

Comparative Studies of the AgNORS Motifs in Phytohemagglutinin-Stimulated Human T-Lymphocytes with T-Lymphocyte Subgroups

Fitohemaglütinin ile Uyarılmış İnsan T-Lenfositlerindeki AgNOR Motiflerinin T-Lenfosit Alt Grupları ile Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi

Nazmiye Bitgen¹, Hamiyet Dönmez-Altuntaş¹, Zuhul Hamurcu¹, Halil Demirtaş¹, Figen Öztürk²

ORIGINAL
INVESTIGATION
ÖZGÜN
ARAŞTIRMA

ABSTRACT
ÖZET

Objective: Using of argyrophilic nucleolar organiser region (AgNOR) patterns, instead of the fluorescent T-lymphocyte markers, in specification of sub-groups of T-lymphocyte was researched in the study. For this, it was aimed to indicate that AgNOR pattern of each T-lymphocyte sub-group remains stable in a stage of cell cycle stimulated by phytohaemagglutinin (PHA) and that these patterns are different from each other.

Material and Methods: Peripheral blood samples of four healthy volunteers were cultured according to whole blood and/or isolated blood culture methods. The slides were stained by using AgNOR and immunohistochemical staining methods.

Results: As we expected, the CD8 staining is not observed in a single style of the nucleolar organiser region (NOR) motif, but rather occurred in the forms of different kinds of nucleolus. It was found that the different types of NOR motifs formed with AgNOR staining are not related to the T-lymphocyte subgroup.

Conclusion: It was concluded that the NOR motifs are not specific to sub-groups of T-lymphocytes. Further investigations are needed to support our results.

Key words: AgNORs motifs, acrocentric chromosomes, immunohistochemical staining, T-lymphocyte subgroups

Amaç: Bu çalışmada, T-lenfosit alt tiplerinin tanımlanmasında floresanlı, T-lenfosit belirleyicileri yerine, gümüşle boyanabilen nükleer organize edici bölge (AgNOR) motiflerinin kullanımı araştırıldı. Bunun için, fitohemaglütinin (PHA) ile uyarılan T-lenfositlerde, alt tiplerinden her birinde oluşan AgNOR motifinin, belirli bir hücre döngüsü aşamasında sabit kaldığının ve bu motiflerin alt tipler arasında farklı olduğunun gösterilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Dört sağlıklı gönüllünün periferik kan örnekleri, tam kan ve/veya izole kan kültürü tekniklerine göre kültüre edildi. Hazırlanan preparatlar, AgNOR ve immunohistokimyasal boyama yöntemleri ile boyandı.

Bulgular: Beklendiği gibi tek bir nükleer organize edici bölge (NOR) motifinde CD8 boyamanın görülmediği, aksine birden farklı çeşitli çekirdekçik şekillerinde de CD8'le boyanmanın gerçekleştiği, dolayısıyla AgNOR boyama ile oluşan değişik tipteki NOR motifleri ile T-lenfosit alt gruplarının bağlantılı olmadığı bulundu.

Sonuç: NOR motiflerinin T-lenfosit alt gruplarına spesifik olmadığı sonucuna varılmıştır. Sonuçlarımızın desteklenmesi için konuyla ilgili başka çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: AgNOR motifleri, akrosentrik kromozomlar, immunohistokimyasal boyama, T-lenfosit alt grupları

¹Erciyes Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı,
Kayseri, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Patoloji
Anabilim Dalı,
Kayseri, Türkiye

Submitted/Geliş Tarihi
28.07.2011

Accepted/Kabul Tarihi
16.05.2012

Correspondance/Yazışma
Dr. Nazmiye Bitgen
Erciyes Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, 38039
Kayseri, Türkiye
Phone: +90 352 207 66 66
/23329
e.mail:
nazmiyebitgen@gmail.com

©Copyright 2012
by Erciyes University School of
Medicine - Available on-line at
www.erciyesmedicaljournal.com
©Telif Hakkı 2012
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Makale metnine
www.erciyesmedicaljournal.com
web sayfasından ulaşılabilir.

Giriş

Kromozomlar, interfaz çekirdeği içinde rasgele dağılmamışlardır. Hücre döngüsünün evrelerine de bağlı olarak, her bir kromozomun çekirdek içinde kendine has özel bir bölgesi bulunduğu kabul edilir ve bu bölgeye kromozomal alan (chromosomal domain, chromosome territory) denir (1, 2). Akrosentrik kromozomların satellit sapındaki ribozomal RNA (rRNA) genlerine yerleşik olan bazı proteinler, aktif nükleer organize edici bölgelerin (NORs) belirteçleridir. Bu NOR bölgeleri gümüşle boyanarak kolaylıkla takip edildiklerinden, gümüşle boyanabilen nükleer organize edici bölge (AgNOR) proteinleri olarak adlandırılırlar (3, 4). NOR'lar insanda 5 çift akrosentrik kromozomun ikincil boğum denilen satellit saplarında yerleşik rRNA gen ailesidir (5). İfade olan aktif NOR'ların interfaz ve metafazdaki konumları, AgNOR boyama ile gösterilebilir (6, 7). İnterfazdaki AgNOR boyama, NOR+ durumdaki akrosentriklerin çekirdek içindeki toptan konumlarını da gösterir ve bunlar, ince yapısı önemli ölçüde bilinen çekirdekçikle birlikte bulunurlar. Çekirdekçik yapısı da sabit olmayıp, hücrenin interfazdaki evrelerine göre sürekli bir değişim içindedir (8). Bu da aktif NOR taşıyan akrosentriklerin, çekirdek ve çekirdekçik içindeki konumlarının interfaz evresine göre değişebileceklerini işaret eder. İnterfaz kromozomlarının çekirdek-içi yerleşimleri rastgele olmayıp her bir kromozomun kendisine has farklı bir kromozom alanı vardır (9-11).

Periferik kan lökositlerinin %20-30 kadarını lenfositler, periferik kandaki lenfositlerin de %70-80'inini de T-lenfositler oluşturur. T-lenfositler, timusta geliştikleri ve timus bağımlı hücreler oldukları için "T hücreleri" adını alır. T-lenfositler immün sistemin en önemli hücreleridir ve doğrudan antikora bağımlı olmayan ve hücrelerin yönettiği ve katıldığı özgül immüniteyi oluştururlar (12-17). Bağışık yanıtta rolleri açısından T-hücre topluluğunun

homojen olmadığı ve yapı ve işlev özelliği farklı olan alt grupların bulunduğu bilinmektedir. Tüm T-lenfositlerde bulunan ortak yüzey molekülleri yanında bu alt gruplardaki farklı yüzey molekülleri (CD4, CD8 gibi), onların ayırt edilmesinde kullanılır. T-lenfositleri, T yardımcı (Th) lenfosit ve T sitotoksik/baskılayıcı (Tc/s) lenfosit olmak üzere başlıca iki alt gruba ayrılır. Th lenfositler, yardımcı ve uyarıcı rolü olan lenfositler olup, CD4 yüzey molekülü taşırlar (CD4+, CD8-). Tc/s lenfositler, öldürücü ve baskılayıcı rolü olan lenfositlerdir ve CD8 yüzey molekülü taşırlar (CD4-, CD8+). T-lenfositlerin %65'i CD4, %35 kadarı CD8 ekspres etmektedir (18-22).

Fitohemaglutinin (PHA) uyarımı, uyarının şiddeti ve süresine göre, G₁ evresindeki T-lenfositleri, hücre döngüsünün diğer iki (S ve G₂) evresinden de geçirerek mitoz (M) sürükler. Farklı T-lenfosit tiplerinin ve AgNOR motiflerinin interfazdaki yapılarının benzerlik ve farklılıklarının neler olduğu bilinmemektedir. Ön çalışmalarımız, PHA uyarımından sonra, belli tip ve büyüklükteki insan lenfositlerindeki AgNOR motiflerinin çekirdek büyüklüğü ve çekirdek plazmasının boyanma şekline göre değiştiğini göstermiştir (Resim 1). Eğer, ön çalışma bulgularımızın gösterdiği gibi T-lenfosit alt gruplarından her birinin AgNOR motifleri, PHA uyarımının belli bir aşamasında sabit kalıyor ve birbirinden farklılık gösteriyorsa, çok daha basit ve ucuz olan AgNOR motifleri, hücre gruplarının belirlenmesinde başka bir seçenek olarak kullanılabilir. Ayrıca birbirleri ile ilintisiz gibi görünen rRNA genleri ile T-lenfosit yüzey antijenleri arasında henüz bilmediğimiz olası bir bağlantı ortaya çıkarılmış olacaktır. Bu nedenle, çalışmamızda, ilk kez çekirdek içindeki kromozom konumlanması (AgNOR motifleri) ile T-lenfosit alt grupları arasındaki görev ilişkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Örneklerin seçimi

Ekimi yapılacak kan veya izole edilmiş kan lökosit örnekleri 25 ile 30 yaşları arasında 4 sağlıklı gönüllüden alındı. Gönüllülerin hepsi kadın ve yaş ortalaması 25±5 yıl idi. Gönüllülerin sigara ve alkol kullanmayan, kahve alışkanlığı olmayan, son altı ayda şiddetli enfeksiyon ya da viral hastalık geçirmeyen, herhangi bir ilaç kullanmayan, bilinen genotoksik kimyasal bir ajana maruz kalmayan, hipertansiyon, diyabet, kalp, kanser gibi herhangi bir kronik hastalığı olmayan ve ailede kanser öyküsü olmayan kişiler olmasına dikkat edildi. Bu çalışma Helsinki İlkeler Deklarasyonuna uyularak gerçekleştirildi.

Kültür Ortamının Hazırlanması

Besi yeri, steril ortamda 100 mL'lik periferik kan medyum (Tam kan kültür medyum, Biological Industries, 01-198-1B) içersine 2,5 ml fitohemaglutinin (Biological Industries, 12-006-1H) ilave edilerek hazırlandı.

Tam Kan Kültür Tekniği

Steril ortamda 5 mL medyum içeren kültür tüplerine, yaklaşık olarak 0,4 mL kan örneği ilave edildi ve her denemede her bir kişi

için 2 tüpte kültür yapıldı. Kültürler, 37°C'lik etüvde 72 saat inkübe edildikten sonra, etüvden çıkartıldı. Santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldıktan sonra hipotonik (0,075 M KCl) solusyonu ile 37°C'de 10 ya da 20 dk muamele edildi. Daha sonra fiksatifle (3:1 oranında metanol:asetik asit) 2 kez yıkandı ve sonra preparatlar hazırlanarak havada kurumaya bırakıldı.

İzole Kan Kültür Tekniği

Tam kan kültür medyumuyla 4 mL heparinli kan seyreltildi ve 4 mL fikol-histopak üzerine yayıldı. 1300 rpm'de 25 dk. santrifüj edildi. Lökosit tabakası başka bir steril tüpe alındı. Üzerine hücre süspansiyonunun iki katı kadar medyum eklendi. 900 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak yıkandı. Üst kısmı atıldı ve üzerine başlangıçta eklenen medyum miktarı kadar yeniden medyum eklendi ve tekrar 900 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Hücreler 1 mL'sinde bir milyon hücre olacak şekilde, 5 mL medyum içeren flasklara tam kan kültür yöntemindeki gibi ekildi.

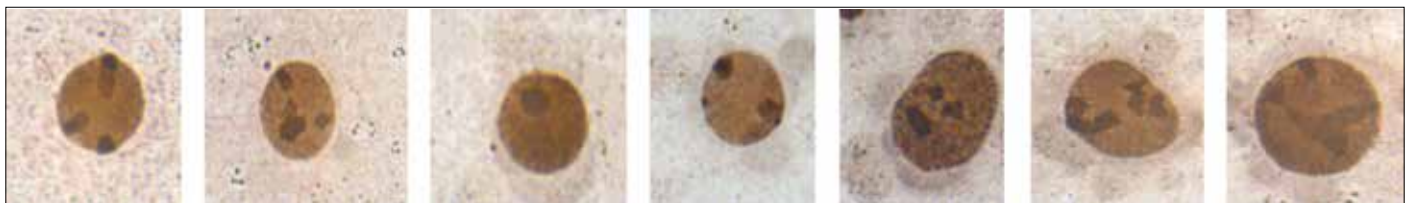
AgNOR boyanma motifi ve T-lenfosit alt grupları arasındaki ilişkiyi araştırmak için iki boyama yöntemi kullanıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Preparatlara kullanılan kitin prosedürüne uygun olarak boyama yapıldı (Neomarkers, kat no: MS-457-S). Sırasıyla, preparatlar 5'er dk distile suda ve sonra Fosfat Tampon Solüsyonunda (PBS) bekletildi. Lamların üzerine 50 veya 100 µL (lamın üzerini tamamen kapatacak şekilde) CD8 antikoru damlatıldı ve 1 saat bekletildikten sonra uygulanan işlemler ve bekleme süreleri sırasıyla aşağıdaki gibi idi: 10 dk PBS; 10 dk Biotin; 10 dk PBS; 10 dk Streptavidin; 10 dk Kromojen; 10 dk distile su; 5 dk Mayer hematoksilen; 5 dk distile su; 5'er dk sırasıyla %70'lik, %96'lık ve %99'luk etil alkol; 15 dk. Ksilol.

AgNOR Boyama Yöntemi

İmmünohistokimyasal olarak boyanmış preparatlar mikroskopta incelenerek, antikorla boyanmış, belirli ve düzgün şekilli hücrelerin şekilleri çizilip koordinatları alındıktan sonra aynı preparatlara AgNOR boyama yapıldı. AgNOR boyama için %50'lik AgNO₃ (Merck, kat no: K30474310 228) ve %2'lik jelatinli formik asit (jelatin, Merck, kat no: K32373978 336; formik asit, kat no: K30486663 216) çözeltileri hazırlandı. Preparatlar, distile su ile ıslatılmış kurutma kağıdının bulunduğu petri kabının içerisine yerleştirildi. Gümüş boyama solüsyonundan (2: 1 oranında %50'lik AgNO₃ ve %2'lik jelatinli formik asit karışımı) preparatın üzerine 3-4 damla (0,1-0,2 ml) damlatıldı ve üzeri lamelle kapatıldı. Etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılıp, 37°C'de etüvde 15 dk bekletildi. İnkübasyondan sonra etüvden çıkarılan preparatların üzerindeki lameller düşünceye kadar distile su ile yıkandı (6). Daha önce koordinatları alınan ve antikorla boyanmış olan hücreler, mikroskopta bulunup AgNOR boyanma motifi açısından karşılaştırıldı.



Resim 1. AgNOR boyama ile boyanmış insan lenfositlerindeki farklı NOR motifleri (x1000)

Sitosantrifüj Tekniğiyle Sitolojik Yayma Hazırlama: Tam kan kültür tekniğinden sonra hücreler santrifüjle yoğunlaştırılarak, hücre sedimenti elde edildi ve uygun teknikle lam üzerine yayıldı.

İmmünohistokimyasal boyama ve AgNOR boyamanın daha iyi olması için bulgularda belirtilen çeşitli denemeler yapıldı.

Bulgular

Tablo 1’de kültüre edilmiş periferik kan lenfositlerinden hazırlanan preparatlara uygulanan immünohistokimyasal ve AgNOR boyama yöntemleri gösterilmiştir.

Deneme 1: Hazırlanan kültür ortamlarında, alınan kan örnekleri, 72 saat kültüre edildi. İnkübasyondan sonra kültürle 0,075 M KCl (hipotonik) solüsyonu ilave edilerek etüvde bekletildi. Hipotonik atıldıktan sonra preparat hazırlanarak soğuk asetonla fiksasyon yapıp hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele edildi. CD8 antikorunu kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı. Boyanan preparatlar, mikroskopta incelendi. İmmünohistokimyasal olarak boyanma gerçekleşti. Sitoplazması belirgin, düzgün şekilli hücrelerin şekli çizilerek koordinatları alındıktan sonra aynı preparata AgNOR boyama yapıldı ve NOR boyamadan sonra karşılaştırma için preparatlar incelendiğinde, kaydedilen aynı hücrelerin hasar gördüğü, hücrelerin yapısının bozulduğu gözlemlendi.

Deneme 2: Hücrelerde meydana gelen hasarın sebebini araştırmak için, hücreler aseton yerine 3:1 oranında metanol: asetik asit ile fikse edilerek deneme 1’deki aynı işlemler yapıldı. İmmünohistokimyasal olarak boyama gerçekleşmedi.

Deneme 3: Hücrelerde meydana gelen hasarın damlatma yöntemi ile preparatların hazırlanmasından kaynaklanabileceği düşünülerek, preparatlar yayma yöntemi kullanılarak hazırlandı. Ancak bu yöntemle de hücrelerin daha çok hasar gördüğü ve parçalandığı gözlemlendi. Yayma yönteminin uygun olmadığına karar verildi.

Deneme 4: Hücrelerde meydana gelen hasarın hipotonikte uzun süre kalmasından kaynaklanabileceği düşünülerek, hipotonikte bekleme süresi azaltıldı. İmmünohistokimyasal olarak boyama yapıldıktan sonra aynı preparatlara AgNOR boyama yapıldı. Preparatlar incelendiğinde, aynı hücrelerin yapısının bozulduğu, çekirdeklerin parçalandığı, NOR proteinlerinin hasar gördüğü gözlemlendi.

Deneme 5: H_2O_2 ’nin hücrelere zarar verip vermediğini belirlemek için, preparatlar antikorla muamele edilmeden H_2O_2 ile muamele edildi. Preparatlar distile sudan geçirildikten sonra AgNOR boyama yapılarak mikroskopta incelendi. Hücrelerin sağlam olduğu, çekirdeklerinin zarar görmemiş olduğu gözlemlendi ve H_2O_2 ’in hücreler üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığına karar verildi.

Deneme 6: PBS’in hücrelere zarar verip vermediğini belirlemek için, preparatlar antikorla muamele edilmeden, AgNOR boyama yapıldıktan sonra PBS ile muamele edildi ve mikroskopta incelendi. Boyanan NOR bölgelerinin solduğu, ancak hücrelerin ve çekirdeklerinin bozulmadığı, sağlam kaldığı gözlemlendi.

Deneme 7: CD8 ve AgNOR boyama yapılmadan, fiksasyon için kullanılan asetonun preparatlar üzerinde etkisi olup olmadığını belirlemek için, hücreler asetonla fikse edilip mikroskopta incelendi. Asetonun hücrenin yapısını bozduğu gözlemlendi ve fiksasyon işlemi için diğer denemelerde asetonun kullanılmamasına karar verildi.

Deneme 8: CD8 ve AgNOR boyama yapılmadan, fiksasyon için kullanılan metanol: asetik asit karışımının hücreler üzerinde etkisi olup olmadığını anlamak için, hücreler bu fiksatifle muamele edildi ve mikroskopta incelendi. Kullanılan fiksatifin hücrenin yapısını bozduğu gözlemlendi ve fiksasyon işlemi için diğer denemelerde bu fiksatifin kullanılmamasına karar verildi.

Deneme 9: Fiksatif olarak kullanılan $-20^\circ C$ ’de bekletilmiş %0,3’lük H_2O_2 içeren metanolün hücreler üzerindeki etkisini belirlemek için hücreler bu fiksatifle muamele edildikten sonra immünohistokimyasal boyama yapıldı. Kullanılan fiksatifin hücrelerin yapısını bozduğu gözlemlendi.

Deneme 10: Sitosantrifüj yöntemi kullanılarak hazırlanan preparatlarda hücrelerin daha sağlam olabileceğini düşünerek, preparatlar bu yöntemle hazırlandı ve immünohistokimyasal olarak boyandı. Hücrelerin sayısının azaldığı, hücrelerin yapısının ve görünümünün bozulduğu gözlemlendi.

Deneme 11: CD8 ve AgNOR boyama yapılmadan, fiksasyon için kullanılan $-20^\circ C$ ’de bekletilmiş metanolün hücreler üzerinde etkisi olup olmadığını anlamak için, hücreler bu fiksatifle muamele edilip mikroskopta incelendi. Preparatın üzerinin tamamen eritrositle kaplandığı, hücrelerin (lenfositlerin) görünmediği gözlemlendi.

Deneme 12: CD8 ve AgNOR boyama yapılmadan, fiksatif olarak %0,3’lük H_2O_2 içeren oda ısısındaki metanolün hücreler üzerindeki etkisini belirlemek için hücreler bu fiksatifle muamele edildi. Mikroskopta incelendiğinde, preparatın üzerinin tamamen eritrositle kaplandığı, hücrelerin (lenfositlerin) görünmediği gözlemlendi.

Deneme 13: Bu denemede, hem fiksatif ($+4^\circ C$ ’de bekletilmiş soğuk metanol), hem H_2O_2 hem de PBS’in hücreler üzerinde etkilerini belirlemek için sırasıyla her biriyle muamele edilip mikroskopta incelendi. Hücreler tüp içinde fiksatif ile muamele edildikten sonra, hücrelerin güzel görüldüğü, şekillerinin bozulmamış olduğu gözlemlendi. Preparatlar, H_2O_2 ile muamele edildiğinde H_2O_2 ’nin hücrelere zarar vermediği, hücrelerin iyi görüldüğü gözlemlendi. Daha sonra aynı preparatlar PBS ile muamele edildiğinde, hücrelerin şeklinin bozulduğu ve preparatın yüzeyinin kristallerle kaplandığı gözlemlendi. PBS’in kullanılmamasına karar verildi.

Deneme 14: Tüpte fiksasyon işleminde, %0,3 H_2O_2 içeren metanolün hücreler üzerindeki etkisini belirlemek üzere hipotonik aşamasından sonra tüplere bu fiksatif eklendi. Hücrelerin çamur görünümünü alıp, dibe çöktüğü gözlemlendi.

Deneme 15: Tüpte fiksasyon işleminde, $-20^\circ C$ ’de bekletilmiş metanolün hücreler üzerindeki etkisini belirlemek için hipotonik aşamasından sonra tüplere bu fiksatif eklendi. Hücrelerin çamur görünümünü alıp, dibe çöktüğü gözlemlendi.

Deneme 16: Şimdiye kadar yapılan denemeler aynı kişinin kanı ile yapılmıştı. Kişiye bağlı değişiklik olup olmadığını belirlemek için bu denemede farklı bir kişiden kan alınarak çalışıldı. Hipotonik aşamasından sonra 1. tüpteki hücreler $+4^\circ C$ ’de bekletilmiş soğuk metanol ile fikse edildiğinde hücrelerde çökmenin olmadığı, 2. tüpteki hücreler $-20^\circ C$ ’de bekletilmiş metanol ile fikse edildiğinde hücrelerin çamur görünümünü alıp dibe çöktüğü, 3. tüpteki hücreler $-20^\circ C$ ’de bekletilmiş %0,3 H_2O_2 içeren metanol ile fikse edildiğinde hücrelerin çamur görünümünü alıp dibe çöktüğü gözlemlendi.

Tablo 1. Kültüre edilmiş periferel kan lenfositlerinden hazırlanan preparatlara uygulanan immünohistokimyasal ve AgNOR boyama yöntemleri

Deneme	0.075M KCl (hipotonik) (dk)	Fiksasyon (tüpte)	Preparat Hazırlama (damlatma)	Fiksasyon (Lamda)	Distile su (dk)	H ₂ O ₂ (dk)	Antikorla Boyama	AgNOR Boyama	PBS (dk)
1	20	-	+	aseton	5	10	CD 8	+	-
2	20	3:1 metanol: asetik asit	+	-	5	10	CD 8	-	-
3	20	-	yayma	aseton	5	-	CD 8	-	-
4	10	-	+	aseton	5	-	CD 8	+	-
5	20	3:1 metanol: asetik asit	+	-	5	10	-	+	-
6	20	3:1 metanol: asetik asit	+	-	-	-	-	+	10
7	20	-	+	aseton	5	-	-	-	-
8	10	-	+	3:1 metanol: asetik asit	-	-	-	-	-
9	10	-	+	%0.3 H ₂ O ₂ 'li metanol (-20°C)	-	-	CD 8	-	-
10	10	-	sitosantrifüj	-	-	-	CD 8	-	-
11	10	-	+	Soğuk metanol (-20°C)	-	-	-	-	-
12	10	-	+	%0.3 H ₂ O ₂ 'li metanol	-	-	-	-	-
13	10	Soğuk metanol (+4°C)	+	-	-	10	-	-	5
14	10	%0.3 H ₂ O ₂ 'li metanol	-	-	-	-	-	-	-
15	10	Soğuk metanol (-20°C)	-	-	-	-	-	-	-
16	10	1. Soğuk metanol (+4°C) 2. Soğuk metanol (-20°C) 3. %0.3 H ₂ O ₂ 'li soğuk metanol(-20°C)	-	-	-	-	-	-	-
17*	10	1. soğuk metanol (+4°C) 2. oda ısısındaki metanol	+	-	-	-	-	-	-
18**	10	soğuk metanol (+4°C)	+	-	-	-	CD1A, CD5, CD38, CD43, CD57	-	-
19**	10	soğuk metanol (+4°C)	+	-	-	-	CD 8	-	-
20	10	soğuk metanolle (+4°C)	+	-	5	10	CD 8	+	-

*Tam kan ve izole kan kültürü teknikleri kullanılarak kültür yapıldı.
**İzole kan kültür tekniği kullanılarak kültür yapıldı

Deneme 17: Farklı kan kültürü yöntemlerinin ve farklı sıcaklıktaki fiksatiflerin hücrelerdeki etkilerini belirlemek üzere aynı kişiye ait kan örneğinden 2 tüpte izole kan kültürü ve 2 tüpte tam kan kültürü yapıldı. Hipotonik aşamasından sonra her iki kültür tüplerinden biri +4°C'de bekletilmiş soğuk metanolle, diğeri ise oda sıcaklığında bekletilmiş metanolle fikse edildi. Her iki kan kültür yönteminde de soğuk metanolle fikse edilen hücreler belirgin ve iyi görünüm- lü iken oda sıcaklığındaki metanolle yıkanan tüplerde dipte çökelti oluştu. Fiksasyon işlemi için +4°C'de bekletilmiş soğuk metanolle hücrelerin tüp içinde fikse edilmesinin uygun olduğuna karar verildi.

Deneme 18: Laboratuarda bulunan diğer CD1A, CD5, CD38, CD43 ve CD57 antikorlarla NOR motifleri arasında ilişki olup olmadığını araştırmak üzere izole kan kültürü yapıldı. İmmünohistokimyasal boyamadan sonra preparatlar mikroskopta incelendi. Hücrelerin

immünohistokimyasal olarak boyanmadığı gözlemlendi. Bu antikor- larla tekrar boyama yapılmasının gerekli olmadığına karar verildi.

Deneme 19: İzole kan kültür yönteminde kişiler arası farklılık olup olmadığını belirlemek için, iki ayrı kişiye ait kan örneklerin- den izole kan kültürü yapıldı. Hücreler, +4°C'de bekletilmiş soğuk metanol ile tüp içinde fikse edildi. Hazırlanan preparatların im- münohistokimyasal olarak CD8 antikor ile boyanmadığı gözlemlendi.

Deneme 20: Denemeler sonunda tam kan kültür yönteminin, kültürden sonra 10 dk hipotonik solusyonunda bekletilmesinin, +4°C'de bekletilmiş soğuk metanolle tüp içinde fiksasyonun, hazırlanan preparatların önce 10 dk H₂O₂'de ve sonra da 5 dk distile suda bekletilmesinin daha uygun olduğuna karar verildi. Bu den- emeye göre hazırlanan preparatlar, immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak CD8 antikor ile boyandı. Sitoplazması belir-

gin, düzgün şekilli hücrelerin şekli çizilerek koordinatları alındıktan sonra aynı preparatlara yapılan AgNOR boyama sonucunda yine hücrelerin sağlam, bozulmamış, hasar görmemiş olduğu gözlemlendi.

İmmünohistokimyasal ve AgNOR boyaması yapılan preparatlarda belli bir AgNOR motifi olan hücrelerin, (Resim 1) CD8 antikorla boyanan çekirdek bölgeleri ile AgNOR alanları karşılaştırıldı. AgNOR motifleri belirgin olan bütün hücreler değerlendirildi. Ancak beklenildiği gibi tek bir AgNOR motifinde CD8 antikor ile boyanmanın görülmediği, aksine birçok farklı AgNOR motifinde CD8 antikor ile boyanmanın olduğu gözlemlendi.

Tartışma

Nükleer organize edici bölgeler insanda 5 çift akrosentrik kromozomun ikincil boğum denilen satellit saplarında yerleşik rRNA gen ailesidir (5). İfade olan aktif NOR'ların interfaz ve metafazdaki konumları, AgNOR boyama ile basitçe ve kısa bir süre içinde tutarlı bir şekilde gösterilebilmektedir (6, 7). İnterfazdaki AgNOR boyama, NOR + durumdaki akrosentriklerin çekirdek içindeki toptan konumlarını da gösterir ve çekirdekçikle birlikte bulunurlar. Çekirdekçik yapısı da sabit olmayıp, hücrenin interfazdaki evrelerine göre sürekli bir değişim içindedir (8). Daha önceki mitojenle uyarılmış total kan kültürü veya izole kan kültürü çalışmalarımızda, 1000X büyütme ile interfazdaki AgNOR boyanma şekillerine baktığımızda en az 3 çeşit kararlı görünen boyanma motifi ile karşılaşmaktaydık; ancak bunların ne tür hücrelere karşılık geldiklerini bilmemekteydik. PHA uyarımından sonra, belli tip ve büyüklükteki insan lenfositlerindeki AgNOR motiflerinin çekirdek büyüklüğü ve çekirdek plazmasının boyanma şekline göre değiştiğini de belirlemiştik. Ön bulgularımıza göre, T-lenfosit alt gruplarından her birinin (T4, T8, vb.), PHA uyarımının belli bir aşamasında, bu AgNOR motifleri sabit kalır ve farklı alt gruplara göre birbirlerinden de farklılık gösterirse, hücre alt gruplarının belirlenmesinde kullanılan dışarıdan ithal edilen floresan işaretli etiketler yerine çok daha basit ve ucuz olan AgNOR motiflerinin başka bir seçenek olarak kullanılabilirliği düşünüldü. Bu çalışmada yapılan denemelerimiz sonucunda, bizim beklediğimiz gibi tek bir AgNOR motifinde (çekirdekçik tipinde) CD8 antikor ile boyanmanın görülmediği, aksine birçok farklı çekirdekçik şekillerinde CD8 antikor ile boyanmanın gerçekleştiği gözlemlendi. Dolayısıyla AgNOR boyama ile oluşan değişik tipteki AgNOR motifleri ile T-lenfosit alt grupları arasında bir bağlantı olmadığı sonucuna varıldı.

Sonuç

İlk kez AgNOR motifleri ile T-lenfosit alt grupları arasındaki ilişki araştırılmıştır ve gözlenen AgNOR motiflerinin T-lenfosit alt gruplarına spesifik olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak, lenfosit alt gruplarının daha sağlıklı saptanabilmesi için gerekli monoklonal antikor kombinasyonları oluşturularak çalışmanın genişletilmesi ile daha iyi sonuçlar elde edilebilir. Sonuçlarımızın desteklenmesi için konuyla ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Yazarlık katkıları: Fikir ve deneylerin tasarlanması: HD, HA; Deneylerin uygulanması: NB, ZH; Verilerin analizi: HA, NB Yazının hazırlanması: NB, HA, FÖ. Tüm yazarlar yazının son halini okumuş ve onaylamıştır.

Kaynaklar

1. Comings DE. Arrangement of chromatin in the nucleus. *Hum Genet* 1980; 53(2): 131-43. [\[CrossRef\]](#)
2. Ferguson M, Ward DC. Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma* 1992; 101(9): 557-65. [\[CrossRef\]](#)
3. Derenzini M, Farabegoli F, Pession A, Novello F. Spatial redistribution of ribosomal chromatin in the fibrillar centre of human circulating lymphocytes after stimulation of transcription. *Exp Cell Res* 1987; 170(1): 31-41. [\[CrossRef\]](#)
4. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron* 2000; 31(2): 127-31. [\[CrossRef\]](#)
5. Hernandez-Verdun D. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol*. 2006; 125(1-2): 127-37. [\[CrossRef\]](#)
6. Demirtas H, Imamoğlu N, Donmez H, Cücer N, Yılmaz A, Candemir Z. Condensed chromatin surface and NORs surface enhancement in mitogen-stimulated lymphocytes of Down syndrome patients. *Ann Genet* 2001; 44(2): 77-82. [\[CrossRef\]](#)
7. Imamoğlu N, Demirtas H, Donmez-Altuntas H, Ilten A. Higher NORs-expression in lymphocyte of trisomy 21 babies/children: in vivo evaluation. *Micron* 2005; 36(6): 503-7. [\[CrossRef\]](#)
8. Demirtas H, Candemir Z, Cücer N, İmamoğlu N, Dönmez H, Bökesoy I. Essay on the nucleoli survey by the α and β - satellite DNA probes of the acrocentric chromosomes in mitogen-stimulated human lymphocyte. *Ann Génét* 2000; 43(2): 61-8. [\[CrossRef\]](#)
9. Strouboulis J, Wolffe AP. Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci* 1996; 109(Pt 8): 1991-2000.
10. Cremer T, Kreth G, Koester H, Fink RH, Heintzmann R, Cremer M, et al. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000; 10(2): 179-212. [\[CrossRef\]](#)
11. Sun HB, Shen J, Yokota H. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophysical J* 2000; 79(1): 184-90. [\[CrossRef\]](#)
12. Wang RF. Functional control of regulatory T cell and cancer immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology* 2006; 16(2): 106-14. [\[CrossRef\]](#)
13. Ostrand-Rosenberg S. CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest* 2005; 23(5): 413-9. [\[CrossRef\]](#)
14. Gerloni M, Zanetti M. CD4 T cells in tumor immunity. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 27(1): 37-48. [\[CrossRef\]](#)
15. Knutson KL, Disis ML. Augmenting T helper cell immunity in cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5(4): 365-71. [\[CrossRef\]](#)
16. Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4+ regulatory cells as a potential immunotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; 360(1461): 1647-61. [\[CrossRef\]](#)
17. Lopez M, Aguilera R, Perez C, Mendoza AN. The role of regulatory T Lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines. *Immunobiology* 2006; 211(1-2): 127-36. [\[CrossRef\]](#)
18. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Antigen processing and presentation to T lymphocytes. *Cellular and Molecular Immunology*, WB Saunders Comp. USA, second ed. 115-35, 1994.
19. Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Diker KS. İmmunoloji. 1 baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, s.119-150, 1994.
20. Diker KS. İmmunoloji. 1. Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara. s.22-59, 1998.
21. Stites DP, Terr AI. Basic and Clinical Immunology. 7th Ed., Appleton&Lange, Connecticut, p.16-77, 1991.
22. Hirik E. Mesane tümörlü hastalarda immün sistemin değerlendirilmesi ve diğer ürolojik tümörlerle karşılaştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Üroloji Kliniği Klinik Şefi: Prof. Dr. Selami ALBAYRAK. İstanbul, 2006. (Uzmanlık Tezi).