

FİTOHEMAGGLÜTİNİN KONSANTRASYONUNUN DOWN SENDROMLU VE SAĞLIKLI BİREYLERİN LENFOSİTLERİNDEKİ MİTOTİK İNDEKSLERİNE ETKİSİ

Effect of the Phytohemagglutinin Concentration on the Mitotic Indexes of Down Syndrome and Healthy Individuals' Lymphocytes

Nalan İMAMOĞLU¹, Halil DEMİRTAŞ²

Özet : İnsan periferik kan T-lenfositlerinin mitozaya yönlendirilmesi ve kromozom analizlerinde birim hacimdeki büyüme ortamına eklenen fitohemagglütinin (FHE) miktarı bir laboratuardan diğerine göre önemli ölçüde değişmektedir. Bunun nedeni bilinmemekte ve literatürde de bu konuda yeterli bir bilgiye ulaşılamamaktadır. Alışılmış periferik kan kültürü (72 saat) ve kromozom hazırlama işlemi, yaşları 0-8 yıl arasında değişen Down Sendrom (DS) 'lu hasta (N=30) ve sağlıklı kontrollerinden (N=24) alınan kan örneklerinin, aynı fakat konsantrasyonu gittikçe artan şekilde: 0.37 ml, 0.75 ml, 1.48 ml ve 2.21 ml FHE /100 ml'lik ortam'lara ekilmesi ile yapılmıştır. FHE'nin dört farklı konsantrasyonunu içeren dört farklı ortamdan elde edilen her bir preparatta Mitotik indeks (Mİ) 'ler, birey ve konsantrasyon başına 5000- 6000 uyarılmış lenfositler sayılarak yüzde (%) olarak belirlendi. Hem DS'lu, hem de kontrol gruplarının genel ortalamaları alındı. Bireyler arasında önemli farklılıklar görülmesine karşın, kültür ortamında FHE konsantrasyonunun artış yönüne doğru (%0.37, %0.75, %1.48, ve %2.21) lenfositlerdeki Mİ'lerin genel ortalamaları karşılıklı olarak; 30 DS'lu'da %4.20±1.73, %4.57±1.31, %4.69±1.19 ve %4.19±1.11 iken 24 kontrolde %4.37±1.67, %5.06±1.60, %5.01±1.47 ve %4.98±1.43 olarak bulundu. Sonuçta, Biological Industries (İsrail) ürünleri kullanıldığında, % 1-1.5 hacim/hacim FHE, hem DS'lu, hem de kontrollerin kan kültürleri için optimum (hem etkin hem de tutumlu) bulundu.

Anahtar kelimeler: Down sendromu, fitohemagglütinin (FHE), FHE konsantrasyonu, lenfosit, mitotik indeks

Summary : The amount of phytohemagglutinin (PHA) amount added to the growing medium in unit volume of human peripheral blood T-lymphocytes induced mitosis and at chromosome analysis varies significantly from one laboratory to another. The reason for this variation is not known, and in literature adequate information on this subject is not available. Conventional peripheral blood culture (72h) and chromosome preparation procedure have been used except that blood samples from Down syndrome (DS) patients (N=30) and healthy controls (N=24), with the age range of 0-8 years, have been cultivated in the same but gradually increasing PHA concentration containing: 0.37 ml, 0.75 ml, 1.48 ml and 2.21 ml of PHA / 100 ml of medium. Mitotic indexes (MIs) of each specimen obtained from four separate media with four different concentrations of PHA were determined as percentage (%) by screening from 5.000 to 6.000 stimulated lymphocytes per concentration per individual. Overall means MIs of both DS and control groups were taken. Although considerable inter-individual variations were apparent, overall means of MIs in lymphocytes according to the gradient of PHA concentration (0.37%, 0.75%, 1.48%, and 2.21%) in culture medium were found as 4.20±1.73%, 4.57±1.31%, 4.69±1.19%, and 4.19±1.11% for 30 DS patients and 4.37±1.67%, 5.06±1.60%, 5.01±1.47%, and 4.98±1.43% for 24 healthy individuals, respectively. In conclusion, When the Biological Industries (Israel) products are used, 1-1.5 % volume/volume PHA was found optimum (both effective and economic) for the blood cultures of both DS patients and healthy controls.

Key words: Down syndrome, lymphocyte, mitotic index, phytohemagglutinin (PHA), PHA concentration

¹ Bilim Doktoru.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Tıbbi Biy.AD, Kayseri

² Prof.Dr.Erc.ÜN.Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

Mitojenle lenfosit uyarımı sık kullanılan bir laboratuvar uygulaması olmasına karşılık kullanılan uyarıcının örneğin FHE' nin derişimi laboratuvarlara / çalışma gruplarına göre önemli ölçüde değişmekte-

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 01.11.06 nolu proje ile desteklenmiştir.

dir. Bunlardan birkaç örnek vermek gerekirse; Morimoto ve arkadaşları (1984) % 3 hacim/hacim (1), Park ve arkadaşları (2000) % 2 hacim/hacim (2), Anderson ve arkadaşları (1988) % 1 hacim/hacim (3) ölçülerinde FHE kullanmışlardır. İnsan ve özellikle de bebek lenfositlerinin uyarımında yararlanılabilecek optimum FHE derişimini belirten kapsamlı bir çalışmaya da erişilememektedir. Oysa koyunlarda (4), sığır at ve köpeklerde (5) bazı kuşlarda (6, 7) kullanılabilecek optimum FHE derişimleri yeterince çalışılmıştır.

Ayrıca, kullanılan FHE nin tek hedefinin lenfositleri mitozu teşvik olmasına karşılık, bu maddenin hangi formda (M formu, P formu..) bulunduğu/bulunacağı da çalışan kişilere göre değişmektedir. FHE derişiminin laboratuvarlar arasında standartlaştırılması bazı analiz sonuçlarının güvenilirliği için de gereklidir; çünkü bunlardan bazılarının örneğin DS'luların NOR sonuçları, ortamdaki FHE miktarına göre değişmektedir (8, 9). Erişkinlerdeki lenfosit aktivitelere, alkol, sigara, doğum kontrol hapları kullanımı, yaş, hormonal aktivite farklılıkları ve bu farklılıkların döngüsel değişimleri de etki etmektedirler (3, 10). Bebeklerde bu parametrelerin hemen hemen tamamı sabittir ve sonuçlar da çok daha güvenilir bulgular olacaktır.

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

GEREÇ VE YÖNTEM

Down sendromlu hasta ve kontrol gruplarının belirlenmesi : Tıbbi Genetik ünitesi ve Pediatri Anabilim Dalı'na Down Sendromu şüphesi ile başvuran 0-8 yaş arası bireylerin periferik kanından lenfosit kültürü yapıldı ve kültür sonucunda elde edilen preparatlar G-bandlama yöntemi kullanılarak analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda sadece 47,XX/XY+21 karyotipine sahip olan 30 birey mitotik indeks yönünden kontrol grubu ile karşılaştırmak üzere seçildi. Yine Pediatri Anabilim Dalı'nda yapılan muayenede hiç bir anomalisi bulunmayan, G-bandlama yöntemi ile yapılan kromozom analizi sonucunda da herhangi bir kromozom kusuru görülemeyen ve 46,XX/XY karyotipine sahip olan 0-8 yaş arası 24 kişi de kontrol grubu olarak belirlendi.

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

Kültür ortamı, kültür koşulları ve preparatların hazırlanması : Fitohemaglutinin derişiminin mitotik indekse etkisini incelemek üzere, 100 ml'lik Ham's F10 medium (Biological Industries, , Kibbutz Beit, Haemek 25115 -İsrail, [kısaca Bİ] Kat. No: 01-090-1B) içerisine; 30ml Fetal Calf Serum (Bİ, Kat. No: 04-001-1B), 1 ml L-Glutamin (Bİ, Kat. No: 03-020-1B), 1ml Penisilin-Streptomisin(Bİ, kat no: 03- 031-1C) ve 1ml Heparin (nevparin, 5000 IU/ml, M.Nevzat ilaç sanayi A.Ş)'den sonra her bir ekim ortamının üzerine 0.5 ml, 1 ml, 2 ml ve 3 ml FHE- M (Bİ, Kat. No: 12-006-1H) eklenerek 4 farklı kültür ortamı hazırlandı. Buna göre, FHE'nin 4 farklı kültür ortamındaki konsantrasyonu (hacim/hacim) sırasıyla; % 0.37, 0.75, 1.48 ve 2.21 olarak belirlendi.

Down Sendromlu ve Sağlıklı bireylerden steril şartlarda 1/10-1/20 oranında 2-3 ml heparinize periferik kan alındı ve 4 farklı kültür ortamına ekildi. 37 °C'de 72 saatlik inkübasyona bırakılan lenfosit kültür ortamına 70. saatte final konsantrasyonu 0.1 µg/ml olacak şekilde kolşisin (Bİ, Kat. No: 12-004-1D) eklendi. 72. saatte etüvden çıkarılan kan kültürlerine rutin hipotonik ve 3:1 oranında metanol:asetik asitten oluşan fiksasyon işlemleri uygulandı. Fiksasyon sonucunda elde edilen hücre süspansiyonlarından hazırlanan preparatlar kurutulduktan ve gereğinde eskitildikten sonra istenilen bantlama yöntemi uygulandı ve kontrollerden sonra analiz için lamelle kapatılıp saklandı.

FHE Konsantrasyonuna Göre Mitotik İndeks Değişiminin Değerlendirilmesi

FHE konsantrasyonunun mitotik indekse (Mİ) etkisini incelemek üzere FHE derişimleri hacim/hacim cinsinden % 0.37, % 0.75, %1.48 ve % 2.21 olan 4 farklı kültür ortamı hazırlandı. 30 DS'lu ile aynı yaş grubundan 24 kontrolün her birinin kanları bu farklı FHE konsantrasyonundaki ortamlara ekildiler. 70. saatte başlayan rutin işlemlerden sonra her bireyin farklı ortamlardaki Mİ'leri, ışık mikroskopu altında her konsantrasyondan (preparattan) 5000- 6000 uyarılmış lenfosit sayılarak mitoz geçiren hücrelerin % leri belirlendi. Uyarılmış lenfositler görsel olarak iki özellikleri ile değerlendirildiler: genişlemiş çekirdek (çapı= $\geq 12\mu$) ve genişlemiş çekirdekçik. Böylece her iki grubun da FHE konsantrasyonuna göre Mİ'leri bulundu.

FHE konsantrasyonunun Mİ'e etkisini belirlemek için, hem DS'lu hem de kontrol gruplarında genel ortalamalar alınmış ve sonuçların istatistiksel karşılaştırılması, gruplar arasında Student-t testi, gruplar içinde de tekrarlı ölçümlerde Anova testi kullanılarak yapılmıştır. Dağılımların normal dağılım gösterip göstermediği (çan eğrisine uyup uymadığı) istatistiksel olarak One-Sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak analiz edilmiş ve dağılımların normal dağılıma uygunluk gösterdiği saptanmıştır.

BULGULAR

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

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

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

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

Tablo I. 30 DS'luda FHE konsantrasyonuna göre Mİ değerleri (%)

Hasta	Yaş	Cins	% Mİ (ml FHE / 100 ml'lik ortam)			
			0.37 ml (%)	0.75 ml (%)	1.48 ml (%)	2.21 ml (%)
1) KT	8 aylık	E	2.66	3.88	6.73	4.68
2) UA	2 aylık	E	1.15	2.47	3.15	4.16
3) TB	13 günlük	K	2.18	2.22	2.83	3.53
4) BK	1 aylık	K	2.86	5.49	7.14	5.14
5) İK	1 aylık	E	2.68	4.28	4.46	4.49
6) MK	5.5 aylık	E	3.42	4.20	3.77	2.90
7) İÜ	1 aylık	E	5.12	4.94	4.62	4.20
8) KB	~1 aylık	K	4.04	4.60	5.52	4.43
9) AS	~1 yıl	K	1.87	3.55	3.74	2.61
10) SD	~1 yıl	K	5.41	enfeksiyon	6.89	7.81
11) LT	2 aylık	K	4.65	4.29	4.47	3.43
12) DB	Premature	K	4.37	4.30	4.95	4.52
13) SÇ	1 yıl	K	4.72	5.26	5.58	5.59
14) KT	~1 yıl	K	1.18	3.41	3.46	2.97
15) SE	6 aylık	E	1.56	5.31	5.57	2.73
16) LG	6 aylık	K	3.52	4.01	3.50	3.50
17) AL	~2 aylık	E	3.43	3.51	3.59	3.66
18) FP	8 yıl	E	5.78	5.50	5.18	5.19
19) KK	3 yıl	K	3.23	4.14	3.91	3.64
20) EP	18 günlük	E	6.41	4.16	4.63	4.20
21) EB	~1 aylık	E	4.85	3.30	3.40	3.44
22) FE	13 aylık	E	5.49	3.92	4.07	4.11
23) FK	4 aylık	K	3.71	4.83	4.02	3.17
24) BE	6 aylık	K	5.31	3.91	3.99	4.00
25) BN	1.5 yıl	K	6.21	5.65	5.44	5.43
26) YD	9 aylık	E	4.45	5.00	4.97	4.33
27) AT	3 aylık	E	6.34	4.64	4.14	3.27
28) MB	3.5 aylık	E	5.25	5.73	3.95	3.43
29) SN	10 aylık	K	5.73	7.57	6.29	5.59
30) MS	9 aylık	E	8.27	8.55	6.74	5.60
Genel Ortalama			4.20±1.73	4.57±1.31	4.69±1.19	4.19±1.11

Her satırdaki rakamlar, FHE konsantrasyonuna göre her bir konsantrasyondan yaklaşık 5000-6000 bireysel olarak sayılmış hücre ortalamalarını göstermektedir. Genel ortalamalar en alt satırda $X \pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

Tablo II. 24 kişilik kontrol grubunda FHE konsantrasyonuna (% v/v) göre Mİ değerleri (%)

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

Her satırdaki rakamlar, FHE konsantrasyonuna göre her bir konsantrasyondan 5000-6000 uyarılmış lenfosit sayılarak, metafazları % olarak verilmiştir. Genel ortalamalar en alt satırda $X \pm$ standart sapma şeklinde görülmektedir.

30 DS'lu ve 24 Sağlıklı bireyin, FHE konsantrasyonuna göre Mİ değerlerinin genel ortalamaları yüzde (%) olarak Tablo III'de verilmiştir.

Tablo III, 30 DS'lu ve 24 sağlıklı bireyde bulunan Mİ genel ortalamalarının, kültür ortamındaki FHE konsantrasyonu ile birlikte önemli ölçüde artmadığını göstermektedir. Mİ'lerin genel ortalamaları kontrollerde % 0.75'lik FHE konsantrasyonundan itibaren bir plato oluşturmakta ve bu plato hafif

azalarak da olsa % 2.21'lik FHE konsantrasyonuna kadar sürmektedir. DS'lu'larda ise genel ortalamalar bir çeşit çan eğrisi göstermekte ve maksimum Mİ, FHE nin % 0.75 lik ile % 1.48 lik değerleri arasında bulunmaktadır. Grup içi yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, DS'lu ve sağlıklı bireylerde FHE'nin en düşük konsantrasyonu ile en yüksek konsantrasyonu arasında Mİ açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo III. DS'lu ve sağlıklı kontrollerinin her bir FHE konsantrasyonuna göre genel Mİ ortalamaları (ml FHE/100 ml'lik ortam'da)

Grup	N	0.37 ml FHE (%) (X ± SS)	0.75 ml FHE (%) (X ± SS)	1.48 ml FHE (%) (X ± SS)	2.21 ml FHE (%) (X ± SS)	F	p
DS	30	4.20±1.73	4.57±1.31	4.69±1.19	4.19±1.11	0.010	0.921
Kontrol	24	4.37±1.67	5.06±1.60	5.01±1.47	4.98±1.43	1.162	0.284
N: Birey sayısı.		t=0.366	t=1.232	t=0.871	t=2.275		
*p<0.05		p=0.715	p=0.224	p=0.388	*p=0.027		

Gruplar arası yapılan istatistiksel değerlendirmede ise, DS'lu ve sağlıklı bireylerin Mİ genel ortalamaları, FHE'nin her bir konsantrasyonunda karşılaştırılmış ve FHE'nin % 0.37, 0.75 ve 1.48'lik konsantrasyonlarında Mİ açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$). % 2.21'lik FHE konsantrasyonunda ise, sağlıklı bireylerin DS'lu bireylere göre daha fazla Mİ artışı gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

TARTIŞMA

İnsan lenfositlerinin mitozaya yönlendirilmesi ve kromozom analizlerinde birim hacimdeki büyüme ortamına eklenen FHE miktarı, bir laboratuardan diğerine göre önemli ölçüde değişmektedir. Bunun nedeni bilinmemekte ve literatürde de bu konuda yeterli bir bilgiye ulaşılamamaktadır. Bireyler arasında önemli farklılıklara karşılık, FHE'nin % 0.37, 0.75, 1.48 ve 2.21'lik (hacim/hacim) konsantrasyonlarında artış yönüne doğru sıralandığında, % mitotik indekslerinin genel ortalamaları karşılıklı

olarak sırasıyla 30 DS'lu'da % 4.20±1.73, 4.57±1.31, 4.69±1.19, 4.19±1.11 iken 24 kontrolde % 4.37±1.67, 5.06±1.60, 5.01±1.47 ve 4.98±1.43 olarak bulunmuştur. FHE konsantrasyonunun belli bir değerinden itibaren görülen Mİ azalmaları, FHE reseptörlerinin bu noktada doymuş olmaları ve daha fazla FHE nin bu birey lenfositlerine olası toksik etkileri ile açıklanabilir. FHE artışından fazla etkileneden sabit Mİ gösteren hücrelerin davranışlarına da bireysel farklılıklardan başka bir açıklama getirememekteyiz.

Anderson ve arkadaşları (1988), trisiumlu timidin ve FHE- P (bazen de FHE-R ve hiç birinin özellikleri ve üreticisi belirtilmemiş) kullanarak 4 erişkin bireyde 46-48. saatten itibaren 18 saat içindeki timidin tutulumunun 1-5 ml/ml arasındaki FHE derişiminde maksimum olduğunu bulmuşlardır (3). Ancak kullanılan yöntemin başkalığı, bizim kullandığımız FHE'nin M formundan farklı olarak P ve R formlarının kullanılmış olması, optimum FHE derişimini bulmada kullanılan birey sayısının (4 kişi) yetersizliği, sonuçların bizim bulgularımızla karşılaştırılmasına engeldir. Yine de 106 kişinin

sadece bir tek FHE derişimindeki (1ml/ml) timidin tutulumunun bireyler arasında 5-6 katına varan değişmeler göstermesi, ancak bireysel farklılıklarla açıklanabilir.

Farrant ve arkadaşları (1980), trisiumlu timidin derişimi, spesifik radyoaktivite yoğunluğu, hücre yoğunluğu, FHE derişimi gibi parametreleri çalışmışlarsa da (11) bir kişinin belli bir süredeki DNA sentez hızı ile 54 kişinin 72. saat sonundaki Mİ'lerin doğrudan karşılaştırılması ne uygun ne de inandırıcı olabilir. Ayrıca bu çalışmada bireysel farklılıklara yeterince değinilmemiştir. Oysa hindi lenfositlerinde FHE ye karşı bireysel farklılıklar görülmüştür (6). Aynı durum tavuklar için de geçerlidir (7).

Kan/lenfosit kültüründe kullanılan mitojen derişiminin standartlaştırılması bazı sitogenetik analizler için de gereklidir. Örneğin aynı bir DSlu'nun metafaz hücrelerindeki aktif NOR taşıyan kromozom sayısı (8) ve interfaz çekirdekçiklerindeki NOR ifadesi (9) beklenilmedik bir şekilde ortamdaki FHE derişimine göre değişmektedir. FHE derişimi belli bir değer içinde artıkca AgNOR la boyanan akrosantrik kromozom sayısı da 7-8 den 11 e doğru artmaktadır (12).

Sonuç olarak, özellikleri gereç ve yöntemde belirtilen medium, fetal dana serumu ve FHE kullanılması durumunda, kontrollerde % 0.75 derişimindeki FHE kromozom analizleri için yeterli metafaz sıklığını sağlarken, DSlu'larda bu optimum (hem etkin hem de tutumlu) derişim % 0.75 ile % 1.48 v/v arasında bulunmaktadır. O halde gereç ve yöntemde özellikleri verilen 100 ml'lik komple bir medium için 1 ile 1.5 ml arasındaki FHE, hem DSlu, hem de diğer/sağlıklı bireylerin kan kültüründe kullanılabilir. Daha fazla FHE kullanımının faydası olmayacağı gibi, gereksiz kullanım nedeniyle ekonomik zararı (israf) da olacaktır.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. 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 syndrome. *Clin Immunol* 2000, 95:62-69.
3. Anderson D, Jenkinson PC, Dewdney RS, Francis AJ, Godbert P et al. Chromosome aberration, mitogen induced blastogenesis and proliferative rate index in periferal lymphocytes from 106 control individuals of the U.K. population. *Mut Res* 1988, 204:407-420.
4. Ross G, Dixon JB, Veevers A. Variation in the lymphocyte transformation assay slope analysis of cell dose-response curves. *J Immunol Methods* 1987, 98:189-193.
5. Tajima M, Fujinaga T, Okamoto Y, Otomo K, Koike T. Relationship between mitogen receptor in peripheral blood lymphocytes and blastogenic response to mitogen. *Res Veter Sci* 1990, 48:1-5.
6. Barta O, Barta V, Domermuth CH, Pierson FW. Optimum conditions for the turkey lymphocyte transformation test. *Avian Dis* 1992a, 36:386-394.
7. Barta O, Barta V, Pierson FW. Optimum conditions for the chicken lymphocyte transformation test. *Avian Dis* 1992b, 36:945-955.
8. İmamoglu N, Demirtas H, Donmez-Altuntas H, Hamurcu Z, İlten 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.

9. İmamoğlu N, Demirtaş H, İlten 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.
10. Nagel JE, Chopra RK, Chrest FJ, McCoy MT, Schneider EL, et al. Decreased proliferation, interleukin 2 synthesis and interleukin 2 receptor expression are accompanied by decreased mRNA expression in phytohemagglutinin-stimulated cells from elderly donors. *J Clin Invest* 1988, 81:1096-1102.
11. Farrant J, Clark JC, Lee H, Knight SC, O'Brien J. Condition for measuring DNA synthesis in PHA stimulated lymphocytes in 20 microliters hanging drops with various cell concentrations and period of culture. *J Immunol Meth* 1980, 33:301-312.
12. İmamoğlu N, Demirtaş H, Dönmez H, Hamurcu Z. Down sendromlu lenfositlerinde Kültür ortamına göre aktif NOR sayısı değişimi. VI. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi Özet Kitabı, ss: 173. 2-5 Kasım 2000, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

Fıtohemagglutinin konsantrasyonunun Down Sendromlu ve sağlıklı bireylerin lenfositlerindeki mitotik indekslerine etkisi