

Down sendromlu çocuklarda AgNOR sayısı ile gelişim arasında bir ilişki var mı?

Recep ERÖZ¹, Mesut OKUR², Özgür BERİK³

ÖZET

Down sendromu (DS) ya da Trizomi 21 en genel ve en iyi bilinen kromozom anomalilerinden biridir. Bu anomalinin genel sebeplerinden birtanesi, mayozda homolog kromozomların ayrılmasında meydana gelen aksaklıklardır (nondisjunction). Bu olay büyük çoğunlukla oogenezis sırasında oluşur ve bu nedenle DS'deki anormal gametlerin kaynağı genellikle yumurta hücresidir.

Hücrenin çekirdeği içerisinde oluşan NORs (Nucleolar Organiser Regions)'lar tandem şeklinde tekrarlanan, ribozomal DNA ilmekleridir. İnsan genomunda NOR'lar 5 çift akrosentrik kromozomun (13, 14, 15, 21, 22) ikincil boğumlarında yerleşirler. İnterfazda transkripsiyonel olarak aktif olan NOR'lar, uygun şartlar altında gümüş nitrat ile seçici olarak boyanabilirler.

AgNOR proteini sentezinin çocuk'lardaki gelişimi etkileyip etkilemediğini tespit etmek amacıyla, yaşları 5,5 ay ile 64 ay arasında değişen 20 DS'lu çocuk çalışmaya dahil edilmiştir. İlk olarak psikolog tarafından bireylere Ankara Gelişim Tarama Envanteri (AGTE) testi uygulanarak gelişim düzeyleri dil-bilişsel, ince motor, kaba motor, sosyal beceri-öz bakım ve genel gelişim olarak belirlenmiştir. Daha sonra bu çocukların herbirisinden steril bir kürdan yardımıyla ağız epiteli alınarak bir lam üzerine yayma yapılmıştır. Daha sonra herbir preperata AgNOR boyama işlemi uygulanıp, her bir çekirdek için AgNOR sayısı özel bir bilgisayar programı kullanılarak tespit edilmiştir. Her bir bireyden 100 çekirdek değerlendirilmiş ve her biri için ortalama NOR sayısı değerleri hesaplanmıştır. Bulgulara göre ortalama NOR sayısı/çekirdek oranı 4.53 ± 0.82 bulunmuştur. Veriler, Spearman korelasyon testi uygulanarak her bir gelişim düzeyi için istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Bu bulgulara göre, sırasıyla dil-bilişsel, ince motor, kaba motor, sosyal beceri-öz bakım ve genel gelişim ile NOR sayısı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0.05$).

Sonuç olarak NOR sayısında meydana gelen artma ve azalmaların AGTE testine göre DS'ların gelişim düzeylerine bir etkisi yoktur.

Anahtar sözcükler: NOR, AgNOR, rDNA, Down Sendromu

Is there any relationship between development and AgNOR number in down syndrome children?

SUMMARY

Down syndrome (DS) or trisomy 21 is one of the most common and best known chromosomal anomaly. One of the general cause of this anomaly is the deficiency of homolog chromosome separation during meiotic division (nondisjunction). This event generally occurs during oogenesis, thus usually the source of abnormal gametes is oocyte in DS.

The NORs that occurred in cell nucleus are tandemly repeated rDNA loops. In human, the NORs found in secondary constrictions of the five pair of acrocentric chromosomes (13, 14, 15, 21, 22). In interphase, transcriptionally activated NORs are selectively stained with AgNO₃ under prescribed conditions.

To detect the AgNOR protein synthesis effects or not to the development of children, 20 DS children between 5.5 and 64 month old were included in this study. Firstly, the AGTE test was performed the each individual and their developmental stage were detected as language-cognitive, fine motor adaptive, gross motor, personal social skill-self care, and general development by psychologist. Then the buccal epithelial cells of DS children were taken via a sterile toothpick on clean glass slides spreaded. Then, AgNOR staining technic was applied to the slides of each individual, and AgNOR number were evaluated for each nucleus, using a special computer programme. From each individual,

¹ Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Düzce - TÜRKİYE

² Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Düzce - TÜRKİYE

³ Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kayseri - Türkiye

Correspondence: Dr. Recep ERÖZ, e-posta: receperoz@duzce.edu.tr

hundred nuclei were analyzed and the mean NOR number/nucleus were evaluated. The mean NOR number/nucleus were found to be 4.53 ± 0.82 . The datas were analysed for each developmental stage with Spearman correlation test as statistical. According to this data, a significant correlation was not evident between the mean NOR number and language-cognitive, fine motor adaptive, gross motor, personal social skill-self care, and general development, respectively ($p > 0.05$).

In conclusion, we think that there is not any effect the increasing or decreasing of mean NOR number to developmental level of DS according to AGTE test.

Key Words: NOR, AgNOR, rDNA, Down syndrome

GİRİŞ

DS 21. Kromozomun normal sayıdan bir fazla (trizomi 21) olması sonucu oluşup, zihinsel gerilik, immün yetmezlik, konjenital kalp rahatsızlıklarına sebep olan (1) ve yaklaşık olarak 700 canlı doğumun birinde gözlenen en genel genetik anomalilerden biridir (2). Down sendromunun en yaygın sebeplerinden birtanesi, mayozda homolog kromozomların ayrılmasında meydana gelen aksaklıklardır (nondisjunction). Kromozom 21 deki ayrılama olayı büyük çoğunlukla oogenezis sırasında oluşur ve bu nedenle DS'daki anormal gametlerin kaynağı genellikle yumurta hücresidir.

Kromozom 21'in üç kopyasının bulunması, bu kromozom üzerindeki kodlayıcı genlerin aşırı ekspresyonuna yol açabilir (1). Bununla beraber NORs ve DS fenotipi arasındaki ilişki ile ilgili birkaç çalışma vardır (3-6). Kromozom 21'in üzerinde yer alan ve NOR proteinlerinin sentezinden sorumlu olan rDNA genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi tamamen açıklanamamıştır. Ankara Gelişim Tarama Envanteri (AGTE): Savaşır ve arkadaşları tarafından (1993) ana baba ile görüşme yoluyla uygulanan bir değerlendirme aracı olarak geliştirilmiştir. Yaşamın ilk 6 yılındaki gelişimi 154 madde ve 5 kategoride (dil-bilişsel, ince motor, kaba motor, sosyal beceri-öz bakım ve toplam) değerlendirmektedir. Üç yaş grubu için (0-12 ay, 13-44 ay ve 45-72 ay) test tekrarı-güvenilirliği %88-99 ve iç tutarlılığı %80-90 bulunmuştur (7). Çocuk ruh sağlığı alanında çalışan psikologlar tarafından 0-6 yaş arasındaki çocukların gelişimsel açıdan değerlendirilebilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Envanter, gelişimsel gecikme ve düzensizlik gösterme açısından risk altında olduğu düşünülen bebek ve çocukların erken dönemde tanınması ve gerekli önlemlerin alınabilmesine de olanak sağlar.

Çekirdekçik, çekirdek içerisinde dikkat çeken farklılaşmış yapılardır. Çekirdekçikte ribozomal RNA'lar (rRNAs) sentezlenir, işlenir ve ribozomal proteinlerle bir araya getirilir. Çekirdekçiğin organizasyonu ve boyutu doğrudan ribozom sentezi ile ilişkilidir. Çekirdekçiğin organizasyonu, onun aktivitesine bağlı olarak çekirdekçik içerisinde fonksiyonel kompartmanların oluşmasına neden olmuştur. Bu aktivite bloklandığında, bozulduğunda ya da çalışmadığında, çekirdekçik proteinleri bağımsız olarak fonksiyon görebilme kapasitesine sahiptirler. Buna ilave olarak çekirdekçik, çekirdekçik proteinlerinin sürekli devam eden bir şekilde çekirdek komponentleri ile birleşip

ayrıldığı dinamik yapıdadır. Çekirdekçik oluşturan bölgeler (NORs), ribozomal DNA (rDNA) ve bazıları gümüş seven proteinlerden oluşan kromozomlar üzerindeki genetik lokuslardır. NOR'lar preribozomların işlenerek olgun ribozomların oluşmasında rol oynarlar (8).

NORs'lar tandem şeklinde tekrarlanan, hücrenin çekirdeği içerisinde oluşan ribozomal DNA ilmekleridir. İnsan genomunda NOR'lar 5 çift akrosentrik kromozomun (13,14,15,21,22) kısa kollarında yerleşirler. NOR'lar uygun şartlar altında gümüş-nitrat solüsyonu ile boyanarak görünür hale getirilebilirler (9).

Bu çalışmanın amacı DS'lu çocukların gelişim düzeyi ile NOR proteini sayısı arasında bir ilişkinin olup olmadığını tespit etmektir.

MATERYAL METOD

Bu çalışmaya yaşları 5,5 ay ile 64 ay arasında değişen 20 DS'lu çocuk dahil edilmiştir. Çalışmada lokal etik komitesinin onayı alınmıştır. İlk olarak psikolog tarafından bireylere AGTE testi uygulanarak gelişim düzeyleri dil-bilişsel, ince motor, kaba motor, sosyal beceri-öz bakım ve genel gelişim olarak belirlenmiştir. Bu çocukların herbirisinden steril bir kürdan yardımıyla ağız epiteli alınıp bir lam üzerine yayma yapılarak havada kurutulmuştur. Daha sonra bu preparatlar absolute metanol'de 10 dakika fikse edilerek ağız epiteli hücrelerinin lama sabitlenmesi sağlanmış ve NOR boyama işlemine hazır hale getirilmiştir.

Luther E. Lindner tarafından kullanılan gümüş boyama metodu (10) hafif değiştirilerek AgNOR boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Havada kurutulmuş preparatlar daha sonra içinde distile su ile ıslatılmış kurutma kâğıdının bulunduğu petri kabının içerisine yerleştirilmiştir. Preparatların üzerine pastör pipeti ile gümüş boyama solüsyonundan 3-4 damla damlatılmış ve üzerleri lamelle kapatılmıştır. Sonra hızlı bir şekilde petri kabının kapağı kapatılarak, etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılıp 37 °C'deki etüvde 15 dakika bekletilmiştir. 15. dakikanın sonunda etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller düşünceye kadar distile su ile yıkanmıştır.

Sonuçta tüm preparat üzerindeki bütün bölgelerde hedeflediğimiz kalitede homojen AgNOR boyanmalar elde edilmiştir.

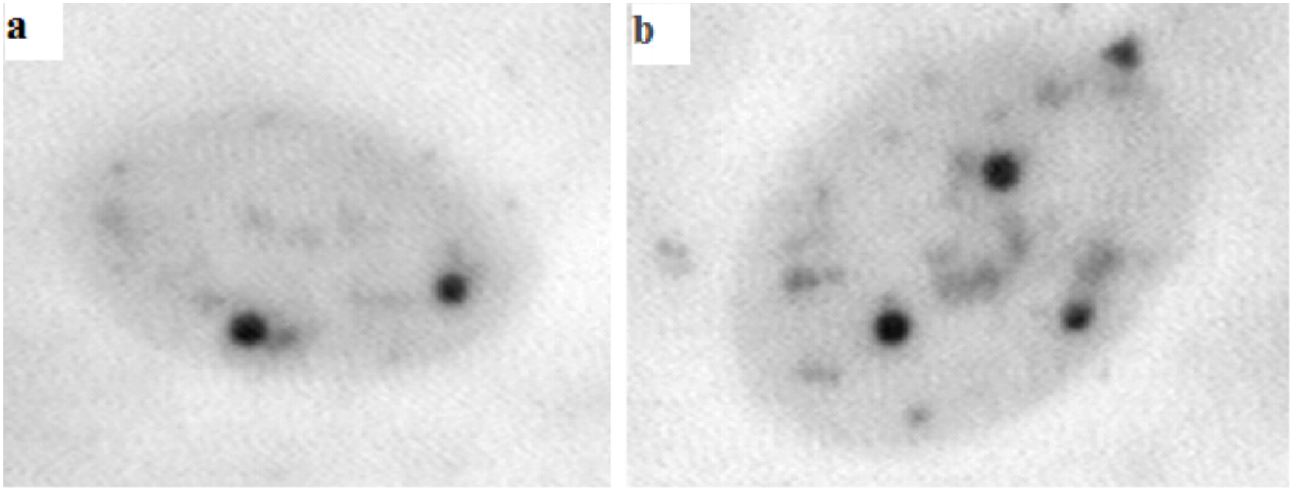
İstatistik Analiz

Gelişim düzeyi (dil-bilişsel, ince motor, kaba motor, sosyal beceri-öz bakım ve genel gelişim) ile NOR sayısı arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını tespit etmek amacıyla Spearman korelasyon testi yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmamıza 5,5 ay ile 64 ay arasında değişen 20 DS çocuk dahil edilmiştir. Her bir bireye AGTE testi uygulanarak gelişim düzeyleri tespit edilmiş ve bunların her birinden 100 ağız epiteli hücresinin çekirdekleri değerlendirilerek her biri için ortalama NOR sayısı değerleri hesaplanmıştır.

Bulgulara göre ortalama NOR sayısı 4.53 ± 0.82 bulunmuştur. Yapılan Spearman korelasyon testine göre, sırasıyla dil-bilişsel, ince motor, kaba motor, sosyal beceri-



Şekil 1. Down sendromlu çocukların ağız epitel hücrelerinin mikroskopik görünümü. a: 64 aylık ; b: 5,5 aylık

Tablo 1. Spearmen korelasyon testi uygulanmış Down Sendromlu çocuklar'ın ağız epitel hücrelerine ait N, n değerleri ve standart sapmaları.

Grup	N	n	NOR Sayısı Ort. ±SS	P
Down Sendromlu çocuk	20	2000	4.53±0.82	>0.05

N: Gruptaki birey sayısı, **n:** İncelenen toplam hücre sayısı, **Ort.:** Ortalama, **SS:** Standart sapma **p=** dil-bilişsel, ince motor, kaba motor, sosyal beceri-öz bakım ve genel gelişimin her biri için hesaplanmış p değeri.

öz bakım ve genel gelişim ile NOR sayısı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 1). DS'lu çocukların ağız epitellerinin gümüş-nitrat solüsyonuyla boyanmış resimleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

DS, 21. kromozomun fazladan bir kopyası ile ortaya çıkan en yaygın kromozom anomalilerden biridir. DS'nu tanımlayan özelliklerin, 21. kromozomun uzun kolu (21q) içinde bulunan bazı genlerin, fazladan bir kopyalarının bulunmasından dolayı aşırı ifade edilmeleri sonucunda oluştuğu varsayılmaktadır (11, 12).

Trizomi 21, mental retardasyonun en yaygın otozomal genetik nedenidir (12,13). 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 (12,14). İkincisi ise; bu genlerin ürünlerinin, doğrudan ya da daha muhtemel olarak dolaylı bir şekilde, diğer genlerin ifadelerini ya da gen ürünlerini etkilemesidir (2).

İmamoğlu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada DS'lu çocukların interfaz lenfositlerinde kontrollere göre yüksek

miktarda AgNORs ekspresyonunun varlığını tespit etmişlerdir (15). Yine İmamoğlu ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada kültür medyumunda mitojen konsantrasyonuna göre Down sendromlu çocukların interfaz lenfositlerinde AgNORs yüzeylerinin kontrollere göre arttığını tespit etmişlerdir (6).

Bildiğimiz kadarıyla AgNOR sayısı ile DS'lu çocukların gelişimi arasında bir ilişkinin var olup olmadığına yönelik bir çalışmaya literatürde rastlanılamamıştır.

Bu genlerin ifade edilmesi enerji bağımlı (ATP, GTP bağımlı) bir olay olarak gerçekleşmektedir. Dolayısıyla fazla bulunan 21. Kromozomdaki genlerin ekspresyonu için organizma normalden daha fazla enerjiye gereksinim duyacaktır. Bu nedenle her bir fazladan 21. Kromozom içeren her bir hücrenin harcadığı ekstra enerji göz önüne alındığında organizmanın gelişimi için gerekli olan enerji miktarındaki eksilmelerden dolayı gelişim açısından (dil-bilişsel, ince motor, kaba motor, sosyal beceri-öz bakım ve toplam) bazı eksikliklerin olacağı düşüncesindeyiz.

Yapılan çalışma sonrası AgNOR sayısı ile DS'lu çocukların gelişimi arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır. Sonuç olarak, AgNOR sayısındaki artma ve ya azalmaların sırasıyla dil-bilişsel, ince motor, kaba motor, sosyal beceri-öz bakım ve genel gelişim düzeylerine bir etkisi yoktur.

KAYNAKLAR

- 1 Greber-Platzer S, Schatzmann-Turhani D, Wollenek 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* 254, 395–399, 1999.
- 2 Antonarakis SE, Lyle R, Chrast R, Scott HS: Differential gene expression studies to explore the molecular pathophysiology of Down syndrome. *Brain Res. Rev.* 36, 265–274, 2001.
- 3 Demirtas H, Imamoglu N, Cucer N, Donmez H, Yilmaz A, Candemir Z, Bokesoy I. NOR (rDNA) expression enhancement in phytohemagglutinin- stimulated lymphocytes of Down syndrome patients. *Erciyes University J. Health Sci.* 8, 24–27, 1999.
- 4 Demirtas H, Imamoglu N, Donmez H, Cucer N, Yilmaz A, Candemir Z: Condensed chromatin surface and NOR surface enhancement in mitogen-stimulated lymphocytes of Down syndrome patients. *Ann. Ge'ne't- Paris* 44, 77–82, 2001.
- 5 Imamoglu N, Demirtas H, Donmez-Altuntas H, Hamurcu Z, Ilten A: NORs Expression increases on metaphase chromosomes of Down syndrome lymphocytes, in concordance with the mitogen concentration in the culture medium. *Cytometry Part B-Clin Cytom.* 66B, 36–39, 2005a.
- 6 Imamoglu N, Demirtas H, Donmez-Altuntas H, Ilten A: Higher NORs expression in lymphocyte of trisomy 21 babies/children: in vivo evaluation. *Micron* 36, 503–507, 2005b.
- 7 Savaşır I, Sezgin N, Erol N: Ankara Gelişim Tarama Envanteri (2. basım) Türk Psikologlar Derneği: Ankara, 1993.
- 8 Hernandez-Verdun D: The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions *Histochem Cell Biol* 126:135–148, 2006.
- 9 Manu SCV, Rajaram BT, Rai LR: Value of Silver Binding Nucleolar Organiser Regions (AgNOR) in Squamous Cell Carcinomas of Upper Aero-digestive Tract. *MJAFI* ; 62 : 123-128, 2006.
- 10 Lindner LE: Improvements in the Silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem* 41(3): 439-445, 1993.
- 11 Gardiner K, Slavov D, Bechtel L, Davisson M: Annotation of human chromosome 21 for relevance to Down syndrome: gene structure and expression analysis. *Genomics* 79(6):833-843, 2002.
- 12 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* 318:137-147, 2003.
- 13 McQuillan CI, Choo KH : Comparison of total cellular DNA, mRNA, and rRNA levels between normals and Down syndrome patients. *J Inher Metab Dis* 15:112-120, 1992.
- 14 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* 129:325-335, 2004.
- 15 Imamoglu N, Demirtas H, Ilten A: NOR Expression increases in interphase lymphocytes of Down syndrome babies/children as AgNORs surface, according to the mitogen concentration in the culture medium. *Micron* 37:129–133, 2006.