0.37	7.01±0.30
3) ÖZ	14 gün	K	7.44±0.62	7.69±0.53	7.88±0.36	7.61±0.57
4) BT	6 ay	K	8.35±0.91	8.27±0.97	8.29±0.92	8.42±0.95
5) Yİ	12 gün	E	7.73±0.51	7.77±0.58	7.76±0.55	7.84±0.54
6) BC	5 ay	K	7.86±0.88	7.79±0.87	7.81±0.75	7.98±0.84
7) AH	10 ay	E	8.12±0.62	8.17±0.62	8.26±0.63	8.30±0.61
8) SB	1 ay	K	7.64±0.48	7.61±0.49	7.65±0.48	7.62±0.49
9) CÖ	~1ay	K	8.03±0.75	8.13±0.77	8.19±0.71	8.20±0.75
10) AG	~1 ay	K	9.11±0.72	9.10±0.79	9.19±0.77	9.22±0.75
11) AB	3 ay	E	8.25±0.64	8.16±0.66	8.19±0.66	8.24±0.64
12) TC	10 gün	K	9.43±0.61	9.36±0.66	9.40±0.60	9.48±0.63
13) FZ	14 ay	E	8.08±0.80	8.26±0.71	8.27±0.72	8.31±0.74
14) İM	2 yıl	E	8.39±0.62	8.46±0.63	8.43±0.66	8.49±0.64
15) HK	1.5 ay	K	9.20±0.73	9.26±0.73	9.31±0.80	9.35±0.73
16) YA	8 yıl	K	7.24±0.43	7.22±0.42	7.29±0.46	7.32±0.47
17) MU	8 yıl	E	8.13±0.73	8.19±0.83	8.12±0.84	8.24±0.93
18) FG	1 yıl	E	9.33±0.67	9.30±0.73	9.27±0.74	9.31±0.79
19) MR	5 ay	K	8.40±0.49	8.43±0.50	8.51±0.50	8.46±0.50
20) HÜ	3 yıl	K	8.16±0.56	8.13±0.58	8.12±0.64	8.17±0.65
21) RÇ	1.5 ay	E	8.05±0.72	8.03±0.70	7.88±0.72	8.10±0.76
22) SC	5 yıl	E	8.84±0.68	8.77±0.68	8.91±0.68	8.93±0.70
23) SM	9 ay	E	7.63±0.54	7.67±0.53	7.76±0.62	7.72±0.62
24) FN	7 yıl	K	8.21±0.41	8.24±0.43	8.21±0.41	8.27±0.45
<b>Genel ortalamalar</b>			<b>8.19±0.89</b>	<b>8.20±0.90</b>	<b>8.24±0.89</b>	<b>8.28±0.90</b>

Tablo 4.2'in sonunda bulunan genel ortalamalar, kontrol grubundaki bireylerin AgNOR(+) kromozom ortalamalarının kültür ortamındaki FHE

konsantrasyonu ile birlikte önemli ölçüde artmadığını göstermektedir. 0.37 ml FHE/100 ml'lik ortamda  $8.19 \pm 0.89$  iken, 2.21 ml FHE/100 ml'lik ortamda  $8.28 \pm 0.90$ , ( $X \pm SS$ ) olarak bulunmuştur. Kontrol grubundaki bireylerin ortamdaki FHE konsantrasyonuna göre AgNOR(+) kromozom ortalamalarındaki en büyük sapma,  $\sim 0.23$  ortalama ile FZ (13)'de görülmektedir. En düşük sapma ise 0.01 kromozom ortalaması ile AB (11) ve HÜ (20)'de görülmektedir. Ancak, FHE'nin en düşük konsantrasyonu ile en yüksek konsantrasyonu arasında AgNOR(+) kromozom sayısı açısından istatistiksel bir fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4.3.** DS'lu ve sağlıklı kontrollerinin her bir FHE konsantrasyonuna göre genel metafaz AgNOR(+) kromozom sayısı ortalamaları (ml FHE/100 ml'lik ortam'da).

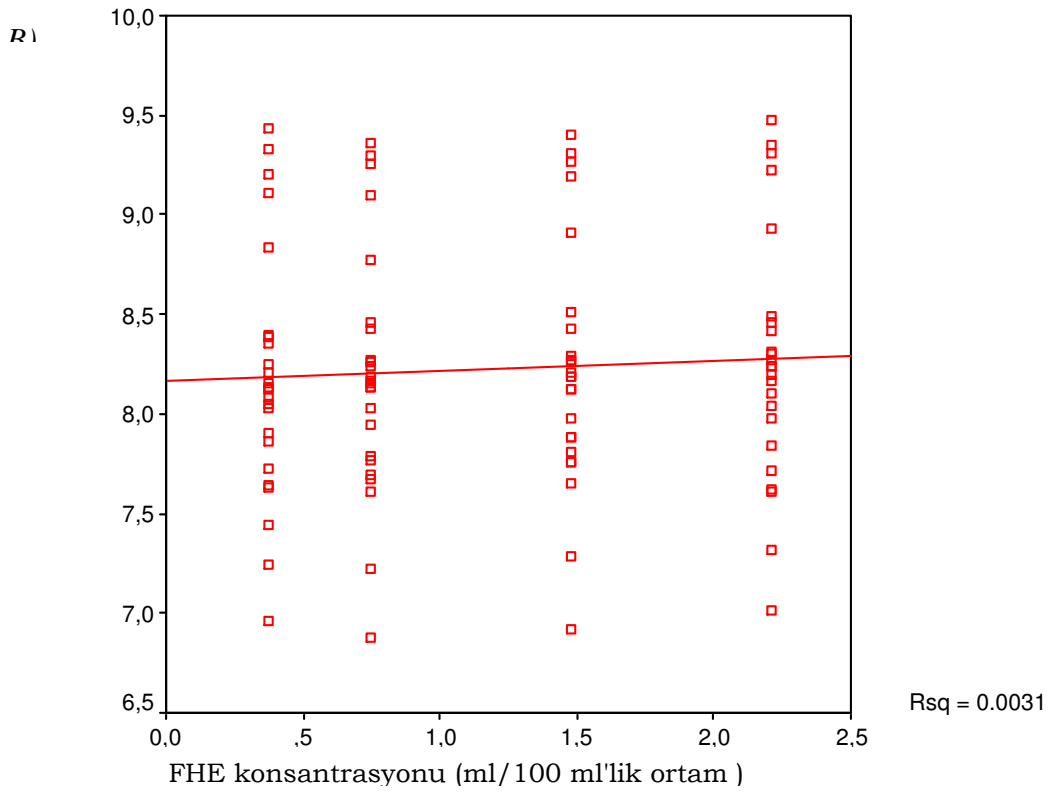
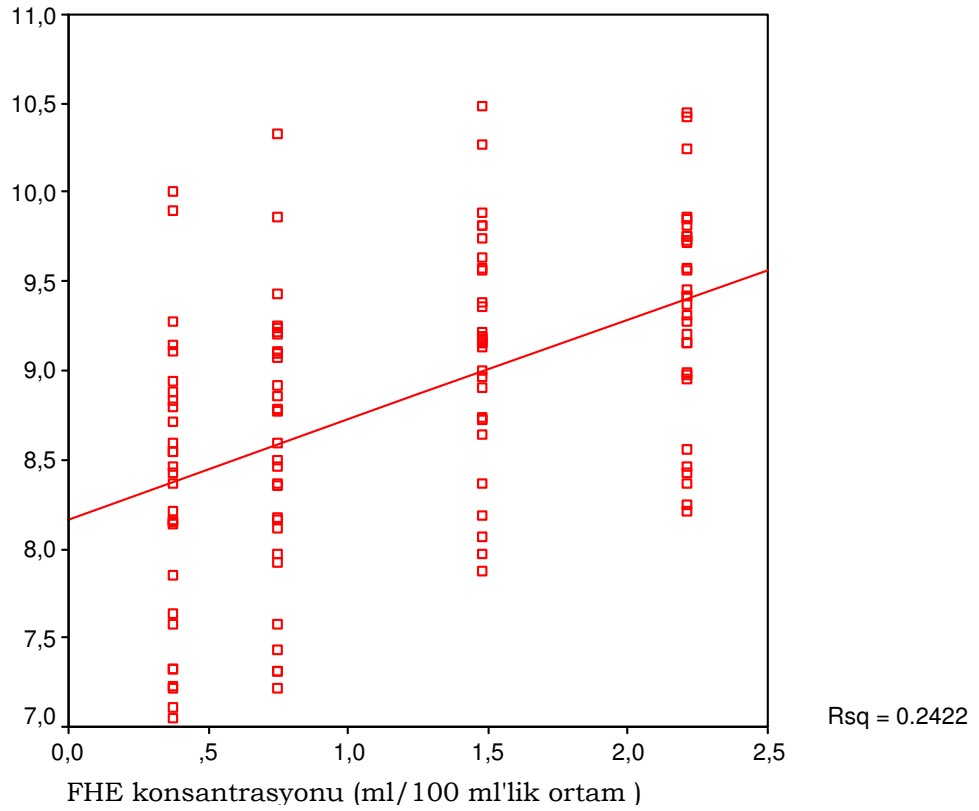
Grup	N	n	0.37 ml FHE (%) ( $X \pm SS$ )	0.75 ml FHE (%) ( $X \pm SS$ )	1.48 ml FHE (%) ( $X \pm SS$ )	2.21 ml FHE (%) ( $X \pm SS$ )
DS	30	3000	$8.32 \pm 1.18$	$8.58 \pm 1.15$	$9.13 \pm 1.02$	$9.32 \pm 0.95$
Kontrol	24	2400	$8.19 \pm 0.89$	$8.20 \pm 0.90$	$8.24 \pm 0.89$	$8.28 \pm 0.90$

N: Birey sayısı,

n: Değerlendirilen toplam metafaz sayısı

DS'lularda ortamdaki FHE konsantrasyonuna göre metafaz AgNOR(+) kromozom sayısı arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafiği Şekil 4.1A'da verilmiştir ( $r^2 = 0.2422$ ,  $p < 0.01$ ). Bu da FHE konsantrasyonu ile AgNOR(+) kromozom sayısı arasında anlamlı ve pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Kontrol grubundaki bireylerde ortamdaki FHE konsantrasyonuna göre metafaz AgNOR(+) kromozom sayısı arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafiği Şekil 4.1B'de verilmiştir ( $r^2 = 0.0031$ ,  $p > 0.05$ ). Bu da iki değişken (FHE ve AgNOR(+) kromozom sayısı) arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını göstermektedir.

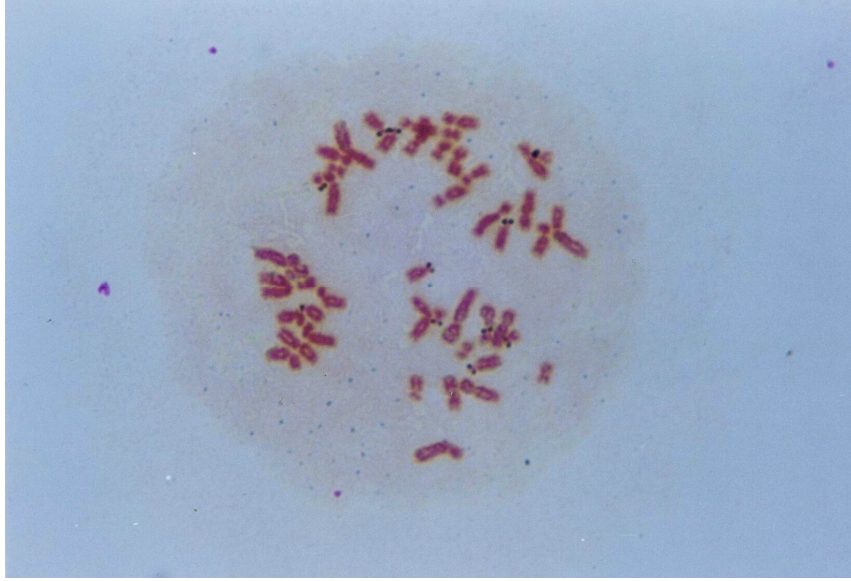


**Şekil 4.1.** Kültür ortamındaki FHE konsantrasyonu ile metafazda bulunan AgNOR(+) kromozom sayısı arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafikleri.

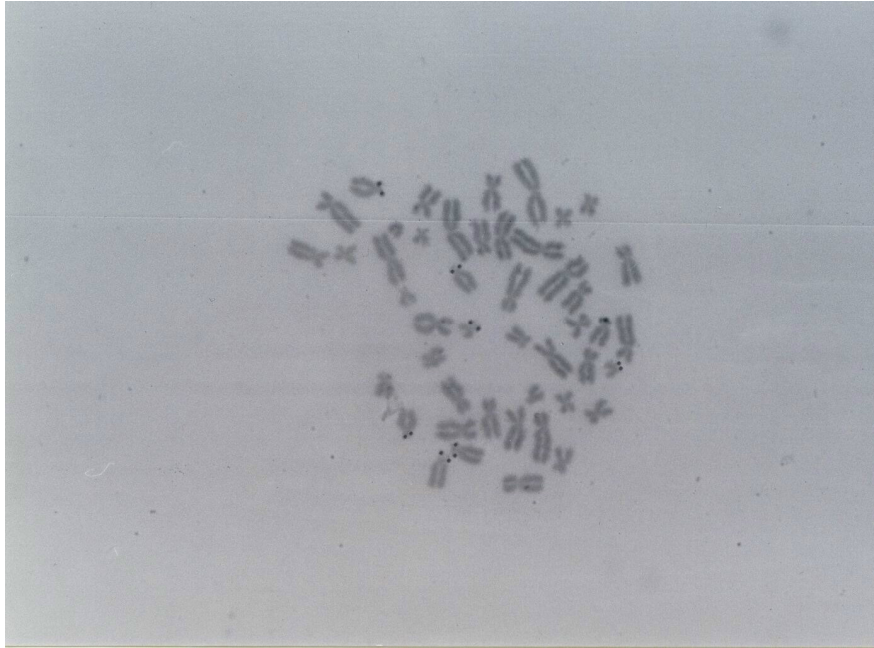
**A)** Serbest trizomi 21'li DS'li hastalar (N=30)

**B)** Kontrol (N=24)

DS'lu bir bireye ait % 2.21 FHE konsantrasyonunda  $\text{AgNO}_3$  ile boyandığında 11 aktif NOR taşıyan (AgNOR+) akrosentrik kromozomlar Resim 4.1'de, sağlıklı bir bireye ait yine % 2.21 FHE konsantrasyonunda  $\text{AgNO}_3$ 'le boyandığında ortalama olarak görülebilen 8 aktif NOR taşıyan (AgNOR+) akrosentrik kromozomlar ise Resim 4.2'de gösterilmiştir.



**Resim 4.1.** Down sendromlu bir bireye ait  $\text{AgNO}_3$  ile boyanmış akrosentrik kromozomlar (Boyanmış NOR sayısı= 11)



**Resim 4.2.** Sağlıklı bir bireye ait  $\text{AgNO}_3$  ile boyanmış akrosentrik kromozomlar (Boyanmış NOR sayısı= 8)

#### 4.1.2. DS'lu ve Sağlıklı Bireylerin FHE Konsantrasyonuna Göre İnterfaz NOR Aktivitelerinin Karşılaştırılması

DS'lu ve sağlıklı bireylerin T-lenfositlerinde FHE konsantrasyonuna göre interfaz NOR aktivitelerinin değişimini değerlendirmek için, AgNOR boyalı her bir preparattan 50 interfaz alanı, bilgisayarda özel olarak hazırlanmış görüntü analizi yöntemi kullanılarak NORa/TÇa oranı şeklinde yüzde olarak ölçülmüştür. Bireysel NORa/TÇa ortalamaları her iki grupta karşılıklı olarak Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'de verilmiştir. Tablo 4.6'da ise her iki grubun FHE konsantrasyonuna göre genel NORa/TÇa oranı ortalamaları verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Her bir Down sendromlu hastanın FHE konsantrasyonuna göre 50 interfaz alanında ölçülmüş NORa/TÇa oranı ortalamaları (K:Kız, E:Erkek). En alt satırda da genel ortalamalar,  $X \pm SS$  olarak gösterilmiştir.

Hasta	Yaş	Cins	NORa/TÇa ortalamaları (ml FHE / 100 ml' lik ortam)			
			0.37 ml (%) ( $X \pm SS$ )	0.75 ml (%) ( $X \pm SS$ )	1.48 ml (%) ( $X \pm SS$ )	2.21 ml (%) ( $X \pm SS$ )
1) KT	8 ay	E	9.78±1.76	10.50±2.21	12.16±2.39	13.48±2.16
2) UA	2 ay	E	9.28±1.69	10.93±1.70	12.61±2.21	13.75±2.13
3) TB	13 gün	K	10.29±1.60	12.69±1.86	13.88±1.65	14.30±1.91
4) BK	1 ay	K	9.64±1.64	12.20±2.20	13.44±2.05	13.93±1.88
5) İK	1 ay	E	10.69±2.42	12.00±2.29	14.36±2.02	14.35±2.40
6) MK	5.5 ay	E	10.16±1.66	12.30±2.30	13.10±1.91	13.32±2.25
7) İÜ	1 ay	E	9.76±1.48	10.38±1.53	11.73±1.93	11.84±2.23
8) KB	0-15 gün	K	9.52±1.64	10.58±1.66	11.36±2.31	11.41±2.58
9) AS	~1 yıl	K	10.41±1.42	12.19±1.96	14.42±1.87	14.21±2.21
10) SD	~1 yıl	K	10.97±1.79	12.63±1.77	14.04±1.55	13.87±1.96
11) LT	2 ay	K	11.32±1.21	12.70±1.73	14.91±1.97	15.40±2.11
12) DB	Premat.	K	10.85±1.42	12.13±1.41	13.93±1.36	13.87±1.91
13) SÇ	1 yıl	K	10.67±1.60	11.54±1.56	12.71±1.79	13.33±1.78
14) KT	1 yıl	K	11.11±1.78	12.24±1.68	13.08±1.86	12.76±1.60

**Tablo 4.4.** ün devamı

<b>15) SE</b>	6 ay	E	10.49±1.41	12.18±2.09	13.49±1.76	13.60±1.51
<b>16) LG</b>	6 ay	K	10.32±1.34	11.46±1.52	12.83±1.33	12.98±1.44
<b>17) AL</b>	55 gün	E	10.62±1.45	11.21±1.76	12.78±1.69	13.64±1.64
<b>18) FP</b>	8 yıl	E	9.48±1.50	10.50±1.70	12.04±1.65	12.58±1.66
<b>19) KK</b>	3 yıl	K	10.64±1.43	11.35±1.53	13.13±1.86	12.89±1.79
<b>20) EP</b>	18 gün	E	10.16±1.26	10.77±1.51	12.30±1.79	12.85±1.58
<b>21) EB</b>	0-15 gün	E	9.61±1.25	10.49±1.66	12.56±1.71	12.11±1.48
<b>22) FE</b>	13 ay	E	10.41±1.82	11.48±1.94	13.33±2.12	14.07±1.72
<b>23) FK</b>	4 ay	K	10.78±1.75	11.55±1.71	13.41±1.72	12.56±2.18
<b>24) BE</b>	6 ay	K	11.02±2.16	12.05±1.61	13.13±2.15	13.08±1.91
<b>25) BN</b>	1.5 yıl	K	11.17±1.72	11.93±1.79	14.22±1.53	14.38±1.77
<b>26) YD</b>	9 ay	E	10.28±1.63	11.94±1.69	13.63±1.85	13.64±1.96
<b>27) AT</b>	3 ay	E	10.37±1.34	12.91±1.64	13.39±1.49	13.93±1.98
<b>28) MB</b>	3.5 ay	E	11.34±1.77	12.60±1.87	14.17±2.19	13.86±1.77
<b>29) SN</b>	10 ay	K	11.20±1.80	12.63±1.59	13.46±1.97	13.60±2.02
<b>30) MS</b>	9 ay	E	10.85±1.69	12.20±1.74	13.77±2.03	13.38±1.70
<b>Genel ortalamalar</b>			<b>10.44±1.72</b>	<b>11.74±1.93</b>	<b>13.25±2.03</b>	<b>13.43±2.08</b>

Tablo 4.4'ün sonunda DS'lu bireylerde bulunan genel ortalamalar, NORa/TÇa oranı ortalamalarının kültür ortamındaki FHE konsantrasyonu ile birlikte arttığını göstermektedir. 0.37 ml FHE/100 ml' lik ortamda 10.44±1.72 iken, 2.21 ml FHE/100 ml'lik ortamda 13.43±2.08, (X±SS) olarak bulunmuştur. Bu artış az ya da çok tüm bireylerde de görülmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda DS'lu bireylerde, FHE konsantrasyonu ile NORa/TÇa oranı arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur (p=0.000).

**Tablo 4.5.** Her bir sağlıklı kontrolün FHE konsantrasyonuna göre 50 interfaz alanında yüzde olarak ölçülmüş NORa/TÇa oranı ortalamaları (K:Kız, E:Erkek). En alt satırda da genel ortalamalar  $X \pm SS$  olarak gösterilmiştir.

Hasta	Yaş	Cins	NORa/TÇa ortalamaları (ml FHE / 100 ml' lik ortam)			
			0.37 ml (%) ( $X \pm SS$ )	0.75 ml (%) ( $X \pm SS$ )	1.48 ml (%) ( $X \pm SS$ )	2.21 ml (%) ( $X \pm SS$ )
1) KB	~1 ay	K	10.54±2.04	11.39±1.86	11.37±2.15	11.17±1.93
2) İH	2 yıl	K	10.98±2.10	10.60±1.84	10.83±1.69	10.61±1.92
3) ÖZ	14 gün	K	10.60±1.83	10.82±1.89	10.36±1.79	10.76±2.06
4) BT	6 ay	K	10.90±2.05	11.06±1.72	11.15±1.74	11.19±1.66
5) Yİ	12 gün	E	10.36±1.95	10.00±1.57	10.39±1.73	10.07±1.76
6) BC	5 ay	K	10.13±1.73	10.50±1.79	10.38±1.88	10.46±1.86
7) AH	10 ay	E	9.42±1.80	9.94±1.79	9.77±1.97	9.54±1.74
8) SB	1 ay	K	10.66±1.56	10.49±1.63	10.30±2.17	10.28±2.21
9) CÖ	~1ay	K	9.69±1.92	9.78±1.71	9.97±1.46	10.10±1.50
10) AG	~1 ay	K	10.30±1.46	10.27±1.54	10.10±1.76	10.59±1.54
11) AB	3 ay	E	9.71±1.82	10.01±1.63	9.81±1.72	9.93±1.81
12) TC	10 gün	K	10.52±1.66	10.31±1.26	10.57±2.04	10.66±1.50
13) FZ	14 ay	E	9.07±1.70	9.70±1.65	9.65±1.51	9.67±1.56
14) İM	2 yıl	E	9.64±1.43	9.78±1.27	9.83±1.24	9.46±1.69
15) HK	1.5 ay	K	10.64±1.57	10.39±1.79	10.50±1.88	10.59±1.92
16) YA	8 yıl	K	10.16±1.78	10.10±1.68	10.44±1.68	10.66±1.60
17) MU	8 yıl	E	10.68±1.79	10.69±1.93	10.76±2.02	10.94±1.53
18) FG	1 yıl	E	9.01±1.79	9.05±1.49	9.20±1.47	9.32±1.49
19) MR	5 ay	K	9.39±1.72	9.91±1.35	9.89±1.58	9.73±1.40
20) HÜ	3 yıl	K	10.47±1.28	10.49±1.63	10.02±1.58	10.11±1.55
21) RÇ	1.5 ay	E	8.74±1.46	8.55±1.46	8.82±1.46	8.98±1.28
22) SC	5 yıl	E	9.78±1.79	10.27±1.43	10.05±1.35	9.83±1.53
23) SM	9 ay	E	9.70±1.68	9.39±1.65	9.59±1.52	9.84±1.26
24) FN	7 yıl	K	10.39±1.59	10.58±1.46	10.53±1.69	10.73±1.62
<b>Genel ortalamalar</b>			<b>10.06±1.83</b>	<b>10.17±1.73</b>	<b>10.18±1.80</b>	<b>10.22±1.76</b>

Tablo 4.5'in sonunda bulunan genel ortalamalar, kontrol grubundaki bireylerin NORa/TÇa oranı ortalamalarının kültür ortamındaki FHE konsantrasyonu ile birlikte önemli ölçüde artmadığını göstermektedir. 0.37 ml FHE/100 ml' lik ortamda  $10.06 \pm 1.83$  iken, 2.21 ml FHE/100 ml'lik ortamda  $10.22 \pm 1.76$ , ( $X \pm SS$ ) olarak bulunmuştur. FHE'nin en düşük konsantrasyonu ile en yüksek konsantrasyonu arasında NORa/TÇa oranı açısından istatistiksel bir fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4.6.** DS'lu ve sağlıklı kontrollerinin her bir FHE konsantrasyonuna göre genel interfaz NORa/TÇa oranı ortalamaları (ml FHE/100 ml'lik ortam'da).

Grup	N	n	0.37 ml FHE (%) ( $X \pm SS$ )	0.75 ml FHE (%) ( $X \pm SS$ )	1.48 ml FHE (%) ( $X \pm SS$ )	2.21 ml FHE (%) ( $X \pm SS$ )
DS	30	1500	$10.44 \pm 1.72$	$11.74 \pm 1.93$	$13.25 \pm 2.03$	$13.43 \pm 2.08$
Kontrol	24	1200	$10.06 \pm 1.83$	$10.17 \pm 1.73$	$10.18 \pm 1.80$	$10.22 \pm 1.76$

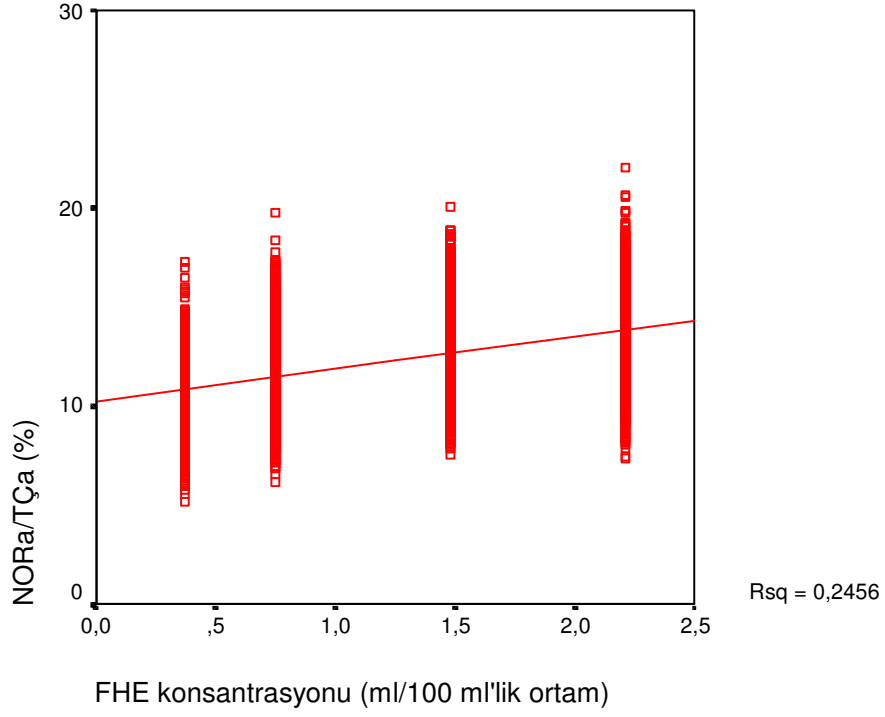
N: Birey sayısı, n: Toplam ölçülen interfaz sayısı

DS'ularda ortamdaki FHE konsantrasyonuna göre interfaz NORa/TÇa oranı arasındaki ilişkiyi gösteren regressiyon grafiği Şekil 4.2A'da verilmiştir ( $r^2 = 0.2456$ ,  $p < 0.01$ ).

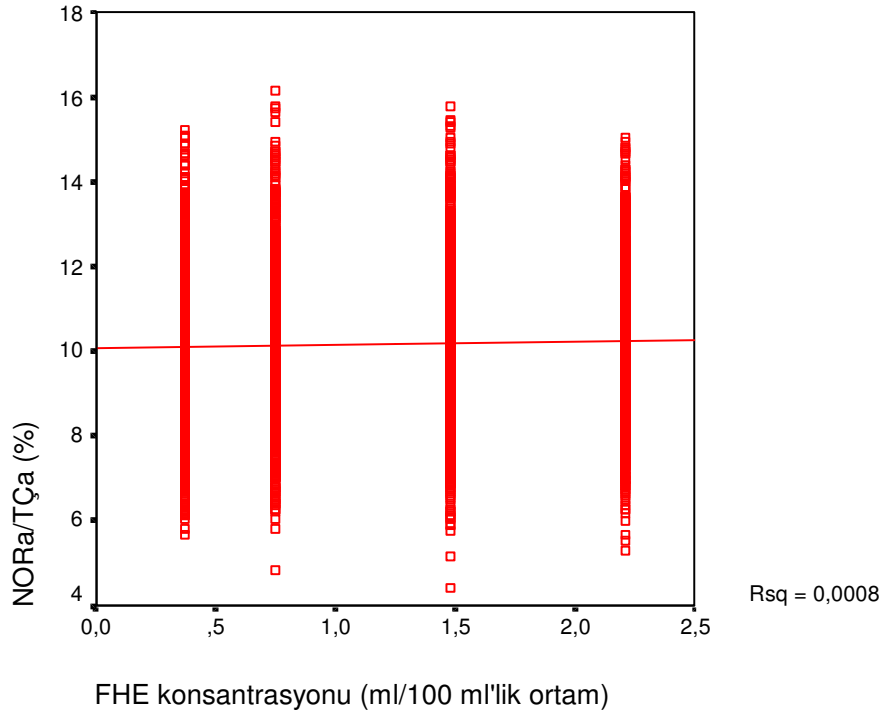
Kontrol grubundaki bireylerde ortamdaki FHE konsantrasyonuna göre interfaz NORa/TÇa oranı arasındaki ilişkiyi gösteren regressiyon grafiği Şekil 4.2B'de verilmiştir ( $r^2 = 0.0008$ ,  $p > 0.05$ ).



A)



B)

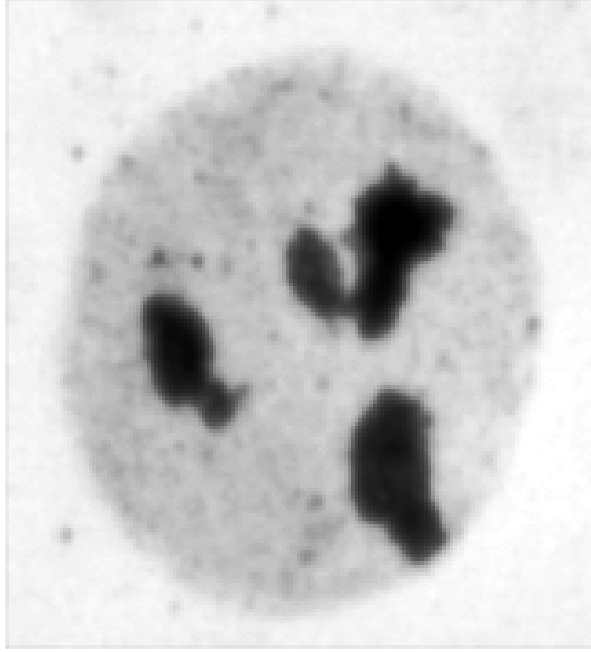


**Şekil 4.2.** Kültür ortamındaki FHE konsantrasyonu ile interfazda bulunan NORa/TÇa oranları arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafikleri.

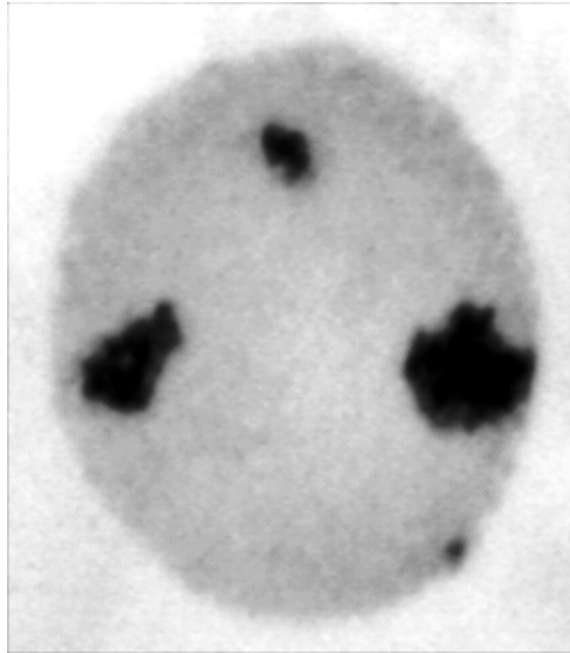
**A)** Serbest trizomi 21'li DSu hastalar (N=30)

**B)** Kontrol (N=24)

DS'lu bir bireye ait % 2.21 FHE konsantrasyonunda  $\text{AgNO}_3$  ile boyanmış T-lenfosit interfaz çekirdeğindeki NOR bölgeleri Resim 4.3'de, sağlıklı bir bireye ait yine % 2.21 FHE konsantrasyonunda  $\text{AgNO}_3$  ile boyanmış T-lenfosit interfaz çekirdeğindeki NOR bölgeleri ise Resim 4.4'de gösterilmiştir.



**Resim 4.3.** Down sendromlu bir bireye ait  $\text{AgNO}_3$  ile boyanmış T-lenfosit interfaz çekirdeği



**Resim 4.4.** Sağlıklı bir bireye ait  $\text{AgNO}_3$  ile boyanmış T-lenfosit interfaz çekirdeği

## 4.2. FİTOHEMAGLUTİNİN (FHE) KONSANTRASYONUNUN MITOTİK İNDEKSE ETKİSİ

Çalışmamızda, FHE konsantrasyonunun Mitotik indekse (Mİ) etkisi de araştırılmış ve hem DS'lu hem de kontrollerinin kan kültürleri için optimum FHE konsantrasyonu bulunmaya çalışılmıştır. FHE konsantrasyonunun 30 DS'lu ve 24 sağlıklı kontrollerinin kan lenfositlerinde Mİ'e etkisini incelemek için, her derişimden 5000-6000 hücre sayılmış ve sonuçlar % olarak Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de karşılıklı olarak verilmiştir.

Tablolarda, hem DS'lu hem de sağlıklı kontrollerin genel ortalamaları verilmiştir. Bireyler arasında önemli farklılıklara karşılık, 30 DS'lu ve 24 sağlıklı kontrolün 0.37 ml, 0.75 ml, 1.48 ml ve 2.21 ml FHE konsantrasyonlarındaki genel % Mİ değerleri,  $X \pm SS$  olarak karşılıklı şekilde sırasıyla; DS'lularda  $4.20 \pm 1.73$ ,  $4.57 \pm 1.31$ ,  $4.69 \pm 1.19$ ,  $4.19 \pm 1.11$  ve kontrollerde  $4.37 \pm 1.67$ ,  $5.06 \pm 1.60$ ,  $5.01 \pm 1.47$  ve  $4.98 \pm 1.43$  olarak bulunmuştur. Bu durumda, Biological Industries (İsrail) ürünleri için % 1-1.5 hacim/hacim FHE, hem DS'lu, hem de kontrollerin kan kültürleri için optimum (hem etkin, hem tutumlu) bulundu.

**Tablo 4.7.** 30 DS'luda FHE konsantrasyonuna göre Mİ değerleri (%). FHE konsantrasyonuna göre her bir konsantrasyondan yaklaşık 5000-6000 hücre sayılmıştır. Genel ortalamalar ise en alt satırda  $X \pm SS$  şeklinde görülmektedir.

Hasta	Yaş	Cins	% Mİ (ml FHE / 100 ml'lik ortam)			
			0.37 ml (%)	0.75 ml (%)	1.48 ml (%)	2.21 ml (%)
1) KT	8 aylık	E	2.66	3.88	6.73	4.68
2) UA	2 aylık	E	1.15	2.47	3.15	4.16
3) TB	13 günlük	K	2.18	2.22	2.83	3.53
4) BK	1 aylık	K	2.86	5.49	7.14	5.14
5) İK	1 aylık	E	2.68	4.28	4.46	4.49
6) MK	5.5 aylık	E	3.42	4.20	3.77	2.90
7) İÜ	1 aylık	E	5.12	4.94	4.62	4.20
8) KB	~1 aylık	K	4.04	4.60	5.52	4.43

**Tablo 4.7.**'nin devamı

<b>9) AS</b>	~1 yıl	K	1.87	3.55	3.74	2.61
<b>10) SD</b>	~1 yıl	K	5.41	enfeksiyon	6.89	7.81
<b>11) LT</b>	2 aylık	K	4.65	4.29	4.47	3.43
<b>12) DB</b>	Premature	K	4.37	4.30	4.95	4.52
<b>13) SÇ</b>	1 yıl	K	4.72	5.26	5.58	5.59
<b>14) KT</b>	~1 yıl	K	1.18	3.41	3.46	2.97
<b>15) SE</b>	6 aylık	E	1.56	5.31	5.57	2.73
<b>16) LG</b>	6 aylık	K	3.52	4.01	3.50	3.50
<b>17) AL</b>	~2 aylık	E	3.43	3.51	3.59	3.66
<b>18) FP</b>	8 yıl	E	5.78	5.50	5.18	5.19
<b>19) KK</b>	3 yıl	K	3.23	4.14	3.91	3.64
<b>20) EP</b>	18 günlük	E	6.41	4.16	4.63	4.20
<b>21) EB</b>	~1 aylık	E	4.85	3.30	3.40	3.44
<b>22) FE</b>	13 aylık	E	5.49	3.92	4.07	4.11
<b>23) FK</b>	4 aylık	K	3.71	4.83	4.02	3.17
<b>24) BE</b>	6 aylık	K	5.31	3.91	3.99	4.00
<b>25) BN</b>	1.5 yıl	K	6.21	5.65	5.44	5.43
<b>26) YD</b>	9 aylık	E	4.45	5.00	4.97	4.33
<b>27) AT</b>	3 aylık	E	6.34	4.64	4.14	3.27
<b>28) MB</b>	3.5 aylık	E	5.25	5.73	3.95	3.43
<b>29) SN</b>	10 aylık	K	5.73	7.57	6.29	5.59
<b>30) MS</b>	9 aylık	E	8.27	8.55	6.74	5.60
<b>Genel Ortalama</b>			<b>4.20±1.73</b>	<b>4.57±1.31</b>	<b>4.69±1.19</b>	<b>4.19±1.11</b>

**Tablo 4.8.** 24 kişilik kontrol grubunda FHE konsantrasyonuna göre Mİ değerleri (%). Her satırdaki rakamlar, FHE konsantrasyonuna göre her bir konsantrasyondan yaklaşık 5000-6000 bireysel olarak sayılmış hücre ortalamalarını verirken, genel ortalamalar en alt satırda X±SS şeklinde görülmektedir.

Hasta	Yaş	Cins	% Mİ (ml FHE / 100 ml'lik ortam)			
			0.37 ml (%)	0.75 ml (%)	1.48 ml (%)	2.21 ml (%)
1) KB	~1 aylık	K	6.49	6.45	5.08	5.15
2) İH	2 yıl	K	4.73	4.56	4.68	4.55
3) ÖZ	14 günlük	K	2.62	2.49	2.66	2.62
4) BT	6 aylık	K	5.76	5.37	5.64	5.56
5) Yİ	12 günlük	E	5.25	5.17	5.00	4.92
6) BC	5 aylık	K	3.81	4.39	4.14	4.20
7) AH	10 aylık	E	2.75	3.69	2.95	3.67
8) SB	1 aylık	K	3.34	2.82	2.58	2.41
9) CÖ	~1 aylık	K	5.81	5.24	4.57	5.24
10) AG	~1 aylık	K	3.75	4.34	4.33	3.51
11) AB	3 aylık	E	4.75	3.84	3.72	3.30
12) TC	10 günlük	K	6.50	6.38	5.54	4.57
13) FZ	14 aylık	E	3.90	5.68	7.08	6.83
14) İM	2 yıl	E	4.25	4.89	5.96	3.91
15) HK	1.5 aylık	K	1.24	2.96	4.78	5.10
16) YA	8 yıl	K	3.95	7.96	7.99	8.15
17) MU	8 yıl	E	8.64	8.60	8.30	7.67
18) FG	1 yıl	E	2.61	4.77	5.89	6.56
19) MR	5 aylık	K	2.55	3.75	3.76	4.86
20) HÜ	3 yıl	K	4.77	6.66	Apopt.	6.10
21) RÇ	1.5 aylık	E	2.67	3.07	4.75	5.76
22) SC	5 yıl	E	6.35	5.47	5.58	5.47
23) SM	9 aylık	E	4.08	6.87	4.80	4.27
24) FN	7 yıl	K	4.20	6.13	5.41	5.13
<b>Genel Ortalama</b>			<b>4.37±1.67</b>	<b>5.06±1.60</b>	<b>5.01±1.47</b>	<b>4.98±1.43</b>

Tablo 4.7’de ve Tablo 4.8’de, her iki gruptan alınmış periferik kan lenfositlerinin FHE derişimine göre bulunmuş % Mİ’lerinde ilk göze çarpan özellik, hem kontrol hem de DSlu’larda önemli ölçüde bireysel farklılıkların olmasıdır. Bazılarındaki Mİ’ler FHE derişimine göre düzenli olarak artarken [Tablo 4.8’de HK (15), FG (18), RÇ (21), Tablo 4.7’de UA (2), TB (3), SD (10)] bazı bireylerde hemen hiç değışmemekte [Tablo 4.8’de İH (2), ÖZ (3), Yİ (5) ve Tablo 4.7’de AL (17)] bazılarındaki ise düzenli olarak azalmaktadır [Tablo 4.8’de TC (12), MU (17), Tablo 4.7’de İÜ (7)].

Bu düzenli artma, sabit kalma ve azalmanın dışında belli bir FHE konsantrasyonundan sonra da düşüşler görülebilmektedir. Tablo 4.8’de İM (14) ve MU (17), %2.21’lik FHE den itibaren, SM (23) ve FN (24), %1.48 den itibaren, SC (22)’de % 0.75’den itibaren düşüş göstermektedir. FHE konsantrasyonunun herhangi bir değerinden itibaren başlayan Mİ’lerdeki azalmalar Tablo 4.7’deki DS’lu grubu için de geçerlidir.

Mİ’lerin genel ortalamaları kontrollerde % 0.75’lik FHE konsantrasyonundan itibaren bir plato oluşturmakta ve bu plato hafif azalarak da olsa % 2.21’lik FHE konsantrasyonuna kadar sürmektedir. DSlu’larda ise genel ortalamalar bir çeşit çan eğrisi göstermekte ve maksimum Mİ, FHE nin % 0.75’lik ile % 1.48’lik değerleri arasında bulunmaktadır.

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Farklı laboratuvarlar arasında lenfosit kültür koşulları, örneğin mitojen konsantrasyonu standardize edilmediği için, bu konsantrasyon çalışma gruplarına göre önemli ölçüde değişkenlik gösterir. Örnek olarak, daha önceki yüksek lisans tezimizde (79), bilgisayar yardımlı görüntü analizi ile DS'lu bireylerde interfazik AgNOR'ların değerlendirilmesini ve kültür ortamındaki sabit FHE konsantrasyonunda DS'lu bireylerin lenfositlerinin, FHE ile uyarılmalarından sonra kendi NOR ifadelerini kontrol hücrelerinin yaptığı gibi azalan yönde (down-regulate) düzenleyemediklerini göstermiştik (80). Şu andaki mevcut çalışmamız, kültür ortamındaki farklı FHE konsantrasyonlarına göre DS'lu bireylerin lenfositlerindeki NOR ifadelerinin değişimi olduğu için bir önceki çalışmamızla uyumludur.

Kültür ortamındaki mitojen konsantrasyonu ile DS'lu bireylerin lenfositlerindeki metafaz hücrelerinde aktif AgNORs taşıyan kromozomların sayısının ve interfaz hücrelerindeki NOR alanlarının büyüklüğünün değişimi hakkında literatürde herhangi bir veriye rastlanılamamıştır. Mevcut çalışmamızda DS'lu bireylerin lenfositlerin-

deki gerek metafaz hücrelerindeki AgNOR'la boyanan kromozom sayıları, gerekse interfaz hücrelerindeki AgNOR'la boyanan NOR alanlarının büyüklüğü, kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin lenfositlerindeki metafaz ve interfaz hücreleri ile karşılaştırıldığında, ortamdaki mitojen konsantrasyonu ile önemli ölçüde değişmekte ve FHE konsantrasyonu arttıkça bu artışa uygun olarak metafaz AgNOR(+) kromozom sayısı ve interfaz NOR alanları da artış göstermektedir. DS'lu bireylerin lenfositlerinde ortamdaki FHE konsantrasyonuna göre AgNOR(+) kromozom sayılarındaki ve NOR alanlarındaki bu artış, DS'lu bireylerin lenfositlerinin yeni gözlenen bir özelliği olarak görülmektedir ve bu gözlem bizi, DS'lu hastalarda AgNOR değerlendirilmesi hakkında yeni bir bakışa yöneltmektedir.

DS'lu fenotipinin, insan 21.kromozomu tarafından şifrelenen 300'den fazla genlerden bir kısmının fazladan ifadesi yüzünden olduğu sanılmaktadır (65). Aslında, fazladan gen yükünün bir sonucu olarak, 21.kromozom üzerinde yerleşim gösteren genlerin aşırı ifadesi, DS fenotipinin açıklaması için merkezi bir hipotez olarak düşünülmüştür (81). Bununla birlikte, DS'lu fare modelinde genlerin tümünün, ifadesinde beklenen %50'lik artışı göstermediği ve bazı genlerin ifade düzeylerinde yaşa bağlı olarak azalma gösterdiği bildirilmiştir (65, 82). 21.kromozom üzerinde şifrelenen aynı proteinlerin ölçülmesi, DS kritik bölgenin gen ürünlerinin hepsinin yaşamın başlangıcında DS beyinde aşırı ifade edilmediğini ortaya çıkarmış ve DS fenotipinin gen-doza etkisi hipotezi ile basitçe açıklanamayacağını göstermiştir (83, 84). Böylece, bu gen-doza hipotezine karşı çıkmıştır (81). Bununla birlikte, şu andaki mevcut çalışmamız, kültür ortamındaki mitojen konsantrasyonuna göre, DS'lu bireylerin lenfositlerindeki NOR'ların ifadesinin kontrollerden açık bir farklılık gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu gözlem, rDNA, NORs ya da diğer proteinlerin fazladan ifadesi yüzünden DS'lu hücrelerinde boşa harcanan enerji temeline dayanan yeni bir yaklaşım olarak hizmet edebilir.



DS'lu bireylerde bir hücreye düşen ortalama Ag(+) akrosentrik kromozom sayısının FHE konsantrasyonu artışı ile (% 0.37, 0.75, 1.48 ve 2.21ml hacim/hacim) birlikte karşılıklı olarak  $8.32\pm 1.18$ ,  $8.58\pm 1.15$ ,  $9.13\pm 1.02$  ve  $9.32\pm 0.95$  şeklinde artması da bu hipotezi destekler. Demek ki bir hücrede Ag(-) görünen bir akrosentrik kromozomun NOR bölgesi (rDNA dizisi) konstitüsyonel (yapısal) olarak inaktif değildir. Bu hücre içindeki bir ya da birkaç ürünün yetersizliğinden inaktif (Ag-) gibi görünmektedir. Bu ürün sağlandığında Ag(-) görünen bazı akrosentrikler de Ag(+) olarak ortaya çıkabilmektedirler. Ag(-) görünen bir akrosentrik kromozom gerçekten yapısal olarak NOR(-) olsaydı, FHE konsantrasyonunun artması ile birlikte Ag(+) olamazdı. Hep Ag(-) olarak kalırdı. Ancak FHE konsantrasyonu artışının 21. kromozom ile birlikte nasıl bir sinerjetik etkileşime girip de Ag(-) bir akrosentriği Ag(+) yaptıklarının mekanizması henüz bilinmemektedir.

Sağlıklı bireylerde, yukarıdaki FHE konsantrasyonlarına göre hiç değişmeden hep ortalama  $8.19\pm 0.89$ ,  $8.20\pm 0.90$ ,  $8.24\pm 0.89$  ve  $8.28\pm 0.90$  değerlerinde kalan Ag(+) akrosentrik sayılarının bulunmuş olması da ilginçtir. Hücre başına düşen bu ortalama Ag(+) akrosentrik kromozom sayısı, DS'lu vakaların en düşük FHE konsantrasyonunda bulunan ortalama sayıdan (8.32) da küçüktür. Bunun yorumu da şu şekilde yapılabilir: Demek ki Ag(-) bir akrosentrik kromozomu Ag(+) yapmak için dış faktörler (FHE) yeterli değildir. Hücre içinde belli bir ürünün ya da ürünlerin bulunması esastır. Normal bir hücrede sabit bir hızla ve 2 dozda sentezlenen bir ürün/ürünler, ancak 8 akrosentrik kromozomu Ag(+) yapmaya yeterli gelmektedirler. Ortalama 2 akrosentrik de Ag(-) olarak kalmaktadır. DS'lu hücrede ise 3 doz olarak sentezlenen ürün/ürünler, daha fazla akrosentrik kromozomu Ag(+) yapmaya yetmektedir. 21. Kromozomun uzun kolunda yer aldığını ve konstitüsyonel olarak aktivite gösterdiğini ileri sürdüğümüz gen ürünleri henüz bilinmemekle birlikte, NOR proteinleri (11, 34, 38, 46) aday ürünler arasında ilk akla gelenleridir. Sonuç olarak, Down sendromlu vakaların hücreleri, rRNA sentezinin kontrolünü azalan

yönde (downregulation) yapamamaktadırlar. Gereksiz enerji harcanması nedeni ile bu olayın artı bir handikap oluşturacağı açıktır.

Literatürde, kültür ortamında aktif NOR taşıyan akrosentrik kromozom sayısının kişiden kişiye değişiklik göstermekle birlikte, aynı kişinin farklı dokularında değişmeden kaldığı ileri sürülmektedir (21, 85). Ancak bulgularımız, DS'lulardaki aktif NORs sayısının sabit olmayıp FHE derişimine göre değiştiğini, sonuç olarak da tüm laboratuvarlar için geçerli bir standardizasyonun oluşturulması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızdan çıkan genel sonuç şudur ki, DS'lu lenfositlerindeki NORs ifadeleri kontrollerin lenfositlerinde olduğu gibi bir kararlılık göstermemekte ve ortamdaki FHE derişimine göre değişmektedir. O halde, DS'lu bireylerin NOR analizlerinin laboratuvarlar arasında karşılaştırılıp değerlendirilebilmesi için önce ekim koşullarının, özellikle ortamdaki mitojenin niteliğinin ve konsantrasyonunun bir an önce sabitlenmesi (standartlaştırılması) gerekmektedir.

İnsan lenfositlerinin mitozaya yönlendirilmesi ve kromozom analizlerinde birim hacimdeki büyüme ortamına eklenen FHE miktarı, bir laboratuardan diğerine göre önemli ölçüde değişmektedir. Bunun nedeni bilinmemekte ve literatürde de bu konuda yeterli bir bilgiye ulaşılamamaktadır. Bireyler arasında önemli farklılıklara karşılık, FHE'nin % 0.37, 0.75, 1.48 ve 2.21'lik (hacim/hacim) konsantrasyonlarında artış yönüne doğru sıralandığında, % mitotik indekslerinin genel ortalamaları karşılıklı olarak sırasıyla 30 DS'lu'da %  $4.20 \pm 1.73$ ,  $4.57 \pm 1.31$ ,  $4.69 \pm 1.19$ ,  $4.19 \pm 1.11$  iken 24 kontrolde %  $4.37 \pm 1.67$ ,  $5.06 \pm 1.60$ ,  $5.01 \pm 1.47$  ve  $4.98 \pm 1.43$  olarak bulunmuştur. FHE konsantrasyonunun belli bir değerinden itibaren görülen Mİ azalmaları, FHE reseptörlerinin bu noktada doymuş olmaları ve daha fazla FHE nin bu birey lenfositlerine olası toksik etkileri ile açıklanabilir. FHE artışından fazla etkilenmeden sabit Mİ gösteren hücrelerin davranışlarına bireysel farklılıklardan başka bir açıklama getirememekteyiz.

Anderson ve arkadaşları (1988), trisiumlu timidin ve FHE- P ( bazen de FHE-R ve hiç birinin özellikleri ve üreticisi belirtilmemiş) kullanarak 4 erişkin bireyde 46-48.saatten itibaren 18 saat içindeki timidin tutulumunun 1-5 µl/ml arasındaki FHE konsantrasyonunda maksimum olduğunu bulmuşlardır (86). Ancak kullanılan yöntemin başkalığı, bizim kullandığımız FHE'nin M formu yerine P ve R formlarının kullanılmış olması, optimum FHE konsantrasyonunu bulmada kullanılan birey sayısının (4 kişi) yetersizliği, sonuçların bizim bulgularımızla karşılaştırılmasına engeldir. Yine de 106 kişinin sadece bir tek FHE konsantrasyonundaki (1µl/ml) timidin tutulumunun bireyler arasında 5-6 katına varan değişimler göstermesi, ancak bireysel farklılıklarla açıklanabilir (86).

Farrant ve arkadaşları (1980), trisiumlu timidin konsantrasyonu, spesifik radyoaktivite yoğunluğu, hücre yoğunluğu, FHE konsantrasyonu gibi parametreleri çalışmışlar (87), ancak bir kişinin belli bir süredeki DNA sentez hızı ile 54 kişinin 72. saat sonundaki Mİ'lerin doğrudan karşılaştırılması ne uygun ne de inandırıcı olabilir. Ayrıca bu çalışmada bireysel farklılıklara yeterince değinilmemiştir. Oysa hindi lenfositlerinde bile FHE ye karşı bireysel farklılıklar görülmüştür (88). Aynı durum tavuklar için de geçerlidir (89).

Kan/lenfosit kültüründe kullanılan mitojen konsantrasyonunun standartlaştırılması bazı sitogenetik analizler için de gereklidir. Örneğin aynı bir DS'lunun AgNOR(+) taşıyan kromozom sayısı beklenilmedik bir şekilde ortamdaki FHE konsantrasyonuna göre değişmektedir (79). FHE konsantrasyonu belli bir değer içinde artıkça AgNOR'la boyanan akrosentrik kromozom sayısı da 7-8 den 11 e doğru artmaktadır (90).

Sonuç olarak bu tez çalışması ile, literatüre yaptığımız katkı üç noktada ortaya çıkmaktadır:

- DS'lularda rRNA gen aktivitelerinin aşağı ayarlanması (down regulation) in vitro olarak normal bireylerdeki gibi yapılamamaktadır. İn vitro'da mitojen konsantrasyonu arttıkça NOR ifadesi de artmaktadır. DS'lularda AgNOR analizlerinin birbirleri ile tutarlı olması için, mitojen türü ve konsantrasyonu sabit olmalıdır.
- DS'lu bebekler döllenme anından itibaren gereksiz yere fazladan rRNA (buna NOR proteinleri de eşlik edebilir) sentezliyor olmalıdırlar. DS'lu hücrelerdeki rRNA düzeylerinde genç bireylerde özellikle bebeklerde fazla, yetişkinlerde düşük bulunması bunu doğrulamaktadır (91). Bu gereksiz enerji harcanması ise bu bebeklerde temel (moleküler/hücresel) bir handikap oluşturmaktadır. Bu da DS fenotipinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır.
- Özellikleri gereç ve yöntemde belirtilen ortam, fetal dana serumu ve FHE kullanılması durumunda, kontrollerde % 0.75 konsantrasyonundaki FHE, kromozom analizleri için yeterli metafaz sıklığını sağlarken, DS'lularda bu optimum (hem etkin hem de tutumlu) konsantrasyon % 0.75 ile % 1.48 hacim/hacim arasında bulunmaktadır. O halde gereç ve yöntemde özellikleri verilen 100 ml'lik komple bir ortam için 1 ile 1.5 ml arasındaki FHE, hem DS'lu, hem de diğer/sağlıklı bireylerin kan kültüründe kullanılabilir. Daha fazla FHE kullanımının faydası olmayacağı gibi, gereksiz kullanım nedeniyle ekonomik zararı da olacaktır.

## **6. KAYNAKLAR**

1. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 2000; 31:117-120
2. Lee W, Kim Y, Lee KY, Kang CS, Lee W, et al. AgNOR of human interphase cells in relation to acrocentric chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 113:14-18
3. Comai L. The nucleolus: a paradigm for cell proliferation and aging. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:1473-1478
4. Hittmair A, Öfner D, Offner F, Feichtinger H, Ensinger C, et al. In vitro investigations of interphase and metaphase argyrophilic nucleolar organizer regions and cellular proliferation in the human urothelial cancer cell line HOK-1. *Virchows Arch* 1994; 424:149-154
5. Ploton D, Visseaux-Coletto B, Canellas JC, Bourzat C, Adnet JJ, et al. Semiautomatic quantification of silver-stained nucleolar organizer regions in tissue sections and cellular smears. *Analyt Quant Cytol Histol* 1992; 14(1):14-23

6. Silva AMÁ, Payão SLM, Borsatto B, Bertolucci PHF, Smith MAC. Quantitative evaluation of rRNA in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 2000; 120:57-64
7. Capoa A, Felli MP, Baldini A, Rocchi M, Archidiacono N, et al. Relationship between the number and function of human ribosomal genes. *Hum Genet* 1988; 79:301-304
8. Green JE, Rosenbaum KN, Rapoport SI, Schapiro MB, White BJ. Variant nucleolus organizing regions and the risk of Down syndrome. *Clin Genet* 1989; 35:243-250
9. Lindner LE. Improvements in the Silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem* 1993; 41(3):439-445
10. Wachtler F, Hopman AHN, Wiegant J, Schwarzacher HG. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. *Exp Cell Res* 1986; 167:227-240
11. Schwarzacher HG, Mikelsaar AV, Schnedl W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet Cell Genet* 1978; 20:24-39
12. Mikelsaar AV, Schwarzacher HG. Comparison of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblasts. *Hum Genet* 1978; 42:291-299
13. Borsatto B, Smith MAC. Reduction of the activity of ribosomal genes with age in Down's syndrome. *Gerontology* 1996; 42:147-154
14. Payão SLM, Smith MAC, Kormann-Bortolotto MH, Toniolo J. Investigation of the nucleolar organizer regions in Alzheimer's disease. *Gerontology* 1994; 40(1):13-17
15. Raška I, Koberna K, Malínský J, Fidlerová H, Mašata M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 2004; 96:579-594
16. Pendás AM, Morán P, Garcia-Vázquez E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 63:128-130
17. Haaf T, Hayman DL, Schmid M. Quantitative determination of rDNA transcription units in vertebrate cells. *Exp Cell Res* 1991; 193:78-86

18. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron* 2000; 31:127-131
19. Guanti G, Petrinelli P. rDNA and acrocentric chromosomes in man. *Cell Differ* 1974; 2:319-324
20. Verma RS, Rodriguez J. Structural organization of ribosomal cistrons in human nucleolar organizing chromosomes. *Cytobios* 1985; 44:25-28
21. Mikelsaar AV, Schwarzacher HG, Schnedl W, Wagenbichler P. Inheritance of Ag-stainability of nucleolus organizer regions. *Hum Genet* 1977; 38:183-188
22. Mikelsaar AV, Schmid M, Krone W, Schwarzacher HG, Schnedl W. Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. *Hum Genet* 1977; 37:73-77
23. Schedle A, Willheim M, Zeitelberger A, Gessl A, Frauendorfer K, et al. Nucleolar morphology and rDNA in situ hybridisation in monocytes. *Cell Tissue Res* 1992; 269:473-480
24. Robert-Fortel I, Junera HR, Geraud G, Hernandez-Verdun D. Three-dimensional organization of the ribosomal genes and Ag-NOR proteins during interphase and mitosis in PtK1 cells studied by confocal microscopy. *Chromosoma* 1993; 102:146-157
25. Ploton D, Menager M, Adnet JJ. Simultaneous ultrastructural localization of Ag-NOR (Nucleolar organizer region) proteins and ribonucleoproteins during mitosis, in human breast cancerous tissues. *J Cell Sci* 1985; 74:239-256
26. Roussel P, Belenguer P, Amalric F, Hernandez-Verdun D. Nucleolin is an Ag-NOR protein; This property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state. *Exp Cell Res* 1992; 203:259-269
27. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 1975; 53:37-50
28. Doggett DL, Strehler BL, Makinodan T. Age-related RNA polymerase I activity in isolated nuclei of PHA stimulated human lymphocytes. *Mech Ageing Dev* 1986; 36:25-39

29. Ploton D, Thiry M, Menager M, Lepoint A, Adnet JJ, et al. Behaviour of nucleolus during mitosis. *Chromosoma* 1987; 95:95-107
30. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* 2000; 31:121-126
31. Scheer U, Hock R. Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:385-390
32. Roussel P, Hernandez-Verdun D. Identification of Ag-NOR proteins, Markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* 1994; 214:465-472
33. Pession A, Farabegoli F, Trerè D, Novello F, Montanaro L, et al. The AgNOR proteins and transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cell nucleoli. *Chromosoma* 1991; 100:242-250
34. Biliński SM, Bilińska B. A new version of the Ag-NOR technique. A combination with DAPI staining. *J Histochem* 1996; 28:651-656
35. Trerè D, Pession A, Derenzini M. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* 1989; 184:131-137
36. Derenzini M, Farabegoli F, Pession A, Novello F. Spatial redistribution of ribosomal chromatin in the fibrillar centres of human circulating lymphocytes after stimulation of transcription. *Exp Cell Res* 1987; 170:31-41
37. Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Farabegoli F, Pession A, Novello F. Structure of ribosomal genes of mammalian cells in situ. *Chromosoma* 1987; 95:63-70
38. Denton TE, Howell WM, Barrett JV. Human nucleolar organizer chromosomes: Satellite Associations. *Chromosoma* 1976; 55:81-84
39. Sigmund J, Schwarzacher HG, Mikelsaar AV. Satellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR-activity. *Hum Gen* 1979; 50:81-91



40. Demirtas H, Candemir Z, Cucer N, Imamoglu N, Donmez H ve ark. Essay on the nucleoli survey by the  $\alpha$ - and  $\beta$ - satellite DNA probes of the acrocentric chromosome in mitogen-stimulated human lymphocytes. *Ann Génét-Paris* 2000; 43:61-68
41. Hubbell HR. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technology* 1985; 60(5):285-294
42. Jimènez R, Burgos M, Diaz de la Guardia R. A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity* 1988; 60:125-127
43. Hernandez-Verdun D, Derenzini M, Bouteille M. Relationship between the Ag-NOR proteins and ribosomal chromatin in situ during drug-induced RNA synthesis inhibition. *J Ultrastruct Res* 1984; 88:55-65
44. Sirri V, Roussel P, Gendron MC, Hernandez-Verdun D. Amount of the two major Ag-NOR proteins, Nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 1997; 28:147-156
45. Dergunova NN, Bulycheva TI, Artemenko EG, Shpakova AP, Pegova AN, et al. A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. *Immonol Lett* 2002; 83:67-72
46. Scheer U, Xia B, Merkert H, Weisenberger D. Looking at Christmas trees in the nucleolus. *Chromosoma* 1997; 105:470-480
47. Lipponen P, Aaltomaa S, Syrjänen K. Morphometric quantitation of nucleolar organizer region proteins in breast carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 1993; 15(5):311-316
48. Fatica A, Tollervey D. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:313-318
49. Gerbi SA, Borovjagin AV, Lange TS. The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:318-325
50. Moss T. At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14:210-217
51. Jordan EG. Interpreting nuclear structure: where are the transcribing genes?. *J Cell Sci* 1991; 98:437-442

52. Hilliker AJ, Appels R. The arrangement of interphase chromosomes: Structural and functional aspects. *Exp Cell Res* 1989; 185:297-318
53. Setterfield G, Hall R, Bladon T, Little J, Kaplan JG. Changes in structure and composition of lymphocyte nuclei during mitogenic stimulation. *J Ultrastruct Res* 1983; 82:264-282
54. Vandelaer M, Thiry M, Goessens G. Ultrastructural distribution of DNA within the ring-shaped nucleolus of human resting T lymphocytes. *Exp Cell Res* 1993; 205: 430-432
55. Leary DJ, Huang S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett* 2001; 509:145-150
56. Nowell PC. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 1960; 20:462-466
57. Jaehning JA, Steward CC, Roeder RG. DNA-dependent RNA polymerase levels during the response of human peripheral lymphocytes to Phytohemagglutinin. *Cell* 1975; 4:51-57
58. Huang Y, Wang XB, Gascoyne PRC, Becker FF. Membrane dielectric responses of human T-lymphocytes following mitogenic stimulation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1417:51-62
59. Nozoe T, Korenaga D, Ohga T, Futatsugi M, Maehara Y. Suppression of the phytohemagglutinin response to lymphocytes is an independent prognosticator in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:260-265
60. Weipoltshammer K, Schöfer C, Almeder M, Sylvester J, Wachtler F. Special distribution of sex chromosomes ribosomal genes: A study on human lymphocytes and testicular cells. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 73:108-113
61. Arrighi FE, Lau YF, Spallone A. Nucleolar activity in differentiated cells after stimulation. *Cytogenet Cell Genet* 1980; 26:244-250
62. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet* 2003; 361:1281-1289
63. Antonarakis SE, Lyle R, Chrast R, Scott HS. Differential gene expression studies to explore the molecular pathophysiology of Down syndrome. *Brain Res Rev* 2001; 36:265-274

64. Gardiner K, Slavov D, Bechtel L, Davisson M. Annotation of human chromosome 21 for relevance to Down syndrome: gene structure and expression analysis. *Genomics* 2002; 79(6):833-843
65. Gardiner K, Fortna A, Bechtel L, Davisson MT. Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene* 2003; 318:137-147
66. Smith MAC, Borsatto B. Down's syndrome, ageing and fragile sites. *Mech Ageing Dev* 1998; 101:167-173
67. McQuillan CI, Choo KH. Comparison of total cellular DNA, mRNA, and rRNA levels between normals and Down syndrome patients. *J Inher Metab Dis* 1992; 15:112-120
68. Kadota M, Nishigaki R, Wang CC, Toda T, Shirayoshi Y, et al. Proteomic signatures and aberrations of mouse embryonic stem cells containing a single human chromosome 21 in neuronal differentiation: an in vitro model of Down syndrome. *Neuroscience* 2004; 129:325-335
69. Antonorakis SE. 10 years of genomics, Chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 1998; 51:1-16
70. Raji NS, Rao KS. Trisomy 21 and accelerated aging: DNA-repair parameters in peripheral lymphocytes of Down's syndrome patients. *Mech Ageing Dev* 1998; 100:85-101
71. Park E, Alberti J, Mehta P, Dalton A, Sersen E, et al. Partial impairment of immune functions in peripheral blood leukocytes from aged men with Down's syndrome. *Clin Immunol* 2000; 95(1):62-69
72. Greber-Platzer S, Schatzmann-Turhani D, Wollenek G, Lubec G. Evidence against the current hypothesis of "gene dosage effects" of Trisomy 21: ets-2, encoded on chromosome 21 is not overexpressed in hearts of patients with Down syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254:395-399
73. Morimoto K, Kaneko T, Lijima K, Koizumi A. Proliferative kinetics and chromosome damage in Trisomy 21 lymphocyte cultures exposed to  $\gamma$ -rays and Bleomycin. *Cancer Res* 1984; 44:1499-1504

74. Nakamura E, Tanaka S. Biological ages of adult men and women with Down's syndrome and its changes with aging. *Mech Ageing Dev* 1998; 105:89-103
75. Ceballos-Picot I, Nicole A, Briand P, Grimber G, Delacourte A, et al. Neuronal-specific expression of human copper-zinc superoxide dismutase gene in transgenic mice: animal model of gene dosage effects in Down's syndrome. *Brain Res* 1991; 552:198-214
76. Petronis A. Alzheimer's disease and Down syndrome: From meiosis to dementia. *Exp Neurol* 1999; 158:403-413
77. Pallister C, Jung SS, Shaw I, Nalbantoglu J, Gauthier S, et al. Lymphocyte content of amyloid precursor protein is increased in Down's syndrome and aging. *Neurobiol Aging* 1997; 18(1):97-103
78. Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. Principles of medical Genetics (2nd ed). Williams and Wilkins, Baltimore 1998, pp 170-173
79. İmamoğlu N. T-lenfosit interfaz çekirdeklerinde NOR boyama yöntemini optimize etme çalışmaları ve Down sendromlu hastalara uygulanması. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 1999
80. Demirtas H, Imamoglu N, Donmez H, Cucer N, Yilmaz A, ve ark. Condensed chromatin surface and NOR surface enhancement in mitogen-stimulated lymphocytes of Down syndrome patients. *Ann Génét-Paris* 2001; 44:77-82
81. Shim KS, Bergelson JM, Furuse M, Ovod V, Krude T, et al. Reduction of chromatin assembly factor 1 p60 and C21orf2 protein, encoded on chromosome 21, in Down syndrome brain. *J Neural Transm Suppl* 2003; 67:117-128
82. Harris-Cerruti C, Kamsler A, Kaplan B, Lamb B, Segal M, et al. Functional and morphological alterations in compound transgenic mice overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase and amyloid precursor protein. *Eur J Neurosci* 2004; 19:1174-1190

83. Cheon MS, Shim KS, Kim SH, Hara A, Lubec G. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain: Challenging the gene dosage effect hypothesis (Part IV). *Amino Acids* 2003; 25:41-47
84. Ferrando-Miguel R, Cheon MS, Lubec G. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down Syndrome brain (Part V): Overexpression of phosphatidyl-inositol-glycan class P protein (DSCR5). *Amino Acids* 2004; 26:255-261
85. Markovic VD, Worton RG, Berg JM. Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. *Hum Genet* 1978; 41:181-18
86. Anderson D, Jenkinson PC, Dewdney RS, Francis AJ, Godbert P et al. Chromosome aberration, mitogen induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of the U.K. population. *Mut Res* 1988; 204:407-420.
87. Farrant J, Clark JC, Lee H, Knight SC, O'Brien J. Condition for measuring DNA synthesis in PHA stimulated lymphocytes in 20 microliters hanging drops with various cell concentrations and period of culture. *J Immunol Meth* 1980; 33:301-312
88. Barta O, Barta V, Domermuth CH, Pierson FW. Optimum conditions for the turkey lymphocyte transformation test. *Avian Dis* 1992a; 36(2):386-394
89. Barta O, Barta V, Pierson FW. Optimum conditions for the chicken lymphocyte transformation test. *Avian Dis* 1992b; 36(4):945-955
90. İmamoğlu N, Demirtaş H, Dönmez H, Hamurcu Z. Down sendromlu lenfositlerinde Kültür ortamına göre aktif NOR sayısı değişimi. VI. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi Özet Kitabı, ss: 173. 2-5 Kasım 2000, Pamukkale Üniversitesi, Denizli
91. Hamurcu Z, Demirtaş H, Kumandaş S. Flow Cytometric Comparison of RNA Content in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Down Syndrome Patients and Control Individuals. *Cytometry Part B-Clin Cytometry* 2006; 70B(1):24-28

## **ÖZGEÇMİŞ**

Nalan İMAMOĞLU, 22.04.1973 yılında Kayseri’de doğdu. 1984 yılında Ahmet Paşa ilkokulundan, 1987’de 50.Yıl Dedeman Ortaokulu’ndan ve 1990 yılında Kayseri Lisesi’nden mezun oldu. 1991’de Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanıp, aynı bölümde lisans eğitimini 1995 yılında tamamladı. 1995 yılı güz döneminde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazanarak yüksek lisans eğitimine başladı. 1996 Nisan ayında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün açmış olduğu araştırma görevliliği sınavını kazanarak Mayıs 1996’da araştırma görevlisi olarak göreve başladı. 1999 Temmuz ayında aynı bölümün yüksek lisans programını tamamladı. 1999 yılı güz döneminde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının açmış olduğu doktora sınavını kazanarak doktora eğitimine başladı ve şu anda Doktora programı tez dönemindedir.

**Nalan İMAMOĞLU**

**Adres (Ev):** Köşk Mah. Köşk Cad. Köşk Apt.

A Blok 7/14 Melikgazi-KAYSERİ

**e-posta:** nimamoglu@erciyes.edu.tr