

## AKIM SİTOMETRİ'DE RNA ÖLÇÜMÜNÜN ÖZGÜNLÜĞÜ VE GÜVENİRLİLİĞİ

### The Specificity and Reliability of RNA Measurement in Flow Cytometry

Zuhal HAMURCU<sup>1</sup>, Halil DEMİRTAŞ<sup>2</sup>, Türkan PATIROĞLU<sup>3</sup>

**Özet :** Bu çalışmanın amacı akım sitometride (AS) ile ölçümünün özgün ve güvenilir olup olmadığını test etmektir. Bu amaçla; RNA içeriği bilinen farklı hücreler ve RNA sentezini durduran ajanlar kullanılarak AS deki RNA ölçümünün özgünlüğü ve güvenilirliği dört ayrı işlemle test edildi. 1) Periferik Kan Medyum içerisinde, mitojenle uyarılmış mononükleer hücrelerin (PKMNH=periferik kan mononükleer hücre) RNA içerikleri AS ile ve kit ile izole edilip spektrofotometride ölçülerek karşılaştırıldı. Her iki yöntemle bulunan sonuçların birbiriyile uyumlu oldukları görüldü ( $p=0.026$ ,  $r=0.974$ ) 2) AS'de RNA ölçümünün yinelenebilirliği aynı ve farklı kişilerden alınan örnekler çalışılarak test edildi. a) Sağlıklı bir kişiden 8 ml kan alınarak 4 farklı tüpe bölündü. Bölünen kanların mononükleer hücreleri izole edildi, boyandı ve RNA içerikleri AS'de ölçüldü. Aynı kişiye ait kan örneklerinin RNA içerikleri arasındaki varyasyon katsayısı ( $V$ ) =%0,75 olarak bulundu. b) Beş sağlıklı kişiden 2 şer ml kan alındı ve mononükleer hücreleri izole edildi, boyandı ve RNA içerikleri AS'de ölçüldü. Beş sağlıklı kişinin RNA içerikleri arasındaki varyasyon katsayısı ( $V$ )= %1.72 olarak bulundu. 3) Aktinomisin deneyi: Aynı kişinin mononükleer hücreleri Periferik Kan Medyum içeren iki kültür flaskına ekilerek iki gün mitojenle uyarıldı. Kültür flasklarından birine RNA sentezini durdurmak amacıyla 24. saatte 0.05 µg/ml aktinomisin D ilave edildi, diğerine ise herhangi bir işlem yapılmadı. Mitojenle uyarılan mononükleer hücrelerin 48 saat sonra RNA içerikleri AS ile ölçüldü. Sonuçta aktinomisin-D ile etkileştirilmiş olan hücrelerin RNA içeriğinin artmadığı AS ile belirlendi. 4) RNA içerikleri bilinen hücrelerin  $F_{640}$  mean X değerlerinin AS ölçümlerinin karşılaştırılması: ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi), AML (Akut Miyeloid Lösemi)'li hastalardan ve sağlıklı bir kişiden 2'şer ml kan örneği alınarak, mononükleer hücreleri izole edildi, boyandı ve RNA içerikleri AS'de ölçüldü. ALL ve AML'li hastaların hücrelerinin RNA içerikleri sağlıklı bireyin hücrelerinin RNA içeriğinden daha yüksek bulundu. Sonuç olarak Türkiye'de hiç çalışılmamış, optimize edilmemiş olan AS'de RNA ölçüm yöntemi, yapılan bu çalışma ile hem tanı amaçlı, hem de araştırma amaçlı kullanılabilir, özgün ve güvenilir bir yöntem olarak geliştirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Akım sitometri, RNA ölçümü, RNaz-A

**Summary :** The aim of this work is to establish whether or not specificity/ reliability of our RNA measurement in flow cytometry is consistent. RNA measurement specificity was established using various cells with known RNA content and blocking agents: 1) Results of the comparison of the RNA content during the mitogen-stimulated growth of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMNCs) in Peripheral Blood Medium found by our flow cytometric method and by the kit were compared. The results obtained with the two different methods were concordant ( $p=0.026$ ,  $r=0.974$ ). 2) Replicability of the RNA ( $F_{640}$  mean X) measurement for the same and for different individuals: a) 8 ml of peripheral blood sample from a healthy individual was divided into 4 portions and each of which was submitted for isolation, staining and fluorescence measurement procedures. Variation coefficient ( $V$ ) was found as 0.75% among RNA contents of the tubes ( $V=0.75$ ). b) 2 ml of peripheral blood samples from 5 healthy individuals was submitted for isolation, staining and fluorescence measurement procedures. Variation coefficient ( $V$ ) was found as 1.72% among RNA contents of the five healthy individuals ( $V=1.72$  %). Actinomycin D experiment: The two PBMNCs flasks from a healthy individual were cultured in Peripheral Blood Karyotyping Medium simultaneously for 2 days. One of the flasks received 0, 05 µg/ml of actinomycin D 24 h after the initiation of the cultures and cell luminescence of each flask was measured at 48 h. We did not obtain an increase in cellular RNA content in actinomycin D treated cells versus untreated cells, 4) Comparison of  $F_{640}$  mean X measurements in the cells of known character in RNA content: 2 ml of peripheral blood samples from ALL, AML patients and healthy control was submitted to isolation, staining and fluorescence measurement procedures. RNA content of ALL and AML patients' cells were higher than those of healthy control. This experiment shows that our  $F_{640}$  mean X measurement indicates the RNA level in the cell. We concluded that our evaluation of the relative RNA content is reliable.

**Key words:** Flow cytometry, RNA measurement, RNase-A.

<sup>1</sup> Bilim Doktoru.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Tıbbi Biy.AD, Kayseri

<sup>2</sup> Prof.Dr.Erc.ÜN.Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

<sup>3</sup> Prof.Dr.Erc.ÜN.Tıp Fak. Pediatri AD, Kayseri

\* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 01.11.05 nolu proje ile desteklenmiştir.

Hücrel RNA ölçümleri, çoğu tümör hastalıklarının tanı ve teşhisinde kullanılan uygun bir parametre olarak gösterilmiştir (1,2). Çünkü tümör oluşumu, kontrolsüz hücre çoğalmasının ya da hücre farklılaşmasındaki bozukluğun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu olaylar hücrel RNA içeriği ile ilgilidir. Aynı zamanda yaygın olarak bilinir ki, nükleolar aktivitenin tüm işaretleri yani öncül-rRNA'nın senteziyle ilgili aktivite tümörlerde belirleyici bir değerdir (1). Çoğu anti-kanser ilaçlar, hücre döngüsünde etkili olduğu için, bu tür ilaçlarla etkileşim sonrasında hücrel RNA içeriği bu ilaçlara karşı kanser hücrelerinin duyarlılığını gösterir. Ayrıca anti-kanser ilaçlarla etkileştirilen hücrelerin dengesiz büyümesi; ilaca karşı hücrenin cevabı, hücre ölümü ve hastalığın iyileşme durumu, RNA içeriğinin ölçümlerinden tahmin edilebilir (1). Bu geniş klinik uygulamaların yanı sıra RNA veya DNA ölçümleri birçok temel çalışmalar için de kullanılabilir (3). 1970'li yıllardan beri Darzynkiewicz ve arkadaşları akım sitometride (AS) hücrelerin RNA içeriklerini başarıyla ölçmüşlerdir (4,5). AS'de RNA içeriğini ölçmek için kullanılan en yaygın boya Akridin Oranj (AO)'dur (1,4-7) ve yapılan RNA çalışmalarının çoğunluğu AO'nun flüoresan özelliğine dayanır. AO'nun özelliği, çift veya tek zincirli nükleik asitlere bağlandığı zaman absorpsiyonu ve emisyonunun değişiklik göstermesidir. AO, hücre içindeki tek zincirli nükleik asitleri kırmızıya, çift zincirli nükleik asitleri de (DNA ve kendi üstünde çifte sarmal yapmış RNA) yeşile boyamaktadır (1,4,5). Hücre içi RNA'ların bir bölümünün tek zincirli olma özelliğinden yararlanılarak bu ölçümler yapılabilmektedir. AO'nun maksimum absorpsiyonu yaklaşık 455-490 nm'dir (1,7). AO'nun uyarılması sonucunda kırmızı flüoresan emisyonu (F<sub>640</sub>, FL3) hücrelerin RNA içeriğini ve yeşil flüoresan emisyonu (F<sub>530</sub>, FL1) hücrelerin DNA içeriğini gösterir (1,4,5,7).

Bu çalışmada ; AS'de RNA ölçüm yöntemini daha önce Türkiye'de çalışan bir merkez ya da kişi olmadığından, bu yöntemi olgunlaştırmak ve laboratuvarında hem tanı hem de araştırma amaçlı olarak uygulanabilir düzeye getirmek amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

### Hücrelerin Hazırlanması

**Sıfırıncı saatte kültür yapılmamış mononükleer hücrelerin hazırlanması:** Beş sağlıklı kişiden alınan 2'şer ml heparinli kan örnekleri 1640 RPMI (Sigma) medyumla seyreltildi (dilution 1:1). Her bir kan örnekleri 3 ml fikol-histopak (Sigma) üzerine yavaş yavaş yayıldı ve daha sonra 1300rpm'de 25' santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası izole olmuş mononükleer hücreler başka bir tüpe steril pipet kullanılarak alındı ve mononükleer hücreler, 2mM MgCl<sub>2</sub> içeren PBS (fosfat buffer solusyonu)'le iki kez 900 rpm'de 10' santrifüj yapılarak yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra, hücre süspansiyonu 200 µl'sinde 200.000 hücre içerecek şekilde, 2mM MgCl<sub>2</sub>'lü PBS ile seyreltildi (8).

**Kültür hücrelerinin hazırlanması:** Beş sağlıklı kişiden alınan 4' er ml heparinli kan örneği 1640 RPMI (Sigma) medyumla seyreltildi (dilution 1:1) ve 4 ml fikol-histopak (Sigma) üzerine yavaş yavaş yayıldı, daha sonra 1300 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası izole olmuş mononükleer hücreler steril pipet kullanılarak başka bir tüpe alındı, iki kez 1640 RPMI medyumla 900 rpm'de 10' santrifüj yapılarak yıkandı ve hücreler 1640 RPMI medyum içerisinde suspense edildi. peripheral kan mononükleer hücre (PKMNH)'ler, mitojenle uyarma işlemi için 5ml medyum (Sigma, product code P 2602) içeren steril kültür flasklarına (50 ml, Greiner flask 690160) medyumun ml'sinde 1x10<sup>6</sup> hücre bulunacak şekilde ekildi (4). Daha sonra hücreler 37 °C de % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 72 saat inkübe edildi. Mitojenle uyarılan hücreler kültürden çıkartıldı ve 2mM MgCl<sub>2</sub>'lü PBS ile iki kez 900 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra, hücre süspansiyonu 1ml'sinde 1x10<sup>6</sup> hücre içerecek şekilde 2mM MgCl<sub>2</sub>'lüPBS'le seyreltildi (8,9).

**Hücrelerin boyanması:** 200 µl'sinde 200.000 hücre bulunan hücre süspansiyonu üzerine 400 µl permabilizasyon çözeltisi (*Solusyon A*=%0.1 TritonX-100, 0.08 M HCl ve 15 M NaCl, pH:1.2) eklendi. 15 saniye (sn) sonra 1200 µl boya çözeltisi (*Solusyon B*=6µg/ml AO (merck), 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.15 M NaCl, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.1 M sitrik asit, pH:6.0) ilave edildi ve 2-10 dakika içerisinde AS'de ölçüm yapıldı (8,10).

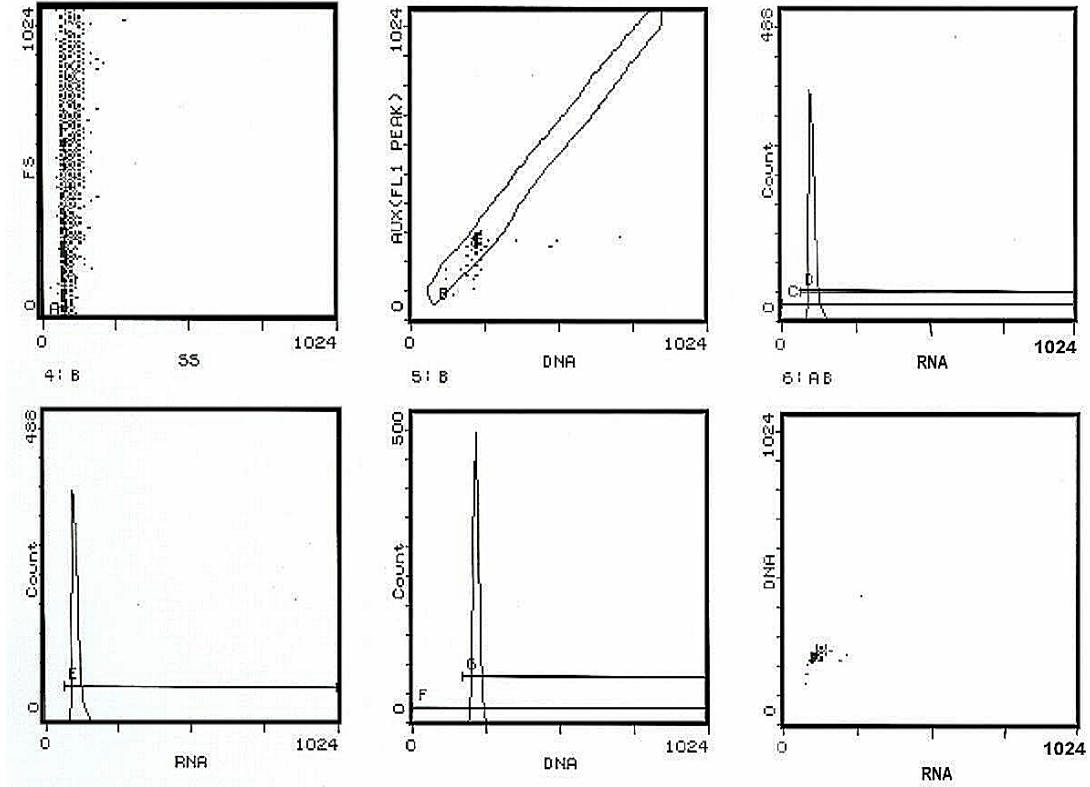
**Akım sitometride ölçüm:** Hücrelerin DNA ve RNA içerikleri AS (Şekil 1, Coulter EPICS XL) kullanılarak analiz edildi. Analiz için uygun protokol hazırlandı (Şekil 2). Her ölçüm için 10.000 hücre geçirildi. Ölçüm sonuçları cihaza kaydedildi. AO uyarılması için tek lazerli 488 nm dalga boyunda argon iyon lambası kullanıldı. Hücrelerin DNA

ve RNA içeriklerini değerlendirmek için, AS'de ölçüm sonucu elde edilen verilerden FL1 (F<sub>530</sub>) ve FL3 (F<sub>640</sub>)'ün mean X değerlerine bakıldı.

Kullanılan bu yöntemin RNA'ya spesifik olup olmadığını test etmek için mononükleer hücreler DNaz-I, RNaz-A ile etkileştirildi.

**Hücrelerin DNaz-I ile Etkileştirilmesi:** Sağlıklı bir kişiden 2 ml kan örneği alınarak mononükleer hücreler sıfırıncı saatte izole edilip süspanse edildi. Hücre süspansiyonu 200 µl'sinde 200.000 hücre içerecek şekilde, 2mM MgCl<sub>2</sub>'lüPBS'le seyreltildi (8).Bu hücre süspansiyonundan 200'er µl alınarak iki farklı tüp hazırlandı. Tüplerden biri kontrol olarak kullanıldı, diğeri DNaz-I'le etkileştirildi.

**Şekil 1.**Akım sitometri çalışma şeması



Şekil 2. Akım sitometride RNA içeriğini ölçmek için hazırlanan protokol

DNaz-I'le etkileşirme işlemi için;  $2 \times 10^5$  hücre içeren  $200 \mu\text{l}$  hücre süspansiyonu üzerine,  $400 \mu\text{l}$  solüsyon A,  $500 \mu\text{l}$  AO içermeyen solüsyon B,  $500 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ -PBS ve  $200 \mu\text{l}$  DNaz-I (1 mg DNaz-I/ $100 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ 'lü PBS, Sigma, pH:5.5) solüsyonu eklendi, oda ısısında  $30'$  inkübe edildi. Sonra hücreler yıkandı, AO'la boyandı ve AS'de ölçüm yapıldı (1,10).

**Hücrelerin RNaz-A ile Etkileştirilmesi:** Sağlıklı bir kişiden 2 ml kan örneği alınarak mononükleer hücreler sıfırıncı saatte izole edilip süspanse edildi. Hücre süspansiyonu  $200 \mu\text{l}$ 'sinde 200.000 hücre içerecek şekilde,  $2\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 'lüPBS'le seyreltildi (8).Bu hücre süspansiyonundan  $200'$ er  $\mu\text{l}$  alınarak iki farklı tüp hazırlandı. Tüplerden biri kontrol olarak kullanıldı, diğeri RNaz-A ile etkileştirildi.

RNaz-A ile etkileşirme işlemi için; literatüre göre (1,10),  $2 \times 10^5$  hücre içeren  $100 \mu\text{l}$  hücre süspansiyono-

nu üzerine  $400 \mu\text{l}$  solüsyon A eklendikten 15saniye sonra  $1200 \mu\text{l}$  solüsyon B ve  $100 \mu\text{l}$  RNaz-A solüsyonu (1mg RNaz-A/ $100 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ 'lü PBS,Amresco pH:8.0) eklendi,  $24^\circ\text{C}$ 'de  $30'$  inkübe edildi ve sonra AS'de mononükleer hücrelerin RNA içeriği ölçüldü.

Literatürde belirtilen yöntem modifiye edilerek hücrelerin RNaz-A ile etkileştirilmesi işleminde; enzimin çalışma pH'sını belirlemek için sağlıklı bir kişiden alınan 2 ml kan örneğinden izole edilip fikse edilen mononükleer hücreler ,3 farklı pH'da (pH=7.2, pH=5.5, pH = 8.0) hazırlanan RNaz-A solüsyonları kullanılarak etkileştirildi, daha sonra AS yöntemi ile RNA içerikleri ölçüldü.

RNA içeriği bilinen farklı hücreler ve RNA sentezini durduran ajanlar kullanılarak AS'deki RNA ölçümünün özgünlüğü, güvenilirliği ve yinelenebilirliği dört ayrı işlemle test edildi.

**Spektrofotometride RNA Ölçümü:** Sağlıklı bir kişiden 4 ml kan alınarak mononükleer hücreleri izole edildi ve PKMNH'ler mitojen varlığında 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Kültürden sonra hücrelerin bir kısmının RNA içerikleri AS'de ölçüldü. Hücrelerin bir kısmının ise RNA'ları kitle (High Pure RNA Kit, Roche, cat. No.1828 655) izole edilip içerikleri spektrofotometride ölçüldü.

**Yöntemin yinelenabilirliği için yapılan çalışma:** Sağlıklı bir kişiden 8 ml kan örneği alınarak 4 farklı tüpe 2'şer ml olacak şekilde bölündü. Bölünen kanların mononükleer hücreleri izole edildi, boyandı ve sıfırıncı saate RNA içerikleri AS' de ölçüldü.

Beş sağlıklı kişiden 2'şer ml kan örneği alınarak mononükleer hücreleri izole edildi, boyandı ve sıfırıncı saate RNA içerikleri AS'de ölçüldü.

**Hücrelerin Aktinomisin-D ile Etkileştirilmesi:** Sağlıklı bir kişiden 2 ml kan örneği alındı, mononükleer hücreleri izole edildi ve iki farklı kültür yapıldı. Kültürlerden biri 24. saatte Aktinomisin-D ile etkileştirildi (0.05 mg/ml Aktinomisin D çözeltisinden 50ml'lik kültür ortamına 25 µl eklendi), diğer kültür kontrol olarak kullanıldı. 48.saatte kültürler sonlandırıldı, hücrelerin RNA içerikleri AS'de ölçüldü (4,5).

**ALL ve AML Hastalarının RNA İçeriklerinin Ölçüm için Hazırlanması:** Kontrol amaçlı kullanmak için sağlıklı bir kişiden, ALL'li bir hastadan 2'şer ml heparinli kan örneği ayrıca AML'li bir hastadan 2 ml kemik iliği örneği ve 2 ml heparinli kan örneği alındı. Mononükleer hücreler izole edildi, boyandı ve sıfırıncı saate RNA içerikleri AS' de ölçüldü.

## BULGULAR

Literatür doğrultusunda (1,4,5) kullanılan AS yönteminin RNA'ya özgü olup olmadığından emin olmak için, sağlıklı bir kişiden alınan kan örneğinden izole edilen mononükleer hücreler hem DNaz-I'le hem de RNaz-A ile etkileştirildi. DNaz-I'le etkileşimi sonucunda hücrelerin DNA içeriklerinin %92'si kaybolurken, RNA içeriklerinin %7.2' si kayboldu. RNaz-A ile etkileştirilen hücrelerde, hücre RNA içeriğinin %52'si, DNA içeriğinin % 72'sinin azaldığı bulundu. Literatürde belirtilen (1,4,5) RNaz'la etkileştirme yönteminde bazı değişikliklerle yapılan farklı pH'lardaki çalışmalar sonucunda pH= 8.0'da RNA'nın %49'u, pH=7.2'de RNA'nın %33'ü, pH=5.5'de RNA'nın %27'sinin azaldığı belirlenip , RNaz'ın en etkin şekilde pH=8.0'da çalıştığı sonucuna ulaşıldı.

**1)AS ölçüm sonuçları ve spektrofotometrik ölçüm sonuçlarının karşılaştırılmasından elde edilen bulgular :** AS yöntemi ile RNA ölçümünün güvenilirliğini test etmek için mononükleer hücrelerin sıfırıncı saate, 24, 48 ve 72 saatlik kültür sonrası RNA içerikleri hem AS'de hem de spektrofotometride ölçüldüğünde her iki yöntemden elde edilen verilerin birbiriyle uyumlu olduğu bulundu (p=0.026, r=0.974) (Tablo I).

**2) AS'de RNA ölçümünün yinelenabilirliği ile ilgili yapılan çalışma sonuçları**

a) Aynı kişiye ait 8 ml kan örneği 4'e bölünüp izole edilen mononükleer hücrelerinin RNA içerikleri AS'de ölçüldüğünde  $F_{640}$  Mean X değerleri =110.2, 110.9, 111.0,112.2 olarak bulundu. Sonuçta aynı kişiye ait kan örneklerinin RNA içerikleri arasındaki varyasyon katsayısı (V)= % 0.75 olarak bulundu.

**Tablo I.** Mitojenle uyarılmış mononükleer hücrelerin RNA içeriklerinin AS ve spektrofotometrik ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması

Ölçüm	0.saat	24.saat	48.saat	72.saat
Spektrofotometrik ölçüm (RNA/örnek, µg/µl)	124	170	180	320
Akışkan sitometrik ölçüm ( $F_{640}$ meanX)	110.8	134.8	193.0	306.2

p=0.026, r=0.974

b) Beş sağlıklı kişiden alınan kan örneklerinin mononükleer hücrelerinin RNA içerikleri AS'de ölçüldüğünde  $F_{640}$  Mean X değerleri = 110.4, 111.9, 112.2, 112.8 ve 115.7 olarak bulundu. Sonuçta, beş farklı kişinin mononükleer hücrelerinin RNA içerikleri arasındaki varyasyon katsayısı (V)= % 1.72 olarak bulundu.

**3) Hücrelerin Aktinomisin D ile etkileştirilmesinden elde edilen bulgular:** Sağlıklı bir kişiden alınan kan örneğinden izole edilen mononükleer hücreler Aktinomisin D ile etkileştirilerek ve etkileştirilmeyerek hücrelerin 48 saatlik kültür sonrası RNA içerikleri AS'de ölçüldüğünde, Aktinomisin-D ile etkileştirilmiş hücrelerin  $F_{640}$  Mean X' i = 106.6, etkileştirilmemiş hücrelerin  $F_{640}$ MeanX'i=149.7 olarak bulundu.

**4) ALL ve AML Hastaların Mononükleer Hücrelerinin RNA İçeriklerinin Sağlıklı Kontrolle-rinki ile Karşılaştırılması:** ALL'li ve AML'li hastalardan alınan kan ve kemik iliği örneklerinden izole edilen mononükleer hücrelerin RNA içerikleri AS'de ölçüldü ve RNA içerikleri :

Kontrolde  $F_{640}$  Mean X = 112.4, RNA Index (RI)= 10.2

ALL'li hastada  $F_{640}$  Mean X = 132.4, RI= 11,8 (kan örneği)

AML'li hastada  $F_{640}$  Mean X = 159.1, RI= 14.1 (kan örneği)

AML'li hastada  $F_{640}$  Mean X = 187.9, RI= 16.7 (kemik iliği örneği) olarak bulundu.

## TARTIŞMA

Darzynkiewicz ve arkadaşları akım sitometride hücrelerin RNA içeriklerini başarıyla ölçmüşlerdir (4,5). Bu ölçüm kabaca, hücrelerden RNA'yı izole etmeden, hücreleri de parçalamadan, hücre içindeki RNaya özgün bir boya ile boyayıp, bu boyanın da miktarını 640 nm dalga boyunda ölçerek, RNA içeriğini tahmin etmeye dayanır (6,7) .

1970'li yıllardan beri AS'de hücre RNA içeriği ölçülmesine rağmen, Ülkemizde AS kullanarak hücre RNA içeriğini ölçen bir merkez ya da kişi bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu yöntemi olgunlaştırmak ve laboratuarda hem tanı hem de araştır-

ma amaçlı olarak uygulanabilir düzeye getirmek için yapılan bu çalışmada spesifik RNA ölçümünü sağlamak için fikse edilmeyen, sadece AO'ya geçirgenliği sağlanan hücreler, hem RNaz-A ile hem de DNaz-I'le etkileştirilip, DNaz-I'le muamele edildiğinde hücrelerin DNA içeriğinin büyük bir kısmının kaybolup, RNA içeriğinin değişmeden kalması kullanılan metodun RNA ölçümü için özgül olduğunu göstermektedir. Ancak hücreler RNaz'la etkileştirildiğinde, RNaz'ın RNA'nın yanında DNA'yı da azalttığı bulundu. Sonuçlarımız Toba ve arkadaşlarının (9) sonuçları ile benzerlik göstermekteydi.

Bunun yanı sıra; aynı kişiye ait hücrelerin bir kısmının RNA içerikleri AS'de bir kısmının da RNA içerikleri spektrofotometride ölçülüp, her iki yöntemden de elde edilen verilerin birbiriyle uyumluluk düzeyine bakıldığında; her iki ölçüm yönteminde elde edilen verilerin birbiriyle uyumlu olması (p=0.026, r=0.94, TabloI) AS'de RNA ölçümü için kullanılan yöntemin doğruluğunu gösterdi.

Aynı ve beş farklı sağlıklı kişilerden alınan kan örneğinin mononükleer hücrelerinin RNA içerikleri AS'de ölçüldüğünde, RNA içerikleri arasındaki varyasyon katsayısının düşük bulunması (sırasıyla V=%0.75, V=%1.72) ,AS'de RNA ölçümü için kullanılan yöntemin yinelenebilir olduğunu gösterdi.

Aktinomisin-D RNA sentezini durduran, DNA sentezini etkilemeyen bir maddedir (4,5). Kültürdeki bir hücre, Aktinomisin D ile etkileştirilirse, bu hücre RNA sentezleyemeyecek ve dolayısıyla da RNA içeriği düşük kalacaktır. Çalışmamızda da Aktinomisin-D ile etkileştirilmiş hücrelerin RNA içeriğinin artmadığının bulunması üzerine kullanılan yöntemin hücre içerisindeki RNA seviyesinin ölçümü için uygun olduğu kanısına varıldı.

Tümör hücrelerinde RNA içeriğinin bazı kanser çeşitlerini belirlemede bir işaret olduğu gösterilmiştir (1). Bu nedenle hücre RNA ölçümleri klinik onkolojide tanı amaçlı olarak kullanılmaktadır. Lösemili hastalarda hücrelerin RNA içeriğinin sağlıklı kontrollere göre oldukça fazla olduğu bilinmektedir. (11).Bu bilgi ışığında ALL'li, AML'li hastaların ve sağlıklı kontrolün mononükleer hü-

relerinin RNA içerikleri AS'de ölçülüp, sonuçta lösemili hastaların RNA içeriklerinin kontrole göre daha yüksek bulunması kullanılan yöntemin RNA'ya özgü olduğunu bir kez daha göstermektedir.

Literatürlerde, AS'de RNA ölçüm yönteminin RNA'ya özgül olup olmadığını test etmek için mononükleer hücreler RNaz'la etkileştirilmiş ve bu hücrelerin RNA içerikleri AS'de ölçülmüş ve RNA'nın %92'sinin azaldığı DNA içeriğinde ise herhangi bir değişikliğin olmadığı bulunmuştur (1,4,5,7,10). Çalışmamızda, AS'de mononükleer hücrelerin RNA içeriklerini ölçmek için kullandığımız RNA ölçüm yönteminin RNA'ya özgül olup olmadığını test etmek için, mononükleer hücreler RNaz'la etkileştirip bu hücrelerin RNA içerikleri AS'de ölçüldüğünde, hem DNA'nın hem de RNA'nın azaldığının bulunmasına rağmen, yukarıda açıklanan karşılaştırılmalı çalışma sonuçları literatür bilgileri (4-7, 9,11) ışığında yorumlandığında, AS'de RNA ölçümü için hazırlanan protokol ile mononükleer hücrelerin RNA içeriğinin doğru olarak ölçüldüğü sonucuna varıldı.

Sonuç olarak Türkiye'de hiç çalışılmamış, optimize edilmemiş olan AS'de RNA ölçüm yöntemi, yapılan bu çalışma ile hem tanı amaçlı, hem de araştırma amaçlı kullanılabilir, özgün ve güvenilir bir yöntem olarak geliştirilmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Darzynkiewicz Z. *Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content, Methods in Cell Biology, Academic Press 1994, Vol. 41: pp 401-420,*
2. Hiraki M. *Intracellular DNA and RNA in the course of tumor growth. Kurume Med J 1994, 41: 1-13.*
3. Grunwald D. *Flow Cytometry and RNA studies. Biol Cell 1993, 78: 27-30.*
4. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. *Lymphocyte stimulation: A rapid multiparameter analysis. Medical Sciences 1976, 73: 2881- 2884.*
5. Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sharpless T, Melamed MR. *Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. J Histochem Cytochem 1977, 25: 46-56.*
6. Yılmaz MT, Deniz G. *Cytometry'nin çalışma mekanizması ve prensipleri. Bilmedya grup, Aktüel Tıp Dergisi, İstanbul 1999, ss 1-9.*
7. Radcliff G, Jaroszeski MJ. *Basic of Flow Cytometry. In: Jaroszeski, MJ, Heller, R. (Eds). Methods in Molecular Biology. Flow cytometry Protocols, Humana Press Inc., Totawa, NJ, 1988, 91:1-24.*
8. Steck K, El-Naggar A. *Simultaneous DNA/RNA analysis of solid and hematoreticular malignancies. In: Jaroszeski MJ, Heller R. (Eds), Methods in Molecular Biology. Flow cytometry Protocols. Humana Press Inc, Totawa, NJ, 1988, 91: 167-180.*
9. Toba K, Winton E F, Koike T, Shibata A. *Simultaneous three color analysis of surface phenotype and DNA-RNA quantitation using 7-amino-actinomycin D and pyronin Y. J Immunol Meth 1995, 182:193-207.*
10. Darzynkiewicz Z. *DNA-RNA differential staining using AO. In: Robinson JP (Ed), Handbook of Flow Cytometry Methods. A John Wiley and Sons Inc, USA 1993, p114.*
11. Hiddeman W, Wörmann B, Messerer D, Sprngfeld R, Büchner Th. *Analysis of the cellular DNA and RNA content in acute leukemias by Flow Cytometry. J Cancer Res Clin Oncol 1990, 116: 507-512.*