

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOWN SENDROMLULARIN YANAK EPİTEL
DÖKÜNTÜSÜNDEN AgNOR ANALİZİ VE SAĞLIKLI
KONTROLLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Tezi Hazırlayan

Seçil İLHAN

Tezi Yöneten

Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2006

KAYSERİ

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOWN SENDROMLULARIN YANAK EPİTEL
DÖKÜNTÜSÜDEN AgNOR ANALİZİ VE SAĞLIKLI
KONTROLLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Tezi Hazırlayan

Seçil İLHAN

Tezi Yöneten

Prof.Dr. Halil DEMİRTAŞ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY.05.05 nolu
proje ile desteklenmiştir

Ağustos 2006

KAYSERİ

Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ danışmanlığında **Seçil İLHAN** tarafından hazırlanan “**Down Sendromluların Yanak Epitel Döküntüsünden AgNOR Analizi ve Sağlıklı Kontrolleri ile Karşılaştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

04.08.2006

JÜRİ :

İmza

Üye : Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ (Danışman)

H. Demirtaş

Üye : Prof.Dr.Hamitey DÖNMEZ ALTUNTAŞ

[Signature]

Üye : Doç.Dr.Harun ÜLGER

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

III

TEŞEKKÜR

Öncelikle değerli hocam tez danıőmanım Sayın Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ'a tez çalıőmalarım süresince yapmıő olduğu destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca çalıőmalarım boyunca beni destekleyen ve yönlendiren Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ, Doç.Dr.Nurhan CÜCER, Araő.Gör.Nalan İMAMOğLU ve Araő.Gör.Zuhal HAMURCU'ya da teşekkür ederim.

Bu araştırmanın yapılması ve tezin hazırlanması sırasında başta maddi ve manevi olarak en büyük desteği gördüğüm babam ve sevgili aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

DOWN SENDROMLULARIN YANAK EPİTEL DÖKÜNTÜSÜNDEN AgNOR ANALİZİ VE SAĞLIKLI KONTROLLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZET

Down sendromu (DS) ya da trizomi 21, insanlarda doğuştan gelen en yaygın kromozom bozukluklarından birisidir. DS, çok çalışılmış ve iyi bilinen bir sendrom olmasına karşılık, zeka kusuru dahil diğer fenotipik özelliklerini belirleyen etmenler henüz tam olarak belirlenememiştir.

DS fenotipinin, gereksiz rRNA/ RNA sentezine dayalı olarak, boşa harcanan enerji (wasted energy) ile açıklanabileceği hipotezi ileri sürülmüştür. Ancak, bu bulguların tümü de mezoderm kaynaklı hücreler (Periferik kan mononükleer hücreleri = lenfosit ve monositler) kullanılarak elde edilmişlerdir. Bu çalışmadaki amaç, beyin gibi ektoderm kaynaklı yanak epitelindeki NOR (rDNA) ifadesinin trizomi 21'li hastalarda artıp artmadığını kontrolleri ile karşılaştırılarak ortaya çıkartılmasıdır.

Çalışmamızda 22 Down Sendromlu ve 10 sağlıklı kontrolün yanak epitel hücre çekirdeklerinde NOR alanı (NORa) / Toplam çekirdek alanı (TÇa) oranı bulunarak, hasta- kontrol değerleri olarak kendi aralarında karşılaştırılmıştır. 22 Down Sendromlu hastaların her birinden 50 yanak epitel hücre çekirdeği ölçülmüştür. 10 sağlıklı kontrolün her birinden de ortalama 50 yanak epitel hücre çekirdeği ölçülmüştür.

Sonuç olarak, DS lu hastaların yanak epiteli hücrelerinin genel ortalama NORa/TÇa değeri ($4,08 \pm 1,16$), sağlıklı kontrollerin ortalama NORa/TÇa değerinden ($2,20 \pm 0,62$) yaklaşık 2 kat daha fazla bulunmuştur. [DS lu ve kontrollerde NORa/TÇa değerleri anlamlı derecede farklıdır. ($p < 0.001$, Mann-Whitney u testi kullanılarak)]

Yaptığımız çalışma; DS lu fenotipini açıklamaya yönelik olarak, boşa harcanan enerji (wasted energy) hipotezini destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler : Down Sendromu, NORs, Gümüş Boyama, Yanak Epiteli

THE AgNOR ANALYSIS IN EPITHELIUM OF BUCCAL MUCOSA OF PATIENTS WITH DOWN SYNDROME AND ITS COMPARISON WITH HEALTHY CONTROLS

ABSTRACT

Down Syndrome (DS) or trisomy 21, is one of the most common chromosomal aberrations arising in individuals with born. Although, DS is well studied and hence, well defined, agents that identify many phenotypical characteristics including mental retardation could not have been exactly found yet.

It has been proposed that DS phenotype can be explained with a hypothesis of wasted energy based on needless synthesis of rRNA / RNA. However, all of the relevant findings were obtained using merely mesodermal cells (peripheral mononuclear blood cells= lymphocytes and monocytes). The aim of this work is to reveal whether NOR (rDNA) sequence in buccal epithelium which is ectoderm based like brain is increasing or not by comparing patients of trisomy 21 with healthy controls.

In our work, we calculated the ratio of NOR area to Total Nucleus area (NORa/TNa) of nuclei of buccal epithelial cells taken from 22 DS patients and 10 healthy controls. Thus we could compare the patient-control values with each other. We measured averagely 50 nuclei of buccal epithelial cells from each patient and control.

Consequently, the value of NORa/TNa in buccal epithelial cells of DS patients is found to be $4,08 \pm 1,16$, which is about as much as twice the value of NORa/TNa in healthy controls, $2,20 \pm 0,62$. [The values are significantly different between DS and controls. ($p < 0.001$, by the use of Mann-Whitney test)]

Our work intending to explain the phenotype of DS seems to support the hypothesis of wasted energy.

Key Words: Down Syndrome, NORs, Silver Stain, Buccal Epithelium

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| İÇ KAPAK | I |
| KABUL VE ONAY SAYFASI | II |
| TEŞEKKÜR | III |
| ÖZET | IV |
| ABSTRACT | V |
| İÇİNDEKİLER | VI |
| TABLO VE RESİM LİSTESİ | VIII |
| KISALTMALAR | IX |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1.KROMATİN..... | 3 |
| 2.2. İNSANDA ÇEKİRDEKÇİK (NÜKLEOLUS) YAPISI..... | 4 |
| 2.3. RİBOZOM..... | 6 |
| 2.4. NOR BÖLGELERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ..... | 6 |
| 2.5. NOR PROTEİNLERİ | 7 |
| 2.6. NOR'LARIN GÜMÜŞ NİTRAT İLE BOYANMASI..... | 8 |
| 2.7. DOWN SENDROMU (TRİZOMİ 21)..... | 9 |

| | |
|---|----|
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 12 |
| 3.1. GEREÇLER..... | 12 |
| 3.2. YÖNTEM | 14 |
| 3.2.1. Örneklerin Alınması..... | 14 |
| 3.2.2. Örneklerin Kurutulması | 14 |
| 3.2.3. Örneklerin Fiksasyonu | 14 |
| 3.2.4. Kirliliği Azaltmak İçin HCl Yönteminin Denenmesi | 15 |
| 3.2.5. NOR Boyama..... | 16 |
| 3.2.6. NOR Boyama Sonrası Giemsa Boyama İşlemi | 17 |
| 3.2.7. Hasta ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi | 17 |
| 3.2.8. Bilgisayarlı Ölçüm İşlemleri..... | 18 |
| 3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM..... | 22 |
| 4. BULGULAR..... | 23 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 31 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 35 |
| ÖZGEÇMİŞ | |

TABLO VE RESİM LİSTESİ

| | <u>Sayfa no</u> |
|---|-----------------|
| Tablo 4.1. Down sendromlu 22 hastanın ölçülen NORa/TÇa oranı değerleri | 25 |
| Tablo 4.2. Sağlıklı 10 kontrolün ölçülen NORa/TÇa oranı değerleri | 26 |
| Resim 2.1. Klasik tip Trizomi 21 olan bir bireyin kromozomları..... | 10 |
| Resim 2.2. Belirli fiziksel özelliklere sahip down sendromlu bir çocuk | 11 |
| Resim 3.1. Analiz işleminde kullanılan ışık mikroskobu, video kamera, bilgisayar düzeneği | 18 |
| Resim 3.2. Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek olan epitel hücre çekirdeği | 19 |
| Resim 3.3. Çekirdek ve kondanse kromatin bölgeleri belirlenmiş bir epitel hücre çekirdeği | 21 |
| Resim 4.1. Down Sendromlu bir hastanın Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri | 24 |
| Resim 4.2. Sağlıklı bir kontrolün Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri | 24 |
| Resim 4.3. Down Sendromlu 17)NY'nin Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri | 27 |
| Resim 4.4. Down Sendromlu 18)AG'nin Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri | 28 |
| Resim 4.5. Sağlıklı kontrollerden 7)MK'nin Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri | 28 |
| Resim 4.6. Sağlıklı kontrollerden 3)İC'nin Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri | 29 |

KISALTMALAR

| | |
|-------------------------|---|
| AgNO₃ | : Gümüş Nitrat |
| ° C | : Santigrat derece |
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| DS | : Down Sendromu |
| KK | : Kondanse Kromatin |
| KKy | : Kondanse Kromatin Yüzeyi |
| NOR | : Nucleolus Organizer Region |
| NORsy | : NOR Bölgeleri Yüzeyi |
| rDNA | : Ribozomal Deoksiribonükleik Asit |
| RNAP I | : Ribonükleik Asit Polimeraz I |
| RDS | : Robertsonian Translokasyon Tipi Down Sendromu |
| TÇy | : Toplam Çekirdek Yüzeyi |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Down sendromu (DS) ya da trizomi 21, çok çalışılmış ve iyi bilinen bir sendrom olmasına karşılık, zeka kusuru dahil diğer fenotipik özelliklerini belirleyen etmenler henüz tam olarak belirlenememiştir.

NORs (nucleolus organizer regions = çekirdekçik oluşturan bölgeler), insanda 5 çift akrosantrik kromozomların satellit sapı ya da ikincil boğum denilen bölgelerine yerleşmiş, kromozom başına yaklaşık 40 ardışık gen düşecek şekilde yinelenen rRNA gen familyalarından (rDNA dan) oluşmaktadırlar. Diploid bir hücremizde toplam 400 kadar rRNA geni bulunur. NOR ların oluşturdukları çekirdekçiler, ribozom üreten merkezlerdir.

Erciyes Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yapılan bir seri çalışmalar sonucunda, Down sendromlu bebek/ çocuk lenfositlerinin, hem in vivo hem de in vitro (ekim ortamında), kontrollere göre beklenilenden çok daha fazla NOR alanlarına sahip oldukları gösterilmiştir. Down sendromlu bebekler/8 yaşına kadar olan çocuklar, sanki beklenilenden ve de gerekenden daha fazla ribozom üretir görünmekteydiler.

Bu gözlemler, lenfositlerdeki total RNA içerikleri, hem in vivo hem de in vitro olarak ölçülerek de doğrulanmıştır. Bu bulgulardan hareketle, Down sendromu fenotipinin, gereksiz rRNA/ RNA sentezine dayalı olarak, boşa harcanan enerji (wasted energy) ile açıklanabileceği hipotezi ileri sürülmüştür.

Ancak, bu bulguların tümü de mezoderm kaynaklı hücreler (Periferal kan mononükleer hücreleri = lenfosit ve monositler) kullanılarak elde edilmişlerdir. Mutat DS ise, bireyin hücrelerinin tamamını ilgilendiren bir sendromdur. Zeka kusurundan sorumlu tutulan beyin de ektoderm kaynaklı bir dokudur.

Bu çalışmadaki amaç;

- Beyin gibi ektoderm kaynaklı yanak epitelindeki NOR (rDNA) ifadesinin trizomi 21’li hastalarda artıp artmadığını kontrolleri ile karşılaştırılarak ortaya çıkartılması,
- Bu bulguları daha önceki verilerimizle de birleştirerek, bu hastalardaki zeka kusuru nedenini açıklayan “boşa harcanan enerji” hipotezimizi bir kez daha başka bir dokuda sınanması,
- Artış durumunda da ise hipotezimize yeni bir desteğin bulunmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KROMATİN

Kromatin DNA, histonlar, histon olmayan proteinler ve RNA'dan oluşur. DNA çift sarmallarının histon ve histon olmayan proteinlerle yapılanması sonucu ökaryotlarda oluşan yapılara kromatin denir(1,2).

Nükleozom yapısı DNA'nın histonlarla oluşturduğu yapıdır. Bir nükleozom, histonlar üzerinde DNA çift sarmalının sola dönümlü olarak iki tur yapıp, diğer histon yumağına uzandığı birimdir. Kromatinin rRNA sentezleyen yani aktif bölgelerinde nükleozomik yapı bozulur.

Kromatin maddesi, hematoksilin gibi bazik boyalarla boyanan preparatlarda (dinlenme halindeki bir hücrede) iplikçikler ve taneciklerden oluşmuş bir ağ görünümündedir. Boyalı preparatlarda tanecikli kısımlar koyu, iplikçi kısımlar ise açık renkte görünür. Tanecikli kısımların koyu görünmesinin nedeni, taneciklerin çekirdek içinde yer yer bir araya toplanarakdeğişik şekil ve büyüklükte topluluklar yapmasıdır.

Kromatin yoğunlaşma derecesine göre heterokromatin (condensed chromatin) ve ökromatin (dispersed chromatin) olmak üzere ikiye ayrılır(2)

Heterokromatin (Condensed chromatin); kromatinin interfazda transkripsiyon yapmayan yani inaktif bölgeleri elektron mikroskopta koyuca boyanmış dıkıca paketlenmiş olarak görünürler. Çok sayıdaki kromatin fibrillerinin birbiri ile sıkıca paketlenmesi ile oluşan bu koyu bölgedeki kromatine heterokromatin denmektedir(1,2).

Heterokromatin bölgeler uyarılmamış nükleus(çekirdek) da tüm nükleer hacminin yaklaşık yarısını oluşturur.

Ökromatin (dispersed chromatin); kromatinin transkripsiyon yapan yani aktif bölgeleri olup açık boyanırlar. Bu bölgeler interkromatin bölgeler ya da nükleoplazma olarak da tarif edilebilirler. Kromatin fibrilleri ökromatin bölgede yakın birleşma göstermezler. Bu materyal çekirdekte nispeten dağılmış bir görünüşte olup, çoğu ökaryotik hücrelerde nükleer bölgenin çoğunu oluşturur(1,2). Kromatin maddesinin çekirdek içindeki dağılımı hücreden hücreye farklılık gösterir.

Memelilerde ökromatik bölgelerin replikasyonlarının heterokromatik bölgelere daha önce yapıldığı bilinmektedir. Aktif genler ökromatin içinde bulunurlar. Genetik materyalin yoğunlaşması, aktivitesi ile ilgilidir. Ökromatin içinde yer almak transkripsiyon için zorunlu ama yeterli değildir çünkü ökromatin içindeki sekansların sadece çok küçük bir kısmı sürekli transkripsiyon gösterir.

Heterokromatinin sitolojik ve moleküler yapısı ökromatinden fonksiyonel olarak farklıdır.

2.2. İNSANDA ÇEKİRDEKÇİK (NÜKLEOLUS) YAPISI

Hücre çekirdeği içinde rRNA sentezinden sorumlu bölgeler olan çekirdekçikler, ökaryotik hücrelerin ribozom üreten merkezleridir. rRNA öncül moleküllerinin sentezlendiği ve işlendiği yer olmasının yanı sıra, rRNA öncül molekülleri burada spesifik ribozomal ve non-ribozomal proteinlerle düzenli olarak birleşerek preribozomal bölgeleri oluştururlar (3). Neticede, hemen hemen olgunlaşan ribozomal alt birimler, çekirdekçikten serbest bırakılır ve nükleer por komplekslerinden geçerek protein biyosentezinde önemli rol oynadıkları sitoplazma içinde taşınırlar. Sitoplazmaya ribozomal partiküllerin taşınmasını kolaylaştırmak için çoğu ileri ökaryotik hücre tiplerinde çekirdekçik, nükleer zarın yakınına yerleşmiştir (4).

Çekirdekçiğin durumuna bakılarak, kromatin organizasyonu ve transkripsiyonu arasındaki ilişkiler açıklanabilir. Aynı zamanda çekirdekçik, sitoplazmik yapıların farklılaşmasını düzenlemede de rol oynar.

Çekirdekçik, ileri ökaryotik hücre döngüsü boyunca geniş ölçüde yapısal değişikliklere uğrar. Profazda parçalanır ve iki kardeş hücrenin yeniden şekillenen çekirdeğinde tekrar ortaya çıkar (3).

Bazı faktörlere bağlı olarak bir hücrede çekirdekçik sayısı değişebilir.

- Bir hücrede en fazla gözlenebilen çekirdekçik sayısı, en çok bu hücredeki aktif (rRNA sentezleyen) NORs (nucleolus organizing regions) sayısı kadar olabilir. Bir NOR, belli bir kromozom üstünde yerleşik rDNA bölgesidir.
- Hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak çekirdekçiğin sayısı değişebilir. Uzun süreli interfazda aktif NOR'ların birleşmesi sonucu çekirdekçik sayısı azalabilir ya da önceden inaktif olan NOR'ların etkinleşmesi sonucu artabilir.
- Sık sık meydana gelen mitotik bölünmelerden dolayı çekirdekçik sayısı artabilir.

Çekirdekçiğin yapısı, dıştan içe doğru üç bölümden oluşur (4-6) :

1. **Granüllü bölge (Granular Component, GC) :** Granüllü bölge, rRNA transkriptlerinin olgun bir biçime hazırlandığı bölgedir. Ribonükleer protein partiküllerini içeren çekirdekçiğin en dış çevresindeki bölümdür.
2. **Yoğun İpliksi Bölge (Dense Fibrillar Component, DFC) :** Yoğun ipliksi bölge, RNA sentez bölgesidir. DNA ve RNA'nın yanı sıra, gümüşle boyanabilen proteinleri içeren yoğun boyanan bölgedir. Yoğun ipliksi bölge bazen, ipliksi merkez içine çıkıntılarla intranükleolar bir retikulum oluşturabilir. Yoğun ipliksi bölgeler, yüksek yoğunluklarda ribonükleoproteinleri içerir.
3. **İpliksi Merkez (Fibrillar Center, FC, Core Structure) :** Çekirdekçiğin en iç bölgesi olan ipliksi merkez açık boyanan transkripsiyon bölgesidir. DNA, RNAP I ve diğer proteinleri içerir. Elektron mikroskobu görünümü, genellikle dairesel şekildedir ve çok az RNA içerir. Elektron mikroskobunda görülen interfaz çekirdeğinde, gümüş granüllerin çökmesi en fazla çekirdekçiğin ipliksi merkezi

üzerinde meydana geldiği ileri sürülmektedir (7). rRNA transkripsiyonunun yapıldığı bölge son zamanlarda hala tartışmalı durumdadır. (5,6). Çekirdekçiğin ayrıntılı yapısının bilinmesine karşın moleküler yerleşimlerinin açıklanması henüz net değildir (5).

2.3. RİBOZOM

Ökaryot ribozomları, 40S ve 60S'lik iki alt birimden oluşur. Hücre içindeki sayıları, hücrenin protein sentezleme hızına ve dokudan dokuya değişir.

60S'lik alt birim; 28S, 5.8S ve 5S rRNA ile yaklaşık 45 çeşit proteinden oluşmuştur. 40S'lik alt birim ise 18s'lik bir rRNA ile yaklaşık 30 çeşit proteinden oluşmuştur.

2.4. NOR BÖLGELERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Çekirdekçik oluşturan bölgeler (NOR'lar), insanda bulunan 5 çift akrosentrik kromozomların yani 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozom çiftlerinin ikincil boğumu olarak nitelendirilen satellit saplarında bulunan ribozomal DNA'ları (rDNA) ifade ederler (7-11). NOR'lar, rDNA'nın çok sayıda kopyalarını içeren kromozomal bölgeler olup NOR başına rDNA kopyalarının sayısı farklıdır. rDNA yüksek miktarda guanin ve sitozin içeriğine sahiptir.

rDNA, transkripsiyonel olarak hepsinde aktif olmasa da kısa kollarını yitirmemiş tüm insan akrosentrik kromozomlarında bulunur. Marsupial PtK1 hücrelerinde eğer ki bir NOR, transkripsiyonel olarak aktif değilse, genellikle fakültatif heterokromatin durumunda bulunduğu ileri sürülmektedir (12). Transkripsiyonel olarak aktif olan NOR'lar, inaktif olan NOR'lardan belirli bir uzaklıkta bulunurlar. Çekirdekçik içinde bulunan rDNA, transkripsiyonel olarak aktiftir.

1961'den beri, insanda 10 akrosentrik kromozomun kısa kollarının saplar taşıdığı ve yumru şeklinde satellitleri olduğu kabul edilmektedir. Bu bölgeler çekirdekçiğin yapımında işe karıştıkları için, sitogenetik açıdan öneme sahiptirler.

İnsan hücrelerinin metafazlarında, NOR taşıyan akrosentrik kromozomların kısa kolları, sık sık bir arada bulunurlar. Buna satellit birleşmesi (satellite association) denilir. 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 ileri sürülmüştür (13).

2.5. NOR PROTEİNLERİ

NOR proteinlerinin gümüşe, belirli ilgileri vardır. Asidik şartlar altında bir çok hücrenel protein boyanmadan kalırken, NOR proteinleri, bu koşullarda gümüşü indirgeme yetenekleri sayesinde boyanırlar ve diğer hücrenel proteinlerden ayırt edilmeleri sağlanır.

NOR proteinleri, aktif ribozomal genlerin bir göstergesi sayılırlar. Gümüş boyama ile ortaya çıkarılan AgNOR proteinlerinin miktarının, transkripsiyonel aktivite ve hücre çoğalması ile doğrudan ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (14).

Aktif transkripsiyon ve çoğalma sırasında tanımlanan ana AgNOR proteinleri protein B23 ve nükleolinlerdir.

Nükleolin; insan hücrelerinde 105kDal (kilo Dalton) ağırlığında bir fosfoproteindir. rRNA moleküllerinin transkripsiyonunda önemli rol oynar. %5'den daha az miktarı mitoz sırasında ribozomal genlerle bağlı kalır. Nükleolin yapısal bir fonksiyona da sahiptir.

Protein B23; 38-39 kDal ağırlığında bir fosfoproteindir. Daha çok sitoplazmada bulunur. Öncül ribozomal parçaların organizasyonun son aşamasında görev alırlar.

AgNOR proteinleri, elektron mikroskobu ile özellikle çekirdekçiğin ipliksi merkez ve yoğun ipliksi bölgelerinde bulunurlar. İnterfaz çekirdeğinde granüllü bölgeden dışarı atılırlar. Farklı miktarlardaki AgNOR proteinleri ince bir filament ile oluşan granüllere bağlanırlar (12).

AgNOR proteinlerinin, düzenli olarak hücre çoğalması ve nükleolar aktiviteyi değerlendirmek için kullanıldığı ve kanser hücresinin erken tanısı için bir ölçüt olduğu belirtilmektedir (14,15). Ökaryot hücreler, rRNA sentezini hızlı bir şekilde düzenleyen mekanizmaya sahiptirler. Bu düzenleme, memeli hücreleri temel amino asitlere ihtiyaç duyduğu zaman gözlenir ve mekanizmanın kontrolüne ribonükleoproteinler katılmaktadır (15).

2.6. NOR'LARIN GÜMÜŞ NİTRAT İLE BOYANMASI

İnterfaz ya da mitoz sırasında transkripsiyonel olarak aktif olan NOR'ların yerleşimi, gümüş boyama ile gösterilebilmektedir. Ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel bölgesi ile gümüş boyanırılığı arasında doğrudan ilişki vardır. Ancak mitotik NOR'ların gümüşle boyanabilmesi için, NOR kromatininin hücre döngüsünün bir önceki interfazında transkripsiyonel olarak aktif olması gerektiği ileri sürülmektedir. (7,10,15,16,17)

Gümüş nitrat, 1880'li yılların sonlarından beri sitolojik bir boya olarak kullanılmaktadır (18). Kromozom preparatlarında AgNOR boyama ilk olarak 1920 yılında Carleton tarafından gösterilmiştir (18). Sitogenetik preparatlara AgNOR boyama tekniği, 1975 senesinde Goodpasture ve Bloom tarafından çekirdekçik oluşturan bölgeleri ortaya çıkarmak amacı ile geliştirilmiştir. Bu teknik, 1980'de Howell ve Black tarafından basitleştirilerek ışık ve elektron mikroskobu alanlarına uygulanmıştır (14).

Gümüş boyama tekniği, asidik bir ortamda gümüş nitratın NOR proteinleri tarafından metalik gümüşe indirgenmesine dayanır. NOR boyama DNAaz ya da RNAaz' lardan etkilenmezken, pronaz, tripsin ya da papain gibi proteolitik enzimlerden etkilenmektedir. Bu da bize gümüş nitratı metalik gümüşe indirgeyen asıl maddenin rDNA ya da rRNA olmayıp bu bölgelere özgü NOR proteinleri olduğunu gösterir. Gümüş boyanmaya neden olan materyalin, intarfaz boyunca üretildiği ve profazda NOR'ların etrafında biriktiği ileri sürülmektedir (7).

Çekirdek ekstartklarından elde edilen jel elektroforezinde gümüşe bağlanan proteinlerin bir kısmı gösterilmiştir. Gümüşe proteinlerin bağlanma reaksiyonu sülfidril grupları vasıtasıyla meydana geliyor gibi görülmektedir. rDNA'ların rRNA'lara transkripsiyonunu katalizleyen RNAP- I bu şekilde tanımlanan ilk proteindir (19).

Fosfat grupları da gümüş boyamada işe karışabilmektedir. Gümüşe bağlanan nükleolin (C23) ve B23 iki major AgNOR proteinleridir. C23 ve B23 çekirdekçiğin fosforile edilen ana asidik fosfoproteinleridir. Bu proteinlerin küçük birimleri olan fosfoserin ve fosfotrioinin gümüş boyamada işe karışabilmektedirler (19). Bunun yanı sıra nükleolinin amino terminal bölgesindeki asidik amino asitlerin konsantrasyonu, gümüş iyonlarının indirgenmesinden sorumludur (14).

NOR'ların gümüş boyanırılığı ve satellit birleşme sıklığı arasında güçlü bir pozitif ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Satellit birleşmesinde işe karışan akrosentrik kromozomların materyali hep gümüş pozitifler (13). Satellit birleşmesi, aktif NOR'lar arasında gerçekleşir (15).

NOR boyamanın iki özelliğinden biri, sadece aktif rDNA bölgelerini boyayıp, rRNA sentezlemeyen yani inaktif olan bölgeleri boyamamasıdır. Gümüş boyanırılık için transkripsiyonel aktivitenin gerekli olduğu belirtilmektedir (17).

AgNOR boyama tekniğinin, tümörlerin erken tanısında, kısmi olarak malign tümörlerden benign tümörleri ayırt etmede ve benign tümörün şiddetini belirlemede faydalı bir test haline geldiği ileri sürülmektedir. AgNOR boyama prosedürünün spesifikliği ve kolaylığı bu tekniğin insan patolojisinde, hücre biyolojisinde ve gelişen biyolojide geniş bir kullanım alanı sağladığı belirtilmektedir (14).

2.7. DOWN SENDROMU (TRİZOMİ 21)

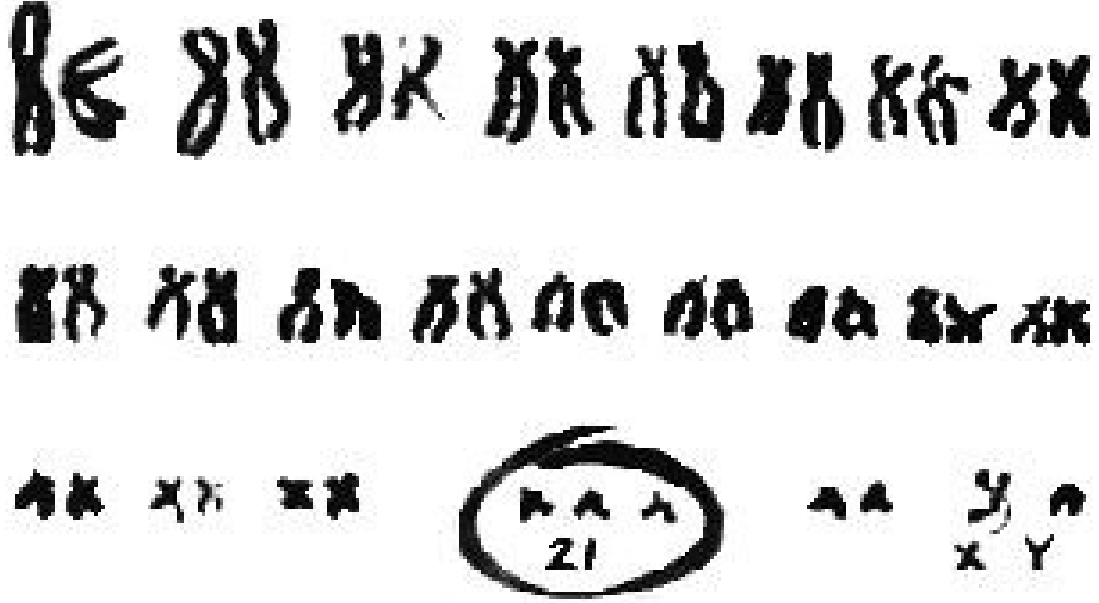
İnsanlarda en yaygın kromozom anomalilerinden biridir.680 canlı doğumda 1 görülür (20). Mayozun birinci ya da ikinci bölünmesinde meydana gelen ayrılmama ya da anafazda geri kalmadan kaynaklanır. Hastaların mental gerilik ve tipik yüz görünümüne sahip olmaları belirgin özellikleridir. .

Down sendromlular, sitogenetik olarak 3 çeşittirler.

- 1. Mozaik tip Trizomi 21 :** Bu hastaların bazı hücreleri normal kromozom kuruluşuna sahipken, bazı hücreleri de 3 tane 21. kromozoma sahiptir. Yani hücrelerden bir kısmı 46, bir kısmı da 47 kromozomludur. Bu hastalığa sahip bireylerin % 1inde görülür (21).
- 2. Translokasyon tipi Trizomi 21:** 21. Kromozomun bir kopyası diğer akrosentrik kromozomlara (D ve G grubu) transloke durumdadır. Yani 21. Kromozomun uzun kolu

(21q) diğerk bir akosentrik kromozomun uzun kolu, sentromerde birleşmiş, ve kısa kollar da kaybolmuştur. Bu translokasyon Robertsonian tipi translokasyon olarak da bilinir. En çok 14. ve 21. kromozom arasında görülür. Translokasyon tipi trizomi 21, bu hastaların %1-4'inde görülür (21).

3. **Klasik tip Trizomi 21** : 21. Kromozomdan 3 tane bulunur (Resim 1). Standart tip Trizomi 21 bu hastalığa sahip bireylerin %95'inde görülür (21).



Resim 2.1. Klasik tip Trizomi 21 olan bir bireyin kromozomları

Down sendromlu çocukların birtakım fiziksel özellikleri vardır (Resim 2). Down sendromlu çocukların büyük çoğunluğu bu özelliklerin sadece bir kısmına sahiptirler.

Bu fiziksel özellikler arasında;

- ✓ Göz kapağı üzerinde gözlere badem şeklini veren epicantus derisi,
- ✓ Burun köprüsü tam oluşmadığından küçük ve basık bir burun,
- ✓ Normal gelişime göre daha küçük bir baş çevresi,
- ✓ Küçük kulaklar,
- ✓ Küçük bir ağız,
- ✓ Ağızın küçüklüğünden ötürü sarkma eğilimi gösteren bir dil,

- ✓ Küçük parmağı hafifçe içe kıvrık el,
- ✓ Bir veya iki elinde avuç içini ortadan ikiye bölen düz bir çizgi,
- ✓ Ayak başparmağı ile yanındaki parmak arasında derin bir çizgi,
- ✓ Kas gevşekliği,
- ✓ Yavaş refleksler, sayılabilir



Resim 2.2. Belirli fiziksel özelliklere sahip down sendromlu bir çocuk

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇLER

Demirbaş Malzemeler

1. Etüv (Heto/Cell Hause 200)
2. Su Banyosu (Termal)
3. Mikroskop (Nikon Labophot 2, Olympus model CHK)
4. Fotomikroskop (Olympus)
5. Manyetik Karıştırıcı (Janke&Kunkel)
6. Hassas Terazi (Kern S 2000)
7. Derin Dondurucu (Uğur Derby)
8. Buzdolabı (Arçelik)
9. Zaman Ayarlayıcı
10. Mikroskop ataşmanlı video kamera (Sony CCD-IRIS siyah-beyaz video kamera SSC-M370CE)
11. Bilgisayar (Escort Pentium II)
12. Bilgisayar yazıcısı (Epson Stylus Color 640)
13. Kamera adaptör (Sony YS-W130p)

Sarf Malzemeler

1. Metanol (Merck, 502K5275408)

2. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
3. Etanol (Merck,K21078586)
4. Alkol (%96 saf alkol, Tekel)
5. AgNO₃ (Carlo Erba, 320904)
6. KH₂PO₄ (Merck, 9021622)
7. Na₂HPO₄.H₂O (Merck, K1690176)
8. Giemsa (Merck, 540040512)
9. Formik asit (Merck)
10. HCl
11. Jelatin (Merck, 5214525)
12. Distile Su/ Bidistile Su
13. Lamel yapıştırıcı (Entellan, Merck 640171987)
14. İnversiyon yağı (Merck, 09403569)
15. Ksilol (Merck, 207K03755385)
16. Konik tabanlı 10 ml'lik steril tüpü
17. Filtre kağıdı (Whatman Fitler Papers 25 mm)
18. Enjektör
19. Pastör Pipeti
20. Lam (Objekttrager)
21. Lamel (Menzel – Glasser 24*32 mm)
22. Çeşitli cam laboratuvar malzemesi
23. Pastör pipet puarı, 5 ml
24. Alüminyum folyo

3.2 YÖNTEM

Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvar'ında yapılmıştır. Araştırma 0-8 yaş arası 22 down sendromlu hasta 10 sağlıklı kontrol üzerinde yapılmıştır.

3.2.1 Örneklerin Alınması

Bebeklerden / çocuklardan yanak epitel döküntü hücreleri törpülü uçlu temiz ahşap bağetlerle alınmıştır. Alınan örnekler lam üzerine dikkatli bir şekilde yayılmıştır. Uygulamanın ileri aşamalarında çıkması olası problemler göz önünde tutularak, bir kişiden çok sayıda örnek alınmıştır. Bu sayede uygulamalar, gerekli durumlarda aynı örnek üzerinde birkaç kez tekrar edilebilmiştir.

Karşılaşılabilecek kirlilik durumlarını en aza indirmek için bebeklerin / çocukların, örnekler alınmadan önce ağızlarını temizlemeleri sağlanmaya çalışılmıştır. Fakat yaşları çok küçük olan birçok hasta ve kontrollerde temizleme işlemi çok başarılı olmamıştır.

Sonuç olarak örneklerin alınması yöntemi çok basit bir uygulama olup, herhangi tıbbi/ etik bir sorun yaratmamıştır.

3.2.2 Örneklerin Kurutulması

Lam üzerine yayma yöntemi ile hazırlanan preparatlar, oda sıcaklığında 30 dakika kurutma işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.3 Örneklerin Fiksasyonu

Bebeklerden/çocuklardan alınan yanak epitel döküntü hücrelerinde, AgNOR boyamasına en uygun fiksasyon yönteminin bulunması için denemeler yapılmıştır.

1.Deneme: Fiksatif çözeltisi (3:1 oranında metanol:asetik asit) ile fiksasyon yapılmıştır. Fiksatif çözelti, kullanılmadan en fazla 30 dakika önce hazırlanmış -8 °C ye konulmuş ve soğuk olarak kullanılmıştır.

Fiksatif çözelti ile fiksasyonu yapılan örnekler, AgNOR boyamadan sonra koordinatları belirlenerek incelenmiş ve daha sonraki denemelerle karşılaştırılmak üzere sonuçlar not edilmiştir.

2.Deneme: Fiksatif çözeltisi (3 metanol:1 asetik asit) içindeki asit miktarının AgNOR boyama sonrasında oluşan istenmeyen kirlilikleri arttırabileceği düşünülmüş, ve fiksasyon

için sadece metanol kullanılmıştır. Sonuçlar AgNOR boyamadan sonra koordinatları belirlenerek incelenmiş ve sonuçlar not edilmiştir.

Aynı şartlar altında aynı kişilerden alınan örneklerin ayrı ayrı fiksatif çözelti ve metanol ile fikse edildikten sonraki AgNOR boyama kalitesi karşılaştırılmıştır. Metanol ile yapılan 2. denemede NOR alanlarının boyanma kalitesine olumlu etki edecek ve istenmeyen kirlilikleri azaltacak bir sonuca ulaşamamıştır.

3.2.4 Kirliliği Azaltmak İçin HCl Yönteminin Denenmesi

Ağız içinde hem besin artıkları hem hücre bulunacağından preparatlar daha önce çalışması yapılmış lenfositlere göre daha kirlidir. Bu yöntemin denenmesindeki amaç, preparatlarda var olan kirliliklerin bu yöntem ile azalıp azalmadığının kontrol edilmesidir.

1 N HCl Hazırlanması

8 ml. HCl, 100 ml. Distile suya tamamlanarak 1 N HCl hazırlanmıştır. (Biraz distile su üstüne 8 ml HCl eklendi, 100 ml distile suya tamamlandı.)

Yöntem

1. 1 N HCl içerisinde oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi
2. 1 N HCl içerisinde 60 °C'de 6 dakika bekletildi
3. 1 N HCl içerisinde oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi
4. Distile su ile yıkandı (2 kere)

Aynı koşullarda aynı kişilerden alınmış alınana ve aynı yöntemle fiksasyonu yapılan örneklerin HCl yöntemi uygulandıktan sonraki AgNOR boyama kalitesiyle HCl yöntemi uygulanmadan önceki AgNOR boyama kalitesi karşılaştırıldı.

Sonuç; var olan kirliliklerin bu yöntem ile boyama kalitesini arttıracak derecede azalmadığı görülmüştür. Kirliliği istenilen düzeyde azaltmadığı ve AgNOR alanının/ alanlarının bu yöntem ile kalitesinin bozulması ihtimali olduğu göz önüne alınarak bu yöntem kullanılmamıştır.

3.2.5 NOR Boyama

Kullanılan Çözeltiler

%50'lik AgNO₃ çözeltisi (ağırlık/ağırlık olarak ~ %33'lük)

1 g. AgNO₃'ün 2 ml. Bidistile su içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti +4 °C'de ve karanlıkta saklanmıştır.

%1'lik Formik Asit çözeltisi

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

%2'lik jelatinli formik asit çözeltisi

Oda sıcaklığında 98 ml. %1'lik formik asit içinde 2g. jelatinin çözülmesi ile elde edilmiştir. Elde edilen karışım filtre kâğıdından süzölmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Gümüş boyama çözeltisi

%50'lik AgNO₃'ten 1 ml.(2 hacim), %2'lik jelatinli formik asitten 0,5 ml. (1 hacim) alınarak ışık görmeyen etrafı alüminyum folyo ile kaplanmış bir tüp içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır.

Gümüş boyama solüsyonu her kullanımda yeniden hazırlanmıştır.

NOR Boyama İşlemi

Lenfositler için standardizasyonu yapılan NOR boyama işlemi denenmiştir. 1999 yılında laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sonucunda 36 saatlik NOR boyama işlemi 15 dakikalık bir süreye indirgenmiştir.

Bebeklerden / çocuklardan alınan yanak epitel döküntü hücrelerine modifiye edilen standart NOR boyama işlemi yapılmıştır. Alınan örnekler lam üzerine yayıldıktan sonra kurutma ve fiksasyon işlemleri yapılmıştır. Elde edilen preparatlar, içinde distile su ile ıslatılmış kurutma kağıdının bulunduğu petri kabına yerleştirilmiştir. Preparatların üzerine %50'lik AgNO₃ ve jelatinli formik asit karışımından elde edilen gümüş boyama

çözeltisi pastör pipeti ile 3-4 damla damlatılmış ve üzerleri lamel ile kapatılmıştır. Daha sonra hızlı bir şekilde petri kabının kapağı kapatılarak etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılıp 37 C'deki etüvde 15 dakika bekletilmiştir. 15. dakikanın

sonunda etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller düşünceye kadar distile su ile yıkanmıştır.

Epitel hücrelerinde hedeflenen en kaliteli NOR boyamayı elde etmek için preparatların 37 C'de etüvde kalma süreleri üzerine denemeler yapılmıştır. 10 dakikadan 20 dakikaya kadar 37 C'de etüvde kalma süreleri ve sonucunda NOR boyama kaliteleri değerlendirilmiştir. Epitel hücreleri için de en uygun sürenin lenfositlerde olduğu gibi 15 dakika olduğu belirlenmiştir.

3.2.6 NOR Boyama Sonrası Giemsa Boyama İşlemi

%2'lik Giemsa Cözeltisi

KH₂PO₄ çözeltisinden 49 ml., Na₂HPO₄ çözeltisinden 51 ml. alınarak elde edilen 100 ml.lik çözeltinin 2 ml. si atılıp üzerine 2 ml. giemsa eklenip kurutma kağıdı ile süzülerek hazırlanmıştır.

Lenfositler için standardizasyonu yapılan NOR boyama işleminin devamında olduğu gibi giemsa boyası denenmiştir. NOR alanlarının giemسادan önce ve sonra koordinatları alınarak gözlemler yapılmıştır. Boyamadan sonra NOR alanlarının daha belirgin görüldüğü ama bununla birlikte bu çalışmanın en temel sorunu olan kirlilik alanlarını da çoğalttığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışması yapılan preparatlara NOR boyamadan sonra giemsa uygulanmamıştır.

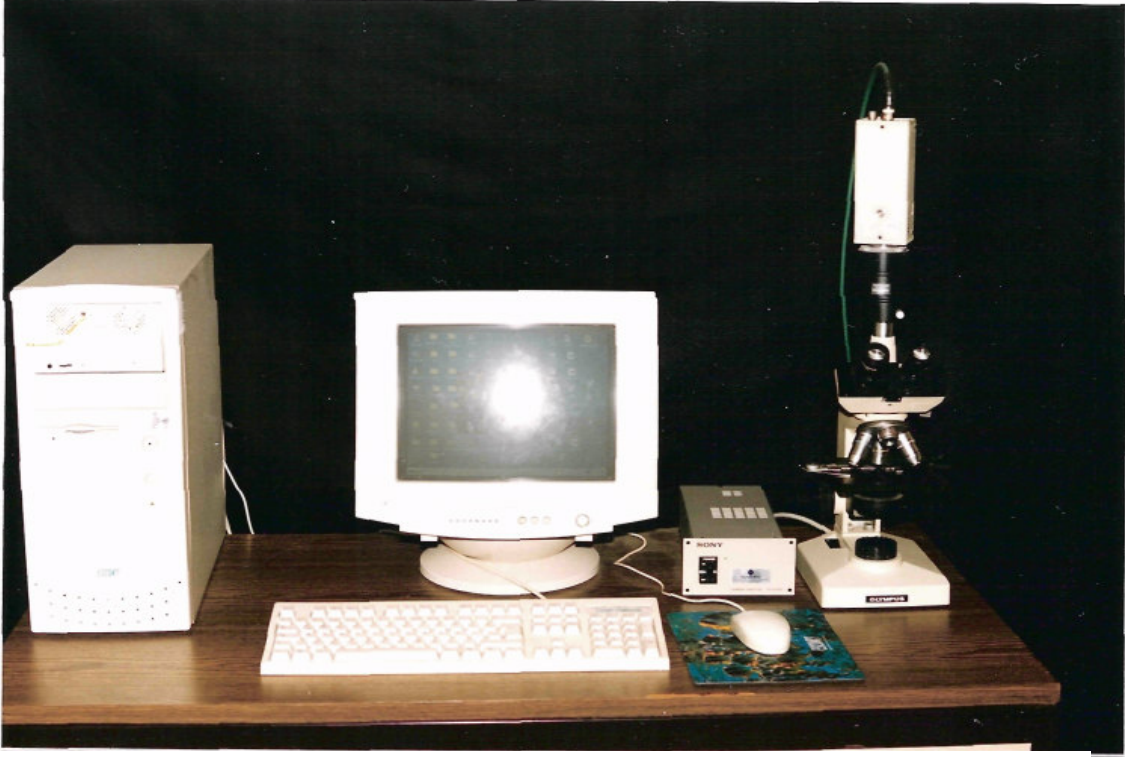
3.2.7 Hasta ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi

Down sendromu şüphesi olan bebeklerin / çocukların Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi hasta kayıt dosyaları incelenmiştir. Ancak down sendromu olduğu bu kayıtlarda kesinlik kazanan bebeklerin / çocukların örnekleri alınmıştır. Belirli bir yaş aralığından oluşan hasta listesine göre, aynı yaş aralıklarında olan sağlıklı bebek ya da çocuklardan kontrol grubunu oluşturmak üzere örnekler alınmıştır.

3.2.8 Bilgisayarlı Ölçüm İşlemleri

Görüntülerin elde edilmesi

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



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

Görüntülerin Standardizasyonu

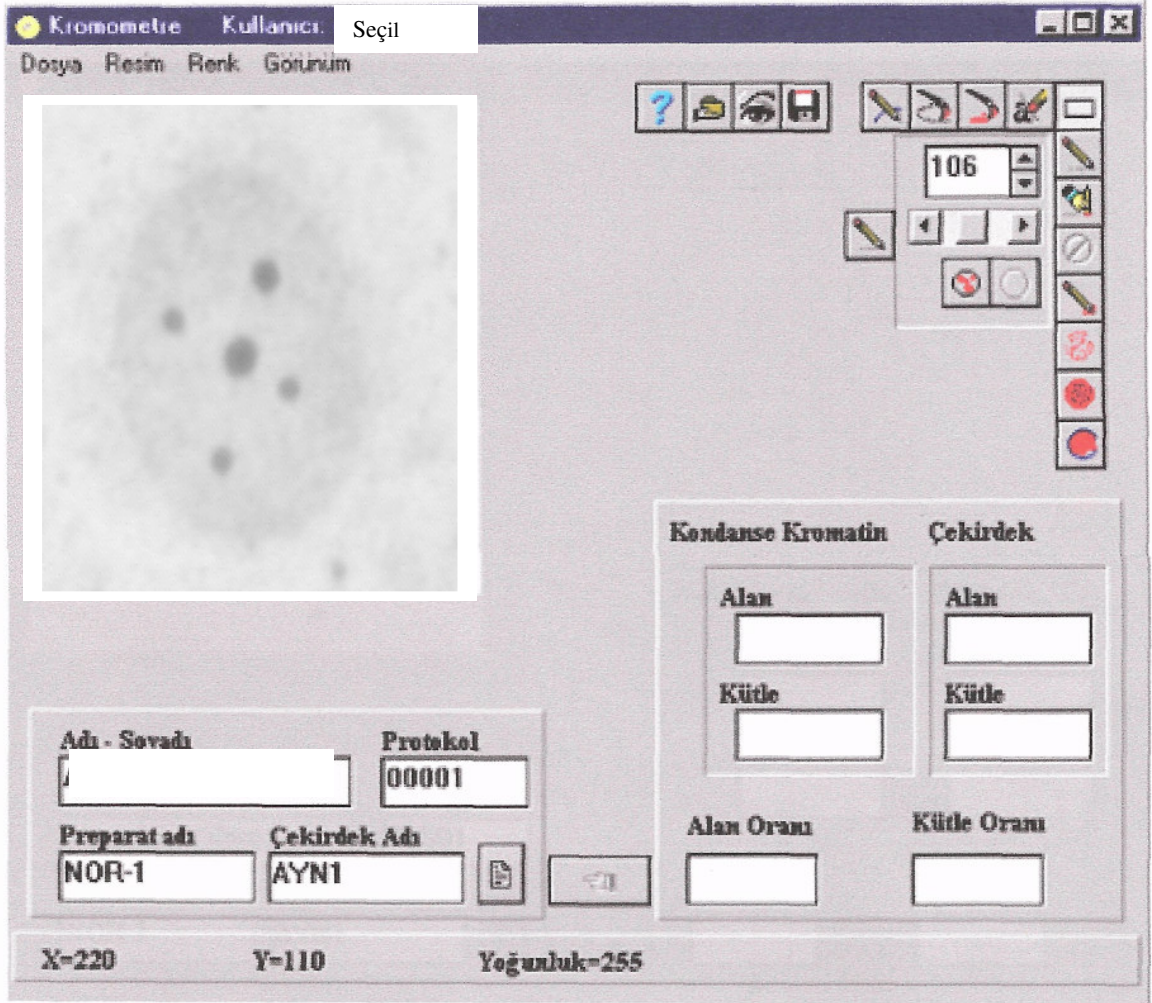
Görüntülerin analizi için Delphi dilinde yazılan bir bilgisayar programı kullanılmıştır. Analiz işlemine başlamadan önce elde edilen resimlerdeki ışık yoğunluğunun birbirlerinden farklı olduğu göz önünde bulundurularak görüntü yoğunluğunun standardizasyonu için eşitlik 3.1 uygun bir algoritmayla resim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

$$Ps = [(Po - Pmin) / (Pmax - Pmin)] \times 255 \quad 3.1$$

Eşitlikte Ps noktanın standardize edilmiş değerini, Po noktanın asıl değerini, Pmax resim üzerine en yüksek parlaklık değerine sahip noktanın değerini, Pmin 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 verilmiştir.



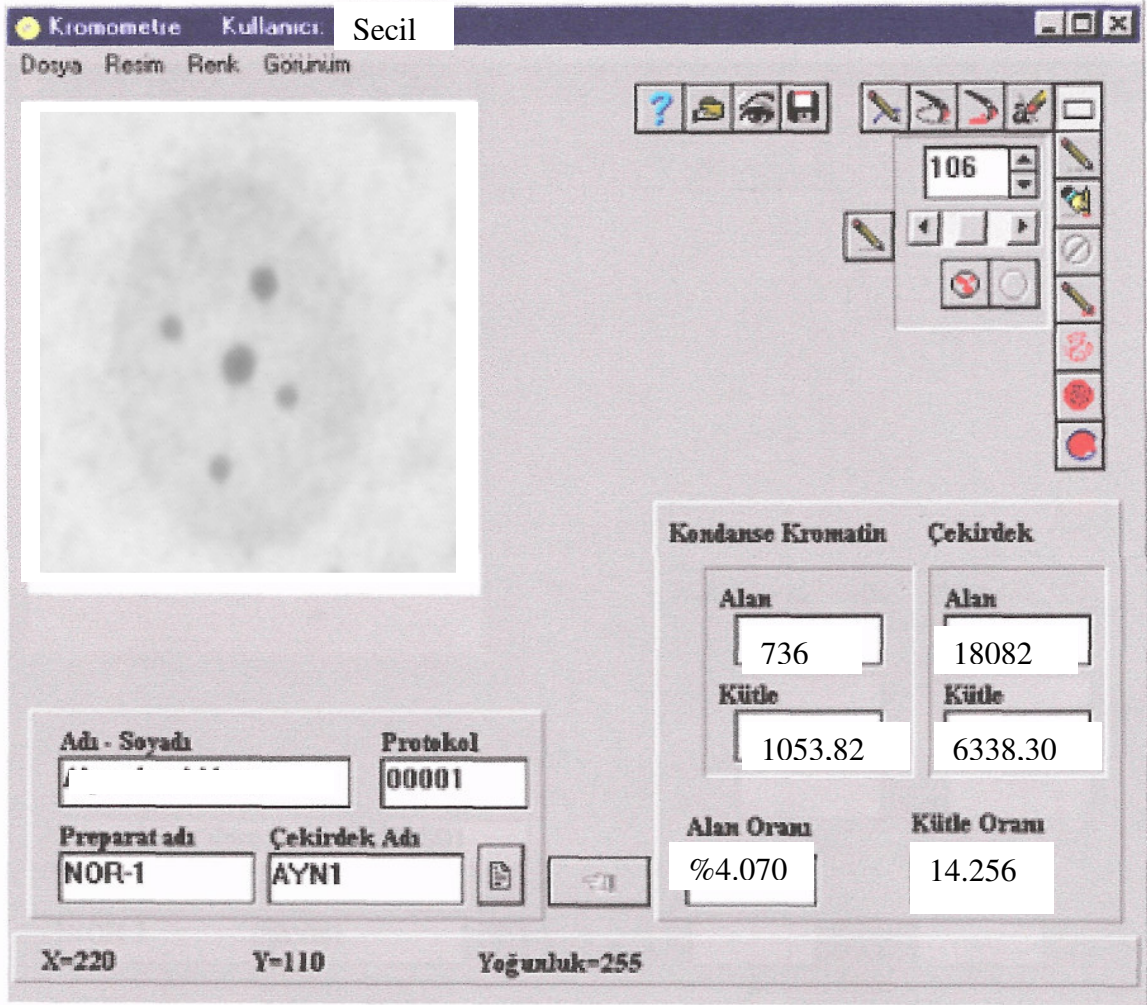
Resim 3.2. Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek olan epitel hücre çekirdeği

a) Kondanse Bölgelerin Belirlenmesi : Analiz programı yardımıyla kondanse kromatin içeren bölgelerin seçimi için programa bir eşik değeri girilerek bu eşik şiddetine uygun bir şekilde çevresindeki noktalardan daha yoğun olarak ayrılan noktaların belirlenmesi sağlanmıştır. Bu yolla seçilen bölgeler dışında kondanse kromatin bölgesi olduğu

düşünülen bölgeler ise programdaki çeşitli araçlar sayesinde seçime dahil edilmiş veya fazla seçilmiş olan bölgeler seçimin dışımda bırakılmıştır. Kondanse kromatin bölgelerinin belirlenmesinde bilgisayar programı yol gösterici olarak kabul edilip analiz yapan kişinin kararları esas alınmıştır.

Daha sonra belirlenen bu kondanse kromatin bölgeleri hesaplanarak, çekirdek alanının belirlenmesine geçilmiştir.

b)Çekirdek Alanının Belirlenmesi : Çekirdek alanının belirlenmesi için de kondanse kromatin 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 3.3’de çekirdek ve kondanse kromatin bölgeleri belirlenmiş bir epitelyum hücre çekirdeği gösterilmektedir.



Resim 3.3. Çekirdek ve kondanse kromatin bölgeleri belirlenmiş bir epitel hücre çekirdeği

c) Parametrelerin Hesaplanması: Çalışmamızda bu ölçümlerin parametresi olarak, kondanse kromatin yüzey alanının bütün çekirdek yüzey alanına oranı kullanılmıştır. Bu parametrenin hesaplanması için kullandığımız bilgisayar programı sayesinde öncelikle kondanse kromatin bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı ve çekirdek bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı hesaplanarak, içerisine kondanse kromatin bölgesinin de dahil olduğu çekirdek alanına göre kondanse kromatin alanının yüzde oranı hesaplanmıştır.

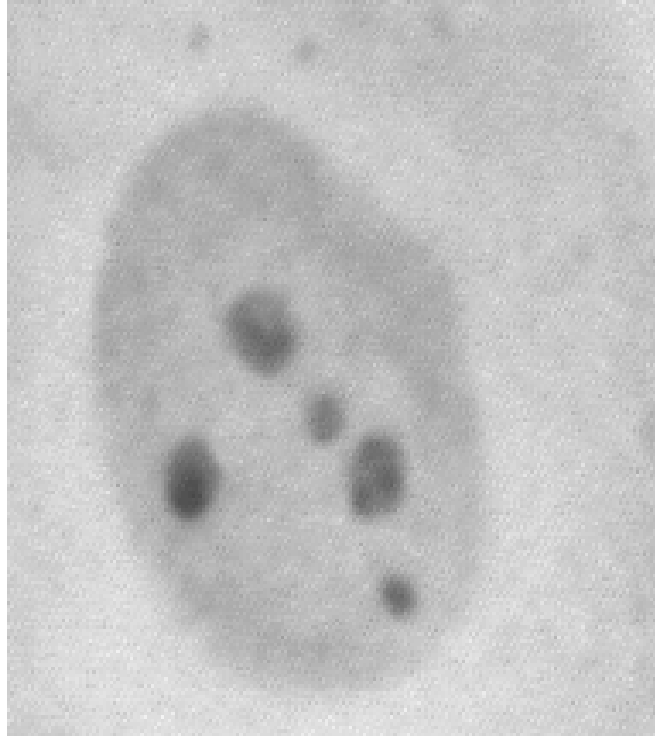
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Down sendromlu hasta ve kontrollerinin NOR alanı (NORa)/ Toplam çekirdek alanı (TÇa) oranları arasındaki farklılığı test etmek için Mann-Whitney \mathcal{U} testi kullanıldı.

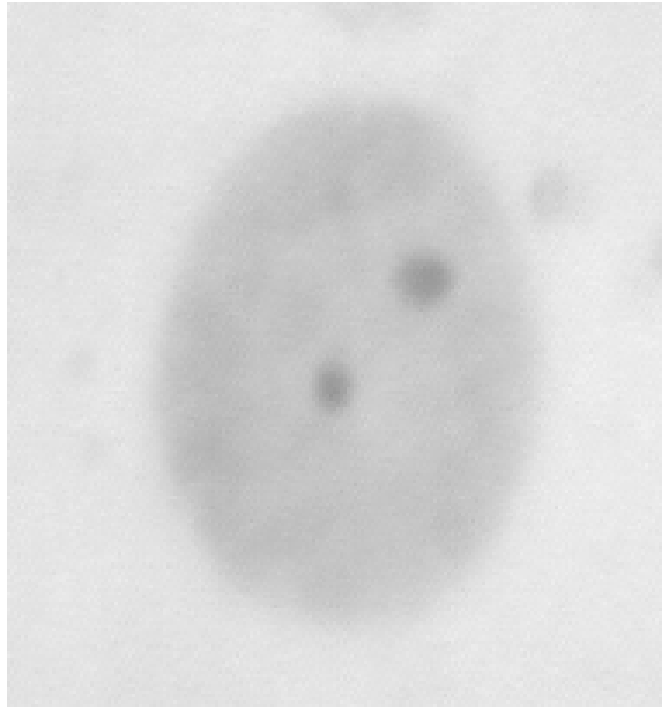
4. BULGULAR

1999 yılında laboratuvarımızda lenfositler için yapılan AgNOR boyama yönteminden yola çıkılarak, yanak epitel döküntü hücreleri için AgNOR boyama optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Uygulamaların her aşamasında yapılan birçok denemler sonucunda yanak epitel hücreleri için en kullanışlı AgNOR boyama yöntemi elde edilmiş ve uygulanmıştır. Denenen parametreler arasında boyama süresi, sıcaklık, preparatların boyama öncesindeki temizleme işlemleri sayılabilir.

Çalışmalarımız sırasında karşılaştığımız en temel sorun, yanak epitel döküntü hücrelerinde var olan kirlilik (besin artıkları, ağız florasına ait bakteriler, deskame olmuş ölü hücre kalıntıları...) ve bu parçacıkların AgNOR boyama kalitesini bozmasıydı. Bunu önlemenin en kestirme yolu, örnek alınmadan önce ağız içinin temiz su ile çalkalanıp yıkanmasıydı. Ancak, özellikle bebeklerde, ağzın yıkanması sorun olmuş, çoğu kez de başarısız olmuştur. Bu nedenle, 30 Down Sendromlu hastadan aldığımız örnekler içerisinde, istediğimiz temizlik düzeyinde olan 22 hastaya ait preparatlar üzerinden ölçümler yapılmıştır. 22 Down Sendromlu hastanın ve aynı yaş grubundan 10 sağlıklı kontrolün yanak epitel döküntü hücrelerinden elde edilen ve gümüş nitrat ($AgNO_3$) ile boyanan çekirdeklerinin fotoğrafları çekilmiştir. Resim 4.1'de Down Sendromlu bir hastanın, Resim 4.2'de de sağlıklı bir kontrolün, AgNOR boyama uygulanmış yanak epitel hücresine ait çekirdekteki NOR bölgeleri gösterilmiştir.



Resim 4.1. Down Sendromlu bir hastanın Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri



Resim 4.2. Sağlıklı bir kontrolün Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri

Çalışmamızda 22 Down Sendromlu ve 10 sağlıklı kontrolün yanak epitel hücre çekirdeklerinde NOR alanı (NORa) / Toplam çekirdek alanı (TÇa) oranı bulunarak, hasta-kontrol değerleri olarak kendi aralarında karşılaştırılmıştır.

22 Down Sendromlu hastaların her birinden 50 yanak epitel hücre çekirdeği ölçülmüştür. 10 sağlıklı kontrolün her birinden de ortalama 50 yanak epitel hücre çekirdeği ölçülmüştür. (kirlilikten dolayı kontrollerin bir tanesinde 30 tane yanak epitel hücre çekirdeği ölçülebilmektedir. Bu kontrol, tabloda (*) işareti ile belirtilmiştir). DS hastaların ve sağlıklı kontrollerin yanak epitel hücre çekirdeklerinin bilgisayarlı ölçümü sonucu elde edilen NORa/TÇa oranı değerleri Tablo 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Down sendromlu 22 hastanın ölçülen NORa/TÇa oranı değerleri

| Hasta adı | Yaşı (ay) | Cinsiyeti | NORa/TÇa ± SD değeri |
|-----------|-----------|-----------|----------------------|
| 1) ST | 7 | E | 3.26±0.99 |
| 2)Sİ | 4 | K | 4.00±1.02 |
| 3)MY | 12 | E | 4.75± 1.16 |
| 4)GS | 30 | K | 3.85± 0.80 |
| 5)ND | 18 | K | 4.78± 1.00 |
| 6)SA | 18 | E | 5.18 ±1.18 |
| 7)İK | 6 | E | 3.95± 0.70 |
| 8)HY | 12 | E | 4.41± 0.68 |
| 9) HS | 42 | K | 4.35± 0.93 |
| 10)AK | 8 | E | 4.15± 0.63 |
| 11)YB | 4 | E | 3.58± 0.64 |
| 12)AU | 18 | E | 3.83± 0.91 |
| 13)BB | 12 | E | 3.55± 0.82 |
| 14)ZK | 8 | K | 4.38± 0.95 |
| 15)YK | 8 | K | 4.36 ± 1.07 |

Tablo 4.1. ‘in devamı

| Hasta adı | Yaşı (ay) | Cinsiyeti | NORa/TÇa ± SD değeri |
|-------------------------------------|-----------|-----------|----------------------|
| 16)NY | 30 | K | 5.82± 1.12 |
| 17)BY | 54 | K | 3.28± 0.83 |
| 18)AG | 96 | E | 2.93± 0.86 |
| 19)YT | 18 | E | 4.29± 1.24 |
| 20)TA | 60 | E | 4.16± 1.19 |
| 21)AS | 2 | E | 2.98 ±0.83 |
| 22)EA | 4 | K | 4.39 ±1.05 |
| Genel Ortalama: 21.41 ±23.17 | | | 4.08±1.16 |

NORa/TÇa: Kondanse kromatin yüzeyinin toplam çekirdek yüzeyine oranı

Tablo 4.2. Sağlıklı 10 kontrolün ölçülen NORa/TÇa oranı değerleri

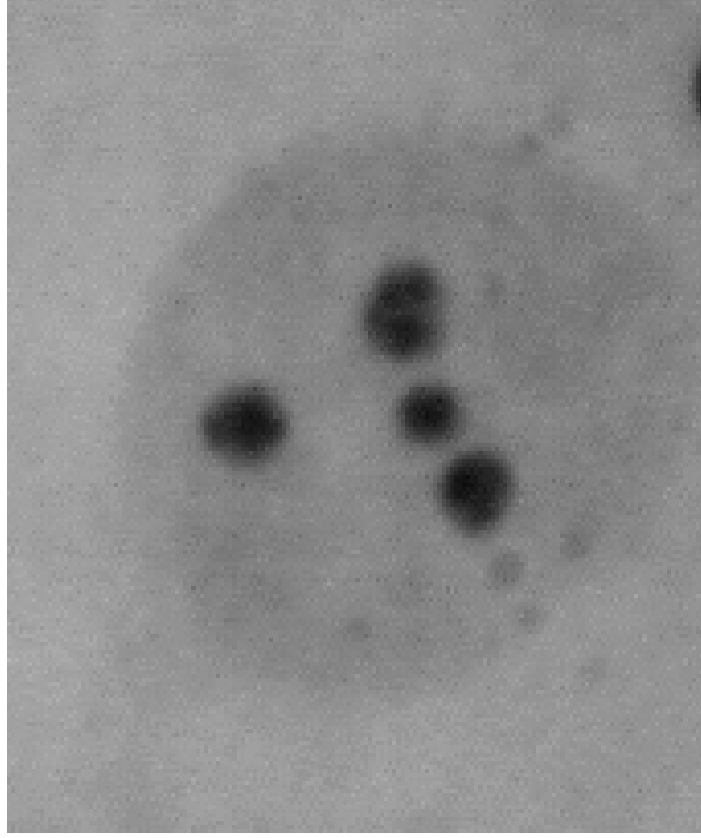
| Kontrol adı | Yaşı (ay) | Cinsiyeti | NORa/TÇa ± SD |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-------------------|
| 1)EA | 8 | E | 2.64± 0.68 |
| 2)SK | 3 | E | 1.95± 0.58 |
| 3)İC | 2 | E | 1.87 ±0.56 |
| 4)KB | 12 | K | 2.26± 0.53 |
| 5)AA | 5 | E | 2.18 ±0.52 |
| 6)TK | 7 | K | 2.03± 0.47 |
| 7)MK | 54 | E | 2.74± 0.68 |
| 8)İÜ | 18 | K | 1.93± 0.44 |
| 9)RY* | 24 | K | 2.28± 0.61 |
| 10)HT | 8 | K | 2.13± 0.41 |
| Genel Ortalama: 14.10 ± 15.59 | | | 2.20± 0.62 |

NORa/TÇa: Kondanse kromatin alanının. toplam çekirdek alanına oranı.

SD: Standart sapma.

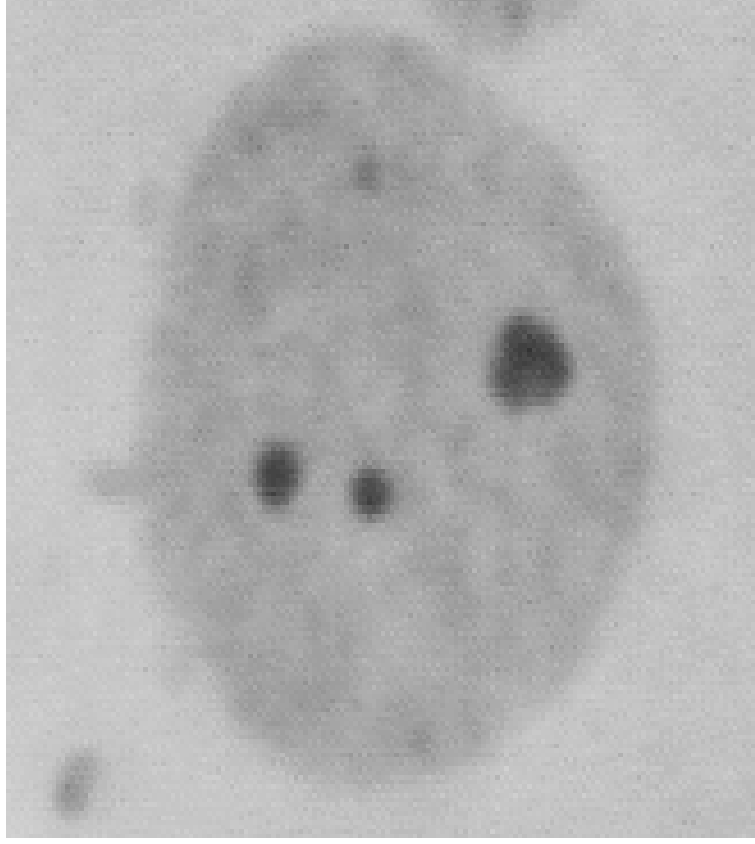
(*) : Bu bireyden. 30 hücrenin NORa/TÇa değerleri ölçülebilmştir.

DS'lu hastalarda yapılan ölçümler sonucunda en yüksek değer 16)NY'de $NORa/T\check{C}a=5.82$ olarak bulunmuştur. Bu hastaya ait NOR alanlarının gösterildiği örnek bir epitel hücre çekirdeği fotoğrafı Resim 4.3'de gösterilmiştir.



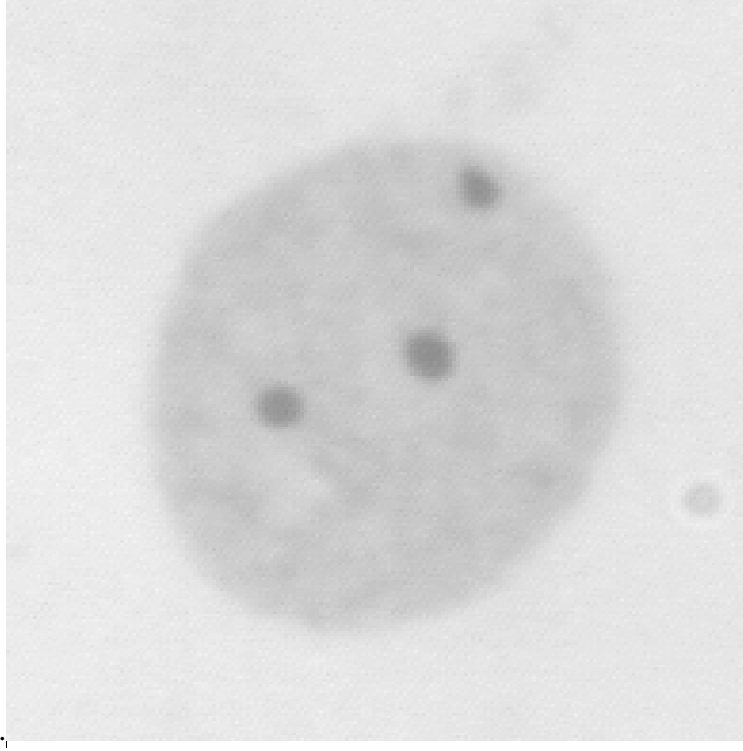
Resim 4.3. Down Sendromlu 17)NY'nin Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri

DS'lu hastalarda yapılan ölçümler sonucunda en düşük değer 18)AG'de $NORa/T\check{C}a=2.93$ olarak bulunmuştur. Bu hastaya ait NOR alanlarının gösterildiği örnek bir epitel hücre çekirdeği fotoğrafı Resim 4.4'de gösterilmiştir.



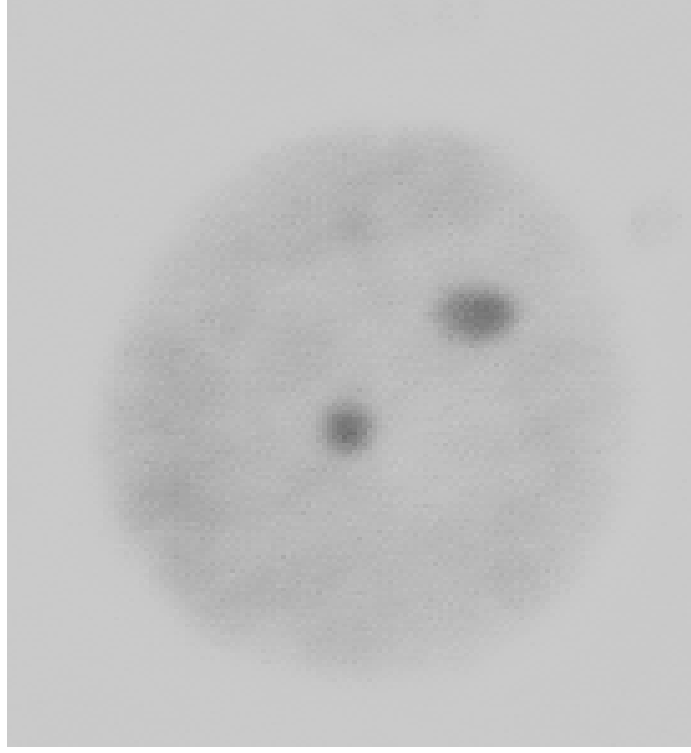
Resim 4.4. Down Sendromlu 18)AG'nin Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri

Sağlıklı kontrollerde yapılan ölçümler sonucunda en yüksek değer 7)MK'da $NORa/TCa=2.74$ olarak bulunmuştur. Bu kontrole ait NOR alanlarının gösterildiği örnek bir epitel hücre çekirdeği fotoğrafı Resim 4.5'de gösterilmiştir



Resim 4.5. Sağlıklı kontrollerden 7)MK'nın Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri

Sağlıklı kontrollerde yapılan ölçümler sonucunda en düşük değer 3) İC'de $NORa/TÇa=1.87$ olarak bulunmuştur. Bu kontrole ait NOR alanlarının gösterildiği örnek bir epitel hücre çekirdeği fotoğrafı Resim 4.6'da gösterilmiştir



Resim 4.6. Sağlıklı kontollerden 3)İC'nin Ag-NOR boyama uygulanmış yanak epitel hücre çekirdeğindeki NOR bölgeleri

Yapılan ölçümler sonucunda en büyük standart sapma değeri Down Sendromlu hastalar içinde 6)SA'da $SD=1.18$ olarak bulunmuştur. En küçük standart sapma değeri Down Sendromlu hastalar içinde 10)AK'da $SD=0.63$ olarak bulunmuştur.

DS'lu ve sağlıklı bireylerin her birinden 50 yanak epitel hücresi değerlendirilerek her bireye ait bir tek NORs alanı/total çekirdek alanı oranı ($NORa/TÇa$) ortalaması bulunup yaş ve cinsiyet belirteçlerinden sonra isminin karşısına yazılmıştır. Bu sonuçlar Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İki ortalamanın eşitlik/farklılık testi Down Sendromlu hastaların $NORa/TÇa$ değerlerinin sağlıklı kontrol grubunun $NORa/TÇa$ değerinden anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir: ($p<0.001$).

Down Sendromlu hastaların $NORa/TÇa$ değerleri ve yaşları arasındaki ilişki test edildi. Down Sendromlu hastaların $NORa/TÇa$ değerleri ve yaşları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,360$ – R square= $0,042$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Down sendromu (DS) fenotipinin, insan 21. kromozomu (HC21) üstünde bulunan bazı genlerin fazladan ifadesinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (22). Gerçekten de 3'cü bir 21. kromozomun varlığı nedeniyle, fazladan gen yüklenmesi sonucunda ortaya çıkan aşırı gen ifadeleri, DS fenotipini açıklayıcı merkezi hipotez olarak değerlendirilmiştir (23,24). Ne ki, +21. kromozom üstünde bulunan tüm genler, beklenen % 50 ifade artışını göstermemektedirler (24,25). Aynı durum DS nun fare modeli için de geçerlidir (22, 26). Down sendromluların yaşamlarının ilk evrelerinde, 21. kromozomca kodlanan bazı proteinlerin, beyin dokularında aşırı ifade olmamaları, DS fenotipinin basit bir gen- dozaj hipotezi ile açıklanamayacağını işaret etmektedir (24, 25, 27). İleri sürülen başka bir açıklama şekli de 21. kromozomun dışındaki bazı genlerin devreye girerek başka genleri ya da bu genlerin ürünlerini doğrudan ya da dolaylı olarak etkilemeleridir (30). Ancak, bilinmezlerle dolu böyle bir önerinin, hipotez olup olamayacağı da tartışmalıdır. Çünkü hipotezler, belli verilere dayanılarak ortaya konurlar. Bu öneri ise, somut verilerden yoksun olarak ileri sürülmektedir.

Bizim DS fenotipini açıklayan boşa harcanan enerji (wasted energy) hipotezimiz, ise, somut verilere dayanmaktadır: DS bebek/çocukların fitohemaglütinin (FHE) ile uyarılmış lenfositlerinin AgNOR ile boyanan akrosentrik kromozom sayıları (aktif rDNA ları), sağlıklı kontrollerinkinden fazla bulunmuştur (29,30). Aynı durum interfaz AgNOR ları için de geçerlidir. DS luların, hem FHE ile uyarılmamış, in vitro lenfositleri (31) hem de 72 saat boyunca uyarılmış lenfositleri (32), çekirdeklerinde sağlıklı kontrollerine göre daha fazla AgNOR alanı göstermektedirler. Ayrıca bu hastalar, NORs ifadesi kontrollerini de sağlıklı kontrolleri gibi yapamamaktadırlar. Lenfositlerin çoğalma ortamındaki FHE konsantrasyonu arttıkça, buna koşut olarak DS lenfositlerindeki AgNOR+ kromozom sayısı (33) ve interfazdaki AgNOR alanı da artmaktadır (32). Sağlıklı kontrollerde böyle bir artışa rastlanmamaktadır (32,33).

Ne var ki AgNOR ölçümleri, ister metafaz kromozomları üstünde olsun, isterse interfazda olsun, NOR proteinleri denilen bir protein grubunun miktarı hakkında bilgi vermektedirler (34-36). AgNOR+ kromozom sayısını, ya da interfazdaki AgNOR alanlarını ölçerek bu hücrelerin rRNA / RNA içeriklerini bilemeyiz. En azından elimizde böyle bir sıklala (birinin miktarına bakarak diğerinin bulunduğu bir grafik) bulunmamaktadır. Ancak Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Z. Hamurcu ve ark; DS ların periferal kan mononükleer hücrelerindeki RNA miktarını, hem in vivo koşullarda (37) hem de kültür ortamında FHE ile uyarılmış durumda ölçmüş (37); DS lu bebeklerde kontrollere göre daha yüksek RNA değerleri bulurlarken, yaş arttıkça bu değerlerin azalarak sonuçta kontrol değerlerinin de altına düştüğünü gözlemlemişlerdir. Tüm bu verilerden hareketle, DS fenotipinin, gereksiz yere sentezlenen rRNA/ RNA ve NOR proteinleri nedeniyle boşa harcanan enerjiden kaynaklanabileceği hipotezini ileri sürmüşlerdir. Ne ki, tüm bu bulgular, mezoderm kökenli kan hücreleri ile elde edilmişlerdir. Zeka kusurunun yansıtıldığı beyin ise, ektoderm kaynaklı bir dokudur. Doğrudan beyin dokusu ile çalışılma koşulları sınırlı, bazen de olanaksızdır. İşte bu nedenledir ki biz bu çalışmamızda beyin gibi, embriyolojik olarak ektoderm kaynaklı, fazla bir çalışma zorluğu da bulunmayan yanak epitel hücreleri ile çalışmaya karar verdik. Olgularımızın tümü de serbest trizomi 21 li hastalardı. Başka bir ifadeyle içlerinde traslokosyon ve mozaik tip DS lu olgu bulunmuyordu. Bu tür hastalardaki epitel hücre NOR larının nasıl bir NORa/TÇa değeri gösterecekleri bizce bir merak konusu olarak kalmıştır.

Mevcut bulgularımız açıkça göstermiştir ki DS lu hastaların yanak epiteli hücrelerinin genel ortalama NORa/TÇa değeri ($4,08 \pm 1,16$), sağlıklı kontrollerin ortalama NORa/TÇa değerinden ($2,20 \pm 0,62$) yaklaşık 2 kat daha fazla bulunmuştur. Yirmi iki hastanın içinde en küçük NORa/TÇa alanı değeri [18) AG: $\% 2.93 \pm 0,86$], 10 kontrol içinde en yüksek NORa/TÇa değerinden [7)MK: $2,74 \pm 0,68$] daha da yüksek bulunmuştur. Çalışmanın devamında kontrol bireylerinin sayısı artırılarak en az 20 ye çıkartılacak ve bu kontrollerde bulunan en yüksek NORa/TÇa değerinin ne olduğu bir kez daha kontrol edilip DS lu değerleri ile karşılaştırılacaktır. Burada hemen şunu da belirtmek gerekir ki 18) AG, DS lu hastalar içinde en yaşlı olanıdır. Bizim laboratuvarımızda periferal kan mononükleer hücreleri ile yapılan in vivo çalışmalar, DS' lular da yaş arttıkça, çekirdekçiklerin ana unsuru olan RNA(rRNA) da buna koşut olarak azalmakta, yaklaşık 15 yaşlarında kontrol değerleri ile eşitleşmektedir (37). Borsatto ve Smith (38) , daha yaşlı hastalarda yaş ile birlikte AgNOR ile boyanan metafazdaki akrosantrik kromozom sayısının azaldığını bulmuşlar, ribozomal gen aktivitelerinin yaşla birlikte azaldığını ileri sürmüşlerdir. Park ve ark da (39) trisiumlu timidin kullanarak ileri yaştaki (>30 Yıl) DS lu birey lenfositlerinin yaş ve cinsiyetle eşleştirilmiş kontrollerinden daha yavaş çoğaldıklarını gözlemlemişlerdir. Ancak tüm bu bulgular, bizim olgumuzla karşılaştırılamayacak kadar yaşlı DS lu olgularla elde edilmişlerdir. Ayrıca 2 aylık bir DS lu olgunun da [21)AS] kısmen düşük NORa/TÇa değeri ($2,98 \pm 0,83$) gösterdiğini gözlemlemekteyiz. Bu da DS lular içindeki düşük NORa/TÇa değerlerinin salt yaşla açıklanamayacağını, bireysel farklılıklar, örnek alınan bölgenin genel metabolik işleyişi ve kullanılan ölçüm yönteminin duyarlılık sınırı ile de ilişkili olabileceğini işaret etmektedir.

Sonuç olarak, bulgularımız, DS lu fenotipini açıklamaya yönelik olarak, İmamoğlu ve ark (33) tarafından ileri sürülen boşa harcanan enerji (wasted energy)* hipotezini destekler niteliktedir.

Boşa Harcanan Enerji hipotezi: DS lu bebekler/ küçük yaşlardaki çocuklar , fetal yaşamlarından itibaren, sağlıklı kontrollerden daha fazla rRNA ve NOR proteinleri üretmektedirler. Bu üretim, fazladan bulunan 21. kromozomun üretmesi beklenen NORa/TÇa oranına katkıdan (1/6 -1/11 arası ~ $\% 13$) çok daha fazladır ($\% 44$) , (27,28). Her iki molekül grubu da enerji harcanarak yapılmaktadırlar. NORs proteinleri ATP ve GTP; rRNAlar da ATP, GTP, CTP ve UTP harcanarak sentezlenmektedirler.

DSlu bir fetus / bebek hücreleri, enerjilerinin önemli bir bölümünü, bu gereksiz / faydasız sentezler için harcamakta ve sonuçta sağlıklı kontrollere göre temel bir handikapla, (boşa harcanan enerji kurgusu ile) birlikte doğmaktadırlar. Zeka kusuru dahil, diğer DSlu fenotipini oluşturan, en azından bu fenotipin oluşmasına katkıda bulunan temel etmen, büyük olasılıkla bu “boşa harcanan enerji”den kaynaklanmaktadır.

NOT: Hücre içindeki NTP (ATP, GTP, CTP ve UTP) derişimi, DSlu ve kontrol hücreleri arasında karşılaştırıldığında, anlamlı bir fark bulunmayabilir. Çünkü bu bileşikler, bir yandan sentezlenirken, diğer yandan da bu oranda sentez için harcanmakta, polimerleşmektedirler. Bu durumda, DSlu ve kontrolleri arasında bu trifosfatların sentez ve polimerleşme hacmini karşılaştırmak daha uygun olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Demirtaş H. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ders Notları. Erciyes Üniversitesi yayınları No:90, Kayseri 1996, ss55-56, 165-169
2. Günalp A., Ayter Ş., Lüleci G., Kart A., Sakızlı M. Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı(II.Baskı). Meteksan Yayınları No:17, Ankara 1986, ss63-69
3. Scheer U ., Xia B., Merkert H. and Weisenberger D. Looking at Christmas trees in the nucleolus. *Chromosoma* 1997; 105:470-480
4. Hilliker A.J. and Appels R. The Arrangement of interphase chromosomes: Structural and functional aspects. *Exp. Cell Res.* 1989; 185:297-318.
5. Jordan E.G. interpreting nuclear structure: where are the transcribing genes?. *J. Cell Sci.* 1991; 98:437-442
6. Vandelaer M. , Thiry M. , and Goessens G. Ultrastructural distribution of DNA within the ring-shaped nucleolus of human resting T lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 1993; 205: 430-432
7. Schwarzacher H. G. , Mikelsaar A. –V. , and Schnedl W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet. Cell Genet.* 1978; 20: 24-39

8. Lindner L.E. Improvements in the Silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *J. Histochem. Cytochem.* 1993; 41(3) : 439-445
9. Wachtler F. , Hopman A.H.N., Wiegant J. and Schwarzacher H.G. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. *Exp. Cell Res.* 1986;167:227-240
10. Mikelsaar A.-V. And Schwarzacher H.G. Comparison of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblasts. *Hum. Genet.* 1978; 42:291-299
11. Payao S.L.M. , Smith M. De A.C. , Kormann – Bortolotto M.H. , Toniolo J. Investigation of the nucleolar organizer regions in Alzheimer's disease. *Gerontology* 1994; 40(1):13-17
12. Robert – Fortel I., Junera H.R. , Geraud G. and 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
13. Sigmund J., Schwarzacher H. G. and Mikelsaar A.- V. Satellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR – activity. *Hum. Gen.* 1979; 50: 81 – 91
14. Bilinski S. M. And Bilinska B. A new version of the Ag – NOR technique . A combination with DAPI staining. *J. Histochem.* 1996; 28:651-656
15. Borsatto B. And Smith M. De A. C. Reduction of the activity of ribosomal genes with age in Down's Syndrome. *Gerontology* 1996; 42:147-154
16. Mikelsaar A.- V. Schwarzacher H.G. , Schnedl W. And Wagenbichler P. Inheritance of Ag – stainability of nucleolus organizer regions . *Hum. Genet.*1977;38:183-188
17. Jimenez R., Burgos M. Diaz de la Guardia R. A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity* 1988; 60:125-127

18. Hubell H.R. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technology* 1985; 60(5): 285-294
19. Denton T.E. , Howell W.M. and Barrett J.V. Human nucleolar organizer chromosomes: Satellite Associations. *Chromosoma* 1976; 55: 81-84
20. Genetic Friedman et al, *Kitap* , sayfa 27
21. Thompson and Thompson *Genetique in medicine* 4th edition 1986 Saunders Co Philadelphia
22. 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.
23. Shim KS, Bergelson JM, Furuse M, Ovod V, Krude T, Lubec G. 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.
24. 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* 2003b; 25: 41-47.
25. Cheon MS, Kim SH, Yaspo ML, Blasi F, Aoki Y, Melen K, Lubec G. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain: challenging the gene dosage effect hypothesis (Part I). *Amino Acids* 2003a; 24: 111-117.
26. Harris-Cerruti C, Kamsler A, Kaplan B, Lamb B, Segal M, Groner Y. Functional and morphological alterations in compound transgenic mice overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase and amyloid precursor protein. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 19:1174-1190.
27. Ferrando-Miguel R, Cheon MS and 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.

28. 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.
29. Demirtas H, Imamoglu N, Cucer N, Donmez H, Yilmaz A, Candemir Z, Bokesoy I. NOR (rDNA) expression enhancement in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes of Down syndrome patients. *Erciyes U. J Health Sci* 1999; 8: 24-27.
30. Demirtas H, Imamoglu N, Donmez H, Cucer N, Yilmaz A, Candemir Z. Condensed chromatin surface and NORs surface enhancement in mitogen- stimulated lymphocytes of Down syndrome patients. *Ann Génét* 2001; 44: 77-82.
31. Imamoglu N, Demirtas H, Donmez-Altuntas H, Ilten A. Higher NORs-expression in lymphocyte of trisomy 21 babies/children: in vivo evaluation. *Micron* 2005; 36: 503-507.
32. Imamoglu N, Demirtas H, Ilten A. NOR Expression increases in interphase lymphocytes of Down syndrome babies/children as AgNORs surface, according to the mitogen concentration in the culture medium. *Micron*, 2006;37: 129-133.
33. Imamoglu N, Demirtas H, Donmez-Altuntas H, Hamurcu Z, Ilten A. NORs Expression increases on metaphase chromosomes of Down syndrome lymphocytes, in concordance with the mitogen concentration in the culture medium. *Cytometry Part B-Clin Cytometry* 2005; 66B: 36-39.
34. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 2000; 31: 117-120.
35. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron* 2000; 31: 127-131.
36. Guillen AKZ, Hirai Y, Tanoue T, Hirai H. Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. *Chromosome Res.* 2004; 12: 225-237.
37. Hamurcu Z, Demirtas H, Kumandas 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: 24-28.

38. Borsatto B. and Simith MAC. Reduction of the activity of ribosomal genes with age in Down's syndrome. *Gerontology* 1996: 42:147-154.
39. Park E, Alberti J, Mehta P, Dalton A, Sersen E, Schuller-Levis G. Partial impairment of immune functions in peripheral blood leukocytes from aged men with Down's syndrome. *Clin Immun* 2000: 95: 62-69.

ÖZGEÇMİŞ

Seçil İLHAN. 1979 yılında Kayseri’de doğdu. 1990 yılında Salih Avgun Paşa İlkokulu’ndan, 1994 yılında Kayseri TED Koleji’nden, 1997 yılında Kocasinan Süper Lisesi’nden mezun oldu. 4 yıllık lisans öğrenimini Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde yaptı (1998- 2002). 4.sınıf alan dersleri olarak Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nın derslerini aldı. 2003 yılında Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimlerinin açmış olduğu tezsiz yüksek lisans sınavını kazanarak yüksek lisans eğitimini yapmıştır. Şuan Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında tez dönemi yüksek lisans öğrencisidir.