

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**LENFOSİTLERDEKİ ÇEKİRDEK-İÇİ NORs PROTEİNLERİ
DÜZEYİNİN, TRİZOMİ 21'Lİ ÇOCUKLARLA SAĞLIKLI
KONTROLLERİ ARASINDA KARŞILAŞTIRILMASI**

Proje No: HBYO-07-02

Proje Türü: Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd.Doç.Dr.Nalan İMAMOĞLU-ŞİRVANLI
Erciyes Üniv. Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı

Yardımcı Araştırmacılar

Prof.Dr. Halil DEMİRTAŞ
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yrd.Doç.Dr. Çetin SAATÇI
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Mart 2011

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ÇEKİRDEKÇİK OLUŞTURAN BÖLGELER (Nucleolar Organizer Regions; NORs).....	3
2.2. GÜMÜŞ NİTRAT BOYAMA (AgNOR BOYAMA) VE NOR'LARLA İLİŞKİSİ...4	
2.3. NOR PROTEİNLERİ (AgNOR PROTEİNLERİ).....	7
2.4. AgNOR PROTEİNLERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	9
2.5. DOWN SENDROMU (TRİZOMİ 21; MONGOLİZM).....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
3.1. GEREÇLER.....	12
3.2. YÖNTEM.....	14
3.2.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi.....	14
3.2.2. Hücrelerin Fiksasyonu.....	14
3.2.3. AgNOR Boyama.....	14
3.2.4. NOR Alanlarının Görüntü Analizi.....	15
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	15
4. BULGULAR.....	16
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	20
6. KAYNAKLAR.....	22
EKLER	

**LENFOSİTLERDEKİ ÇEKİRDEK-İÇİ NOR_s PROTEİNLERİ DÜZEYİNİN,
TRİZOMİ 21'Lİ BEBEK/ÇOCUKLARLA SAĞLIKLI KONTROLLERİ ARASINDA
KARŞILAŞTIRILMASI**

ÖZET

Down Sendrom (DS)'u ya da trizomi 21 en çok görülen ve en iyi bilinen kromozomal bozukluklardan biridir. Ancak bu sendromda, diğer kusurlarla birlikte zeka kusurunu oluşturan etmenler henüz tam olarak açıklanamamıştır. DS'lu hastalar, taşıdıkları fazladan 21.kromozomdan dolayı fazladan bir rRNA gen familyasına sahiptirler. Daha önceki çalışmalarımızda, mitojenle uyarılmış DS'lu hastaların lenfositlerinin hem interfaz hem de metafazında, AgNOR proteinleri sentezini, sağlıklı kişilerinki gibi yapamadıklarını, sağlıklı kontrollere göre fazladan AgNOR proteinleri sentezlediklerini göstermiştik. Bu hastaların lenfositlerindeki *in vivo* AgNOR-protein düzeylerinin de sağlıklı kontrollere göre daha fazla olduğu bir diğer çalışmalarımızda gösterilmiştir. Bu çalışmamızda ise, DS'lu lenfositlerinin nükleoplazmalarındaki AgNOR-protein düzeyinin *in vivo* olarak sağlıklı kontrollere göre değişim gösterip göstermediği araştırılmıştır. Bu amaçla 0-7 yaş arası 20 hasta ve aynı yaş grubundan 20 sağlıklı kontrollerinden alınan kanlar, doğrudan lam üzerine yayılarak AgNOR boyama yapıldı. Her iki grubun lenfosit nükleoplazmalarındaki AgNOR protein düzeyleri, bu amaç için özel hazırlanmış bir bilgisayar programı ile ölçüldü. Her bir kişi için 100'er adet lenfosit çekideğinin AgNOR-proteini ölçüldü ve sonuçlar Student-t testi ile karşılaştırıldı. DS'luların lenfosit nükleoplazmalarındaki *in vivo* AgNOR protein düzeylerinin kontrollere göre daha fazla miktarda olduğu bulundu ($p<0.001$). Sonuç olarak, *in vivo* ortamda, DS'lu hasta lenfositleri sağlıklı kontrollere göre daha fazla AgNOR-proteini sentezlemektedirler. Elde edilen bu sonuç, önceden yayınladığımız ve sendromun sebebini açıklayan "wasted energy" (boşa harcanan enerji) hipotezini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: AgNOR-proteinleri, Down sendromu, Lenfosit, trizomi 21.

**COMPARISON OF THE NUCLEOPLASMIC NOR_s PROTEIN LEVELS IN
LYMPHOCYTES BETWEEN TRISOMY-21 BABIES/CHILDREN AND HEALTHY
CONTROLS**

ABSTRACT

Down syndrome (DS) or trisomy 21 is by far the most common and best known of the chromosome disorders. Nevertheless, the factors contributing to the mental retardation together with other defects in this syndrome have not yet been fully explained. DS patients have extra rRNA gene family due to carrying an extra-chromosome 21. In our previous studies we have shown that mitogen-stimulated lymphocytes from DS patients can not down-regulate AgNOR-protein synthesis in both interphase and metaphase as do lymphocytes from healthy individuals and synthesize much more AgNOR-protein when compared to healthy controls. In our other previous studies, it has been also shown that the lymphocytes from these patients have a much higher *in vivo* AgNOR protein content as compared to healthy controls. In the current study, we investigated whether there is any change in *in vivo* AgNOR-protein level in nucleoplasms of lymphocytes from DS patients with respect to healthy controls. For this purpose, peripheral blood samples from 20 DS patients and 20 healthy controls both in the same age range of 0 to 7 years were smeared on clean glass slides and then AgNOR staining was performed. AgNOR-protein levels in nucleoplasms of lymphocytes from both groups were measured using a software specifically designed for this purpose. For each person, AgNOR-protein levels in 100 nuclei of lymphocytes were measured and the results were compared by means of Student-t test. *In vivo* AgNOR-protein levels in nucleoplasms of lymphocytes from DS patients were found to be significantly higher than those of the controls ($p < 0.001$). In conclusion, lymphocytes of DS patients under *in vivo* conditions synthesize a higher amount of AgNOR-protein with respect to healthy controls. The present findings obtained support our previously published “waster energy” hypothesis explaining the cause of the syndrome.

Key Words: AgNOR-proteins, Down syndrome, Lymphocyte, trisomy 21.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

NORs (Nucleolus Organiser Regions)'lar insanda beş çift akrosantrik 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. AgNOR boyama, ya doğrudan doğruya interfaz çekirdeğini ya da metafaz kromozomları üstündeki NOR bölgeleri belirlemek için kullanılmaktadır. İnterfazda transkripsiyonel olarak aktif olan (rRNA sentezleyen) NOR'lar metafazda da gümüş (AgNOR) boyama ile gösterilebilmektedir.

Mutat trizomi 21 (Tz21) 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'ü, çok çalışılmış ve en iyi bilinen kalıtsal hastalıklardan biri olmasına karşılık NOR ifadesi ile DS arasındaki ilişki yeterince bilinmemektedir .

Görüntü analizi yöntemi kullanarak DS'lu hastalarda hem in vitro ortamdaki mitojenle uyarılmış interfaz lenfositlerinde hem de in vivo ortamdaki lenfositlerde, AgNOR protein düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha fazla olduğunu daha önceki çalışmalarımızda göstermiştik. DS'lu ile sağlıklı bireylerin hem in vitro hem de in vivo ortamdaki lenfositlerinde, interfaz NOR'ları arasındaki fark o kadar açık ve nettir ki ışık mikroskopta ve orta derecedeki bir büyütmede bile ayırt edilebilmektedirler.

Bu çalışmamızda, DS'lu ve sağlıklı kontrollerinin lenfositlerinin çekirdek plazmalarında bulunan *in vivo* AgNOR protein düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Böylece, DS'lu

hastaların çekirdek plazmalarındaki AgNOR düzeylerinin kontrollere göre daha fazla bulunması durumunda, hem DSlu'ların başka bir özelliği açığa çıkartılmış olacak hem de bu yöntemle Tz21'li bebeklerin en fazla 2 gün içinde ön-tanısı yapılabilecektir. Aynı zamanda gereksiz ve fazladan enerji harcanması, bu hastalardaki gelişme geriliği ve zeka kusuruna, basit ve anlaşılabilir yeni bir açıklama da getirebilecektir.

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 çekirdekte 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).

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 imkan 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. GÜMÜŞ NİTRAT BOYAMA (AgNOR BOYAMA) VE NOR'LARLA İLİŞKİSİ

Gümüş nitrat, 1800'lü yılların sonlarından beri sitolojik bir boya olarak kullanılmaktadır (29). Kromozom preparatlarında AgNOR boyama (nucleolar gümüş boyama) ilk olarak Carleton (1920) tarafından gösterilmiştir (29). 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 (30). Ploton ve arkadaşları (1986) daha sonra, bir formik asit gümüş nitrat boyama metodu uygulayarak, rutin sito-histolojik örneklerde interfaz NOR'larının tam yerleşimlerini göstermişlerdir (1).

NOR'lar, gümüş ile seçici olarak boyanan arjirofilik 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).

Gümüş boyama tekniği, asidik bir ortamda gümüş nitratın, NOR merkezlerinde NOR proteinleri tarafından metalik gümüşe indirgenmesine dayanır (24). Ancak gümüş nitratı metalik gümüşe 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, 29, 30). Bu sonuçlar, gümüş iyonlarının, asidik olan proteinlere bağlandığını göstermektedir (4, 11, 12, 27, 30-33). Sonuç olarak, gümüşle pozitif olarak boyanan madde, rDNA'nın kendisi değil, rDNA bölgeleri ile birleşmiş bulunan asidik proteinlerdir (8, 17, 34, 35). 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 ribonükleoprotein asidik bir protein bileşenidir (11, 12, 31, 32). 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. Gümüşe proteinlerin bağlanma reaksiyonu sülfidril ve disülfid grupları vasıtasıyla meydana geliyor gibi görünmektedir (26, 36). Fosfat grupları da gümüş boyamada işe karışabilmektedirler. Gümüşe bağlanan iki major AgNOR proteinleri, nükleolin (C23) ve B23'dür (26, 32, 34, 36, 37). C23 ve B23, çekirdekçığın fosforlanan ana asidik fosfoproteinleridir. Bu proteinlerin küçük fosforlanan birimleri olan fosfoserin ve fosfotreonin gümüş boyamada işe karışabilmektedirler (34, 36). Defosforilasyon, kısmi proteolizis ya da maskelenmeden sonra bu proteinler gümüş için yatkınlıklarını kaybedebilirler (34). Bunun yanı sıra, nükleolinin karboksi kısmının değil, amino terminal bölgesinin AgNOR boyamada

işle karıştığı gösterilmiştir (26, 38). 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, 38). 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 (37).

Çekirdekçik içindeki interfaz NOR'larının gümüşle boyanmasının şiddeti, hücrelerin transkripsiyon aktivitesine bağlıdır (31, 38). Bu yüzden, çekirdekçik içindeki gümüş boyalı interfaz NOR'ları tarafından kaplanan bölgenin görüntü analizi ile değerlendirilmesi, rutin sito-histopatolojik 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, 29, 33). Ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel bölgesi ile gümüş boyanırılıığı arasında doğrudan bir ilişki vardır (6, 12, 14, 25, 29, 31, 33, 38). AgNOR boyama, aktif (AgNOR boyama pozitif) ve baskılanmış (AgNOR boyama negatif) olan genleri tahmin etmek için iyi bir işarettir (20, 31).

NOR boyamanın iki özelliğinden biri, sadece aktif rDNA bölgelerini boyayıp, inaktif (rRNA sentezlemeyen) bölgeleri boyamamasıdır. Transkripsiyonel aktivitenin gümüş boyanırılıığı için gerekli olduğu belirtilmektedir (33). 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 AgNO₃ 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, 32).

2.3. NOR PROTEİNLERİ (AgNOR PROTEİNLERİ)

Sitokimyasal reaksiyonlarla ortaya çıkarılabilen AgNOR proteinlerinden bazıları, ilk kez 1970'lerde tanımlandı (38). 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, 34, 35, 39, 40) ve interfaz çekirdeğinde granüllü bölgeden dışarı atılırlar (24). Farklı miktarlardaki AgNOR proteinleri ince bir filament ile oluşan granüllere bağlanırlar (35). FC ve DFC, mitotik NOR'ların interfaz karşılığıdır (1, 4, 8, 15, 26, 34, 32, 41).

AgNOR proteinleri, çoğalmayan hücrelerdeki ifadeleri çok düşük olmasına karşılık, hızlı bir şekilde çoğalan hücrelerde birikme yaparlar (37, 38). Bu yüzden AgNOR proteinleri, aktif ribozomal genlerin işaretleridir (24, 26, 30, 35, 38). 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, 35, 38). Bu proteinler, kromozomların NOR'larında gümüş boyama ile gösterilebilirler (31). NOR proteinleri, diğer bir çok hücresel proteinlerin boyanmadan kaldığı asidik şartlar altında gümüşü indirgeme yetenekleri ile ayırt edilirler. Gümüşe özgün yatkınlıkları vardır (26, 35, 42).

Ribozomal genlerin (rDNA) transkripsiyonu ve çekirdekçiğin işlenmesi, AgNOR proteinlerinin varlığına bağlıdır (17, 23, 26, 32). 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 proteinlerinden bir kısmı, çekirdekçik transkripsiyon aktivitesinden (pre-rRNA sentezinden) tamamen bağımsızdırlar (17, 32, 35, 39). Bu proteinler muhtemelen, ribozomal kromatinin sürekliliği için, fonksiyonel bir rolden ziyade, yapısal bir rol oynamaktadırlar (17, 32, 35, 39). Bu proteinler, histonların rDNA'ya bağlanmalarını engelleyerek, sürekli genişlemiş bir kromatini devam ettirebilirler (40). AgNOR proteinleri, çoğalan hücrelerde G₁

fazı boyunca meydana gelen ribozomal kro 8 leki yapısal değişikliklerde anahtar bir rol oynarlar.

AgNOR proteinlerinin miktarı, hücre çoğalmasının bir göstergesidir (1, 32, 37, 38, 43). Çünkü bu proteinlerin miktarı, hücre döngüsü evreleri ile ilişkilidir (26, 31, 37, 38) ve bu miktar, düzenli olarak hücre döngüsü boyunca değişir (43). Hücre katlanma zamanı ne kadar kısalsa, interfaz AgNOR'larının miktarı da o kadar artar (1, 31, 37). AgNOR proteinlerinin miktarı şematik olarak; G₁ fazı için düşük, S-G₂ fazları için yüksektir (37, 38). G₀ fazında AgNOR proteinlerinin miktarı, G₁ fazındaki hücrelerde bulunanlardakinin yarısı kadardır (37).

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 kısalsa, 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 değerlendirmesi, hem diagnostik hem de prognostik amaçlar için tümör patolojisinde kullanılmaktadır (1, 2, 18, 32). AgNOR parametresinin, tümörlerin birçok 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, 32).

AgNOR proteinlerinin ölçümü, kanser hücresi çoğalma hızının basit bir tahmini olarak kullanılabilir (23, 31, 32, 37). 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, 30, 31). Malign hücreler, malign olmayan (benign ya da normal) hücrelerle karşılaştırıldıklarında daha fazla miktarda AgNOR proteini bulundurlar. Kanser dokularında AgNOR proteini ifadesi, hücre duplikasyon (katlanma) oranı ile ilişkilidir (4, 18, 32). Çünkü hücre dublikasyon aktivitesi ve AgNOR proteinlerinin miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (23, 32, 37). Gümüşle boyanan AgNOR proteinlerinin miktarı ne kadar fazla olursa, hücre çoğalması da o kadar hızlı olur (4, 32). 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 (30).

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, 37-39). C23 proteini ve B23 proteini, çekirdekçiklerde en bol bulunan AgNOR proteinleridir (26, 31, 44). 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, 31, 32, 38). Mitoz boyunca AgNOR proteinleri ya sitoplazmada kromozomların etrafına dağılmış olarak çözülmüş halde ya da NOR'lar içinde ribozomal genlerle birleşmiş haldedirler (31, 38).

2.4. 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, 37, 45).

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 yardımcı 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).

İlk “Onkolojide AgNOR” çalışmayı süresince, “AgNOR’ değerlendirmede 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).

2.5. 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 (46).

DS, 21. kromozomun fazladan bir kopyası ile ortaya çıkan en yaygın kromozom anomalilerinden biridir (47-52). DS, yaklaşık 700 canlı doğumda bir görülürken bu oranın son yıllarda 1000 canlı doğumda bire indiği belirtilmiştir (46). DS’nu tanımlayan özelliklerin, 21. kromozomun uzun kolu (21q) içinde bulundurulmuş bazı genlerin, fazladan bir kopyalarının bulunmasından dolayı, bu genlerin aşırı ifade edilmeleri sonucunda oluştuğu varsayılmaktadır (48, 49). 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 (53). 21.kromozom en küçük insan kromozomudur (53, 54).

Trizomi 21, mental retardasyonun (zeka geriliğinin) en yaygın otozomal genetik nedenidir (47, 49, 51-53, 55). 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 (46, 47, 49, 51, 55-58). DS , cukların 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 (56).

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 (47, 49, 52). İkincisi ise; bu genlerin ürünlerinin, doğrudan ya da daha muhtemel olarak dolaylı bir şekilde, diğer genlerin ifadelerini ya da gen ürünlerini etkilemesidir (47).

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 (Olympus model CX41)
6. Manyetik karıştırıcı (Janke&Kunkel)
7. Dengeleme terazisi
8. Hassas terazi (Kern S 2000)
9. Derin dondurucu (Uğur Derby)
10. Buzdolabı (Arçelik)
11. Bunzen beki
12. Zaman ayarlayıcı
13. Dispenser (Brand-Dispensette)
14. pH metre (NEL Mod 821)

15. Mikroskop ataşmanlı video kamera (Olym DP20 CCD kamera, DP2-BSW)
16. Kamera adaptörü (Olympus DP20-5)
17. Bilgisayar (HP Compaq Intel Core 2 Duo CPU, Windows XP)
18. Bilgisayar yazıcısı (HP LaserJet P1005)

Sarf Malzemeler

1. Giemsa (Merck, 540040512)
2. KH_2PO_4 (Merck, 9021622)
3. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, K1690176)
4. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
5. Metanol (Merck, 502K5275408)
6. Lamel yapıştırıcı (Entellan®, Merck, 640171987)
7. İmmersiyon yağı (İmmersiol®, Merck, 09403569)
8. Alkol (% 96'lık saf alkol, Tekel)
9. Aseton (Merck, K11415613)
10. Ksilol (Merck, 207K03755385)
11. NaCl (Merck, 2448989)
12. KCl (Merck, 340TA611835)
13. AgNO_3 (Carlo Erba, 320904)
14. Etanol (Merck, K21078586)
15. Jelatin (Merck, 5214525)
16. Formik asit (Merck, K30486663)
17. pH Universal İndikatör pH 0-14 (Merck)
18. Distile su
19. Çeşitli cam laboratuvar malzemesi
20. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü (Grainer, polystrene)
21. Filtre kâğıdı (Whatman Filter Papers 25mm)
22. Enjektör 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml, 50ml (Sterijen)
23. Pastör pipeti
24. Lam (Objektträger)
25. Lamel (Menzel-Glasser 24x32mm)
26. Alüminyum Folyo

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalına Down Sendromu (DS) şüphesi ile başvuran ve yaşları 0-7 arasında değişen bebek/çocuklardan periferik kanları alındı. Işık mikroskobu ile yapılan kromozom analizi sonucunda karyotipleri kesin olarak 47, XX + 21 ya da 47, XY +21 şeklinde bulunan 20 bebek/ çocuk DS'lu hasta grubu, hiç bir anomalisi bulunamayan ve karyotipi 46, XX ya da 46, XY olan aynı yaş grubundan 20 bebek / çocuk ise kontrol grubu olarak değerlendirildi.

3.2.2. Hücrelerin Fiksasyonu

Kromozom analizi için ekim yapıldıktan sonra arta kalan kan örneklerinden birkaç damla kan, temiz lam üzerine yayıldı ve kuruduktan sonra 5 dakika metanolle (Merck, Kat. No: 502K5275408) tespit edildi. Tespit işleminden sonra preparatlara gümüş (AgNOR) boyama yöntemi uygulandı.

3.2.3. AgNOR Boyama

Gümüş boyama, Lindner (9)- protocol no 2, yöntemine göre yapıldı. Bununla birlikte, bu yöntem hafif bir değişiklikle uygulandı: Sıcaklık 37°C ye çıkarılırken, süre 15 dakikaya düşürüldü. Her iki grubun tüm preparatları için boyanma sürelerinin eşit tutulmasına özellikle dikkat edildi.

AgNOR Boyamada Kullanılan çözeltiler:

%33 lük AgNO₃:

1 g AgNO₃'ın 2 ml bidistile su içinde çözünmesi ile hazırlandı. Çözelti +4 C° de karanlıkta (alüminyum folyo ile sarılarak) en fazla 15 gün süre ile saklandı.

%1 lik formik asit:

1ml lik absolü (mutlak) formik asitin bidistile su ile 100ml ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

%2 lik jelatinli formik asit:

%1 lik formik asitin 98 ml'si içine oda sıcaklığında 2g jelatin karıştırıldı. Karışım filtre kâğıdından süzülüp oda sıcaklığında birkaç gün korunabilir. Ancak mümkün olduğu sürece karışım her çalışmanın başında yeniden hazırlandı.

Gümüş boyama çözeltisi:

%33 lük AgNO₃ çözeltisinden 1ml (2hacım), %2 lik jelatinli formik asitten de 0.5 ml (1 hacım) alınarak ışık görmeyen çevresi alüminyum folyo ile sarılı tüp içinde karıştırılarak hazırlandı.

Bu karışım (gümüş boyama çözeltisi), beklenilmeden fikse edilmiş preparatların üstüne 3-4 damla konularak üstüne lamel bastırılmadan konuldu ve hemen çevresi alüminyum folyo ile sarılı petri kapları içine yerleştirilerek 37 C° de 15 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda preparatlar distile su ile yıkanarak üstlerindeki lamelleri atıldı. Lamalar kuruduktan sonra NORs alanlarının ölçümüne başlandı.

3.2.4. NOR Alanlarının Görüntü Analizi

DS'luların ve sağlıklı kontrollerinin in vivo ortamdaki lenfosit çekirdekleri mikroskoptan (Olympus CX41) video camera (Olympus DP20 CCD kamera, DP2-BSW) aracılığı ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Bilgisayar ortamına aktarılan her bir lenfosit nükleoplazmasındaki AgNOR protein düzeyi, bilgisayarda özel olarak hazırlanmış İmaj analiz yöntemi (59) kullanılarak belirlendi. Lenfositlerdeki nükleoplazmanın gümüş ile boyanma şiddeti, içerdiği AgNOR protein miktarına bağlı olarak değişmekte olup, daha fazla miktarda AgNOR proteini içerenler gümüşle koyu, daha az miktarda AgNOR proteini içerenler ise gümüşle daha açık renkte boyandılar. Bilgisayar programında bu boyanma farklılıkları ölçülerek, lenfosit nükleoplazmalarındaki AgNOR protein düzeyleri belirlendi. Bu yöntemde, fazla miktarda protein içerenler (gümüşle koyu boyananlar) bilgisayar programında düşük algılama, daha az miktarda protein içerenler (gümüşle daha açık boyananlar) ise bilgisayar programında yüksek algılama düzeyi ile görüntülendiler. Bu durum ise, bilgisayar programında düşük şiddette algılanan çekirdek plazmalarının daha fazla miktarda AgNOR proteini içerdiği, yüksek şiddette algılanan çekirdek plazmalarının ise daha az miktarda AgNOR proteini içerdiği şeklinde yorumlandı. Dolayısı ile bilgisayar tarafından algılanan nükleoplazmanın boyanma şiddeti ile içerdiği AgNOR protein düzeyi ters ilişkili durumdadır. Bu şekilde, her bir kişiden 100 adet lenfosit nükleoplazmasındaki AgNOR-protein düzeyi ölçüldü.

3.2.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

DS'lu ve sağlıklı kontrollerinin lenfosit çekirdek-plazmalarındaki in vivo AgNOR-protein düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması, bilgisayar programı SPSS'deki Student t-testi kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

20 DS' lu hastanın ve aynı yaş grubundaki 20 sağlıklı kontrolün periferik kan yaymalarından elde edilen ve gümüş boyama metodu uygulanarak hazırlanan preparatlardan, her bir kişiden 100 adet olmak üzere, lenfosit çekirdek-plazmalarındaki AgNOR protein düzeyleri imaj analiz programı kullanılarak ölçülmüştür.

Ölçüm sonucunda, her bir DS'lu hastanın gümüşle boyalı lenfosit nükleoplazmalarının bilgisayar programı ile algılanan ortalama boyanma şiddeti değerleri Tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1: Her bir DS' lu hastanın gümüş ile boyalı lenfosit nükleoplazmalarının bilgisayarda ölçülen ortalama boyanma şiddeti değerleri.

Hasta Grubu	Yaş	Cinsiyet	N	Nükleoplazmanın Boyanma Şiddeti
				Ortalama \pm SD
1) BP	5 aylık	E	100	167.99 \pm 9.97
2) BC	2 aylık	K	100	162.49 \pm 11.17
3) YK	20 günlük	E	100	172.14 \pm 8.28
4) ÇB	37 günlük	K	100	177.86 \pm 7.39
5) BB	15 günlük	E	100	176.41 \pm 10.15
6) EÇ	1 aylık	E	100	180.61 \pm 9.39
7) SY	1 aylık	E	100	174.00 \pm 8.39
8) MÇ	5 yaş	E	100	172.52 \pm 7.78
9) EA	3 aylık	E	100	178.97 \pm 7.82
10) BE	3 günlük	E	100	176.48 \pm 7.61
11) BT	5 günlük	E	100	174.33 \pm 8.82
12) BG	10 günlük	E	100	175.07 \pm 10.11
13) BY	7 aylık	E	100	176.39 \pm 8.22
14) MR	5 günlük	K	100	180.68 \pm 7.11
15) BK	29 günlük	E	100	179.78 \pm 7.51
16) HM	11 aylık	K	100	183.99 \pm 7.08
17) KH	10 aylık	E	100	178.76 \pm 8.48
18) Fİ	1 aylık	E	100	180.75 \pm 6.20
19) AB	3 aylık	K	100	179.99 \pm 6.43
20) MA	9,5 aylık	E	100	181.78 \pm 8.40
GENEL ORTALAMALAR				176.55 \pm 9.73

Aynı yaş grubundaki 20 sağlıklı kontrolden her birinin gümüşle boyalı lenfosit nükleoplazmalarının bilgisayar programı ile algılanan ortalama boyanma şiddeti değerleri ise Tablo 2’ de gösterilmiştir.

Tablo 2: Her bir sağlıklı kontrolün gümüş ile boyalı lenfosit nükleoplazmalarının bilgisayarda ölçülen ortalama boyanma şiddeti değerleri.

Kontrol Grubu	Yaş	Cinsiyet	N	Nükleoplazmanın Boyanma Şiddeti Ortalama \pm SD
1) DS	7 yaş	E	100	200.72 \pm 7.63
2) AB	6.5 aylık	E	100	199.99 \pm 5.39
3) SD	13 aylık	E	100	200.82 \pm 6.08
4) YZ	3,5 yaş	E	100	203.63 \pm 6.15
5) MŞ	3 aylık	K	100	208.66 \pm 5.17
6) DÜ	5 aylık	K	100	203.18 \pm 6.18
7) MC	3 aylık	E	100	203.37 \pm 5.37
8) İŞ	2 yaş	E	100	204.69 \pm 6.05
9) SC	1 aylık	K	100	202.08 \pm 6.39
10) FB	1ay 8 gün	K	100	204.98 \pm 4.75
11) NN	9 aylık	K	100	201.38 \pm 5.72
12) AG	6 aylık	E	100	201.24 \pm 5.79
13) FA	1 yaş	E	100	202.74 \pm 5.14
14) MO	9 aylık	E	100	203.14 \pm 4.97
15) BM	5 aylık	E	100	203.08 \pm 5.10
16) AR	2 aylık	E	100	198.28 \pm 6.13
17) YB	4 aylık	E	100	202.62 \pm 4.98
18) EY	9 aylık	E	100	204.56 \pm 4.56
19) OK	6 aylık	E	100	204.45 \pm 4.03
20) SS	11 aylık	E	100	202.72 \pm 5.19
GENEL ORTALAMALAR				202.82 \pm 5.96

DS'luların lenfosit nükleoplazmalarının gümüşle daha koyu boyandığı ve buna bağlı olarak da çekirdek plazmalarının ortalama boyanma şiddetinin bilgisayar programında daha düşük algılandığı (176.55 ± 9.73), kontrol grubunun lenfosit nükleoplazmalarının ise gümüşle daha açık boyandığı ve buna bağlı olarak da çekirdek plazmalarının ortalama boyanma şiddetinin bilgisayar programında daha yüksek algılandığı bulundu (202.82 ± 5.96).

Bilgisayarda imaj analiz programı kullanılarak ölçülen, DS'lulardaki nükleoplazmaların ortalama gümüşle boyanma şiddeti değerleri ile kontrol grubundaki nükleoplazmaların ortalama gümüşle boyanma şiddeti değerleri arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3: 20 DS'lu ve 20 Sağlıklı kontrolün lenfosit nükleoplazmalarının bilgisayarda ölçülen ortalama gümüşle boyanma şiddeti değerlerinin istatistiksel karşılaştırmaları

Gruplar	n	Nükleoplazmanın Boyanma Şiddeti
		Ortalama \pm SD
DS'lu hasta grubu (N=20)	2000	176.55 \pm 9.73*
Kontrol grubu (N=20)	2000	202.82 \pm 5.96

N:Kişi sayısı n: değerlendirilen hücre sayısı.

*p<0.001

Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, bilgisayardaki algılanan nükleoplazmanın boyanma şiddeti ile içerdiği AgNOR protein düzeyi ters ilişkili olduğundan dolayı, DS'lu lenfosit nükleoplazmalarındaki *in vivo* AgNOR protein düzeylerinin, kontrollere göre daha fazla miktarda olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). Karşılaştırma sadece ortalamalar düzeyinde değil de bireyler arasında yapıldığında bile DS'luların en yüksek değeri (183.99 ± 7.08) kontrollerin en düşük değerinden (198.28 ± 6.13) daha fazla bulunmuştur. Bu demektir ki bu yaş grubundaki DS'lu bireyler, sadece interfaz AgNOR boyamalarına bakılarak kontrollerden ayrılabilirler. Yöntemin güvenilirliği için çok sayıdaki vakaların karşılaştırılması gereklidir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

DS' luların hem *in vitro* olarak PHA ile uyarılmış lenfositlerinde (59) hem de *in vivo* ortamdaki lenfositlerinde (60) kontrol grubu lenfositlerine göre daha fazla AgNOR proteini içerdiklerini AgNOR alanlarını ölçerek göstermiştik.

Yine benzer şekilde *in vitro* yapılan diğer çalışmalarımızda da, kültür ortamındaki mitojen derişimi ile NOR ifadesi arasındaki ilişkiye bakılmış (61) ve DS'lu lenfositlerindeki NORs ifadelerinin kontrollerin lenfositlerinde olduğu gibi bir kararlılık gösteremediği ortaya çıkartılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda, PHA derişimine göre DS'lu lenfositlerindeki hem AgNOR'la boyanan kromozom sayısının (62) hem de interfazdaki NOR alanlarının genişliğinin (63) değiştiği gösterilmiştir.

Bu çalışmamızda ise DS'lu ve sağlıklı kontrollerinin lenfositlerinin çekirdek plazmalarında bulunan *in vivo* AgNOR protein düzeyleri karşılaştırılmış ve DS'lu hastaların çekirdek plazmalarındaki AgNOR- *protein* düzeylerinin kontrollere göre daha fazla miktarda olduğu bulunmuştur.

Çalışmalarımız göstermektedir ki hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda DS'lular AgNOR proteinleri sentezini sağlıklı kontrolleri gibi yapamamaktadırlar. Bu fazladan ve gereksiz protein sentezi de ya doğrudan DS fenotipini oluşturmakta ya da boşa harcanan bu enerji nedeni ile zeka kusuru da dahil diğer özelliklerin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (64).

Sonuç olarak bu çalışma ile, serbest trizomi 21'li DS'luların lenfosit hücre çekirdeklerinde sağlıklı çocuklara/bebeklere göre daha fazla NOR proteinleri taşıdıkları istisnasız tüm

hastalarda düzenli olarak bulunduğu kanıtlandığında, literatüre yaptığımız katkı iki noktada ortaya çıkmaktadır:

- DS'lu hastaların şimdiye kadar **bilinmeyen bir özellikleri daha ortaya çıkartılarak**, bu hastaların çekirdek plazmalarındaki AgNOR- *protein* düzeylerinin kontrollere göre daha fazla miktarda olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak trizomi 21 li hasta lenfositleri, sağlıklı kontrollere göre daha fazla NOR proteini sentezlemektedirler. Bilindiği gibi protein sentezi de diğer makromoleküller gibi enerji (ATP) harcanarak yapılmaktadır. Gereksiz ve fazladan enerji harcanmasının, zeka kusuru ve gelişme geriliği yönünde bir handikap oluşturacağı açıktır. Bu gereksiz sentez ve enerji harcanması, ektoderm hücrelerinde de gözlenmektedir (65). Olayın başkaları tarafından doğrulanması durumunda, gereksiz ve fazladan enerji harcanması, bu hastalardaki gelişme geriliği ve zeka kusuruna, basit ve anlaşılabilir yeni bir açıklama getirebilecektir.
- Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, DS'lu lenfosit nükleoplazmalarındaki *in vivo* AgNOR protein düzeylerinin, kontrollere göre daha fazla miktarda olduğu ($p < 0.001$) ve karşılaştırmanın sadece ortalamalar düzeyinde değil de bireyler arasında yapıldığında bile, DS'luların en yüksek değerinin (183.99 ± 7.08) kontrollerin en düşük değerinden (198.28 ± 6.13) daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu da, bu yaş grubundaki DS'lu bireylerin sadece interfaz AgNOR boyamalarına bakılarak, *in vivo* AgNOR protein düzeylerine göre kontrollerden ayrılabilirdiği anlamına gelmektedir. Böylece, lenfositlerin çekirdek içi NOR proteinleri ölçülerek de serbest trizomi 21'li bebeklerin **en fazla 2 gün içinde ön-tanısı** yapılabilecektir. Bununla birlikte, yöntemin güvenilirliği için çok sayıdaki vakaların karşılaştırılması gereklidir.

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, Ar 23 ono 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 (Ag-NOR). *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, 24 bichler P. Inheritance of Ag-stainability of nucleolus organizer regions. *Hum Genet* 1977;-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. Hubbell HR. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technology* 1985; 60(5):285-294
30. Biliński SM, Bilińska B. A new version of the Ag-NOR technique. A combination with DAPI staining. *J Histochem* 1996; 28:651-656
31. 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
32. Trerè D, Pession A, Derenzini M. The silver stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Cell Res* 1989; 184:131-137
33. Jiménez R, Burgos M, Diaz de la Guardia R. A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity* 1988; 60:125-127
34. Ploton D, Thiry M, Menager M, Lepoint A, Adnet JJ, et al. Behaviour of nucleolus during mitosis. *Chromosoma* 1987; 95:95-107
35. 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
36. Denton TE, Howell WM, Barrett JV. Human nucleolar organizer chromosomes: Satellite Associations. *Chromosoma* 1976; 55:81-84
37. 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
38. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* 2000; 31:121-126

39. 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
40. 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
41. 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
42. 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
43. 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. *Immunol Lett* 2002; 83:67-72

26

44. Scheer U, Hock R. Structure and function ofleolus. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:385-390
45. 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
46. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet* 2003; 361:1281-1289
47. 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
48. 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
49. 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
50. Smith MAC, Borsatto B. Down's syndrome, ageing and fragile sites. *Mech Ageing Dev* 1998; 101:167-173
51. 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
52. 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

53. Antonorakis SE. 10 years of genomics, Chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 1998; 51:1-16
54. 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
55. 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
56. Greber-Platzer S, Schatzmann-Turhani D, Wc²⁷ 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
57. Morimoto K, Kaneko T, Lijima K, Koizumi A. Proliferative kinetics and chromosome damage in Trisomy 21 lymphocyte cultures exposed to γ -rays and Bleomycin. *Cancer Res* 1984; 44:1499-1504
58. 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
59. Demirtas H., Imamoglu N., Dönmez H., Cücer N., Yilmaz A., Candemir Z. Condensed chromatin surface and NOR surface enhancement in mitogen-stimulated lymphocytes of Down syndrome patients, *Ann. Génét* 2001; 44, 77-82.
60. İmamoğlu N., Demirtaş H., Dönmez-Altuntaş H., İlten A. Higher NORs-expression in lymphocyte of trisomy 21babies/children: In vivo evaluation. *Micron* 2005; 6, 503-507.
61. Demirtas H., Candemir Z., Cücer N., Imamoglu N., Dönmez H., Bökesoy I. Essay on the nucleoli survey by the α - and β - satellite DNA probes of the acrocentric chromosome in mitogen-stimulated human lymphocytes, *Ann. Génét* 2000; 43, 61-68.
62. Imamoglu N, Demirtas H, Dönmez-Altuntas H, Hamurcu Z, İlten A. NOR expression increases on metaphase chromosomes of Down syndrome lymphocytes in concordance with mitogen concentration in culture medium. *Cytometry Part B Clin Cytometry* 2005; 66, 36-39.
63. Imamoglu N, Demirtas H, İlten A. NOR expression increases in interphase lymphocytes of Down syndrome babies/children as AgNORs surfac²⁷ rding to the mitogen concentration in the culture medium. *Micron* 2006; 37, 129-133.
64. Demirtaş H. AgNOR status in Down's syndrome infants and a plausible phenotype formation hypothesis. *Micron* 2009; 40, 511-518.

65. Yilmaz SI, Demirtas H. [AgNOR increase in buccal epithelial cells of trisomy 21 infants.](#) *Micron* 2008; 39, 1262-12655.