

**T.C**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DEĞİŞİK KİMYASALLARIN DROSOPHİLA SOMATİK MUTASYON VE**  
**REKOMBİNASYON TESTİNDE (SMART) AMİFOSTİNE İLE**  
**ETKİLEŞİMLERİ**

**Nurdan SEVİM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**2006**


**T.C**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DEĞİŞİK KİMYASALLARIN DROSOPHILA SOMATİK MUTASYON VE**  
**REKOMBİNASYON TESTİNDE (SMART) AMİFOSTİNE İLE**  
**ETKİLEŞİMLERİ**

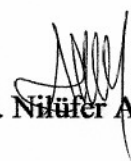
**Nurdan SEVİM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 10. 03. 2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU  
(DANIŞMAN)

  
Prof. Dr. Ünal EGELİ

  
Yrd. Doç. Dr. Nilüfer AYDEMİR

## ÖZET

### DEĞİŞİK KİMYASALLARIN DROSOPHİLA SOMATİK MUTASYON VE REKOMBİNASYON TESTİNDE (SMART) AMİFOSTİNE İLE ETKİLEŞİMLERİ

Bu çalışmada antineoplastik ajanlar Gemcitabine ve Fotemustine'in genotoksikolojik etkileri ile Amifostine'in antimutajenik etkileri, Drosophila kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile araştırıldı. Bu yöntemde, resesif flare ( $flr^3$ ) ve multiple wing hair (mwh) belirleyici genlerini üçüncü kromozomlarında taşıyan üç günlük larvalar kullanıldı. Larvalar, ilaçların farklı dozlarını içeren besin ile kronik olarak beslendiler. İlaçların etkileri, uygulama sonunda larvalardan çıkan sineklerin kanat imajinel disk hücrelerindeki genetik değişimler (nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama, rekombinasyon) sonucunda oluşan mutant trikomlara göre değerlendirildi. Mutant klon değerlendirmeleri, küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon, toplam mwh ve toplam klon sınıflandırmaları esas alınarak yapıldı.

Genotoksik etkisi araştırılan Gemcitabine larvalara 2, 4 ve 8  $\mu\text{g/ml}$  dozlarında besin aracılığıyla verildi. Kanat SMART yöntemiyle Gemcitabine'in mutajenik etki göstermediği, zayıf rekombinojenik etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada genotoksik etkisi araştırılan diğer ajan Fotemustine de 2, 4 ve 8  $\mu\text{g/ml}$  dozlarında larvalara besinle verildi. Drosophila kanat SMART çalışması ile Fotemustine mutajenik ve rekombinojenik etkili bulunmuştur.

Çalışmada kullanılan Amifostine larvalara 1, 2 ve 4  $\mu\text{g/ml}$  dozlarında verildi. Uygulamadan elde edilen sonuçlar Amifostine'in herhangi bir mutajenik ve rekombinojenik etkisinin olmadığını göstermiştir. Ayrıca Gemcitabine ve Fotemustine'in olası mutajenik ve rekombinojenik etkilerine karşı Amifostine'in hücre koruyucu etkisi araştırıldı. Larvaların bir grubuna 1  $\mu\text{g/ml}$  Amifostine ve 8  $\mu\text{g/ml}$  Gemcitabine, diğer grubuna 1  $\mu\text{g/ml}$  Amifostine ve 8  $\mu\text{g/ml}$  Fotemustine uygulandı. Elde edilen sonuçlar Amifostine'in antimutajenik etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Gemcitabine, Fotemustine, Amifostine, Drosophila melanogaster, SMART

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF INTERACTIONS BETWEEN TWO CHEMICALS AND AMIFOSTINE IN DROSOPHILA SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST (SMART)

In this research, the genotoxic effects of antineoplastic agents Gemcitabine and Fotemustine, and antimutagenic properties of Amifostine were studied with *Drosophila* wing Somatic Mutation and Recombination Test.

In this method 3-day old larvae with recessive flare ( $flr^3$ ) and multiple wing hair (mwh) marker genes on their third chromosome were used. Larvae were chronically fed different doses of drugs. The effects of drugs were evaluated according to genetic changes (point mutation, deletion, non-disjunction, and recombination) in wing imaginal disc cells that lead to the formation of mutant trichomes. Mutant trichomes evaluation was based on small single spot, large single spot, twin spot, total mwh and total spot classification.

Gemcitabine, whose genotoxic effects have been studied, were given to larvae in doses of 2, 4 and 8  $\mu\text{g/ml}$ . Wing SMART assay showed that Gemcitabine dose not have any mutagenic effects but has weak recombinogenic effects instead.

The other agent Fotemustine, whose genotoxic effects were studied, was given to larvae in 2, 4 and 8  $\mu\text{g/ml}$  doses. Fotemustine was found as mutagenic and recombinogenic with *Drosophila* wing SMART method.

Amifostine, which was used in this study was given in 1, 2 and 4  $\mu\text{g/ml}$  doses and the results indicate that Amifostine doesn't have any mutagenic or recombinogenic effects. In addition, cytoprotective properties of Amifostine against possible mutagenic and recombinogenic effects of Gemcitabine and Fotemustine were studied. One group of larvae 1  $\mu\text{g/ml}$  Amifostine and 8  $\mu\text{g/ml}$  Gemcitabine, to another group 1  $\mu\text{g/ml}$  Amifostine and 8  $\mu\text{g/ml}$  Fotemustine were given. The results obtained show that amifostine has antimutagenic effect.

Key Words: Gemcitabine, Fotemustine, Amifostine, *Drosophila melanogaster*, SMART

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	5
2.1 Mutasyonlar, Mutajen Ajanlar ve Mutajenite Testleri .....	5
2.2 Drosophila Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ve Çeşitli Kimyasallarla Kanat SMART ile Yapılan Çalışmalar .....	10
2.3 Kanser ve Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçların Etki Şekilleri .....	14
2.4 Antineoplastik Ajanlarla Yapılan Kanat SMART Çalışmaları .....	16
2.5 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	18
2.5.1 Gemcitabine (Gemzar) .....	18
2.5.2 Fotemustin (Muphoran) .....	23
2.5.3 Amifostine (Etiyol) .....	23
2.6 Drosophila'nın Yaşam Döngüsü .....	25
3. MATERYAL VE METOD.....	28
3.1 Kullanılan Drosophila Hatlarının Genetik Yapısı .....	30
3.2 Drosophila Hatlarının Kültürü .....	32
3.3 Çaprazlama İçin Birey Seçimi .....	33
3.4 İlaç Dozlarının Belirlenmesi .....	34
3.4.1 Pozitif Kontrol .....	34
3.4.2 Gemcitabine (Gemzar) .....	34
3.4.3 Fotemustin (Muphoran) .....	35
3.4.4 Amifostine (Ethyol) .....	36
3.4.5 Gemcitabine ve Fotemustine'in Amifostine ile Kombine Uygulamaları .....	36

3.5 İlaçların Uygulanması .....	36
3.6 Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması .....	37
3.7 Kanat Preparatlarının Mikroskop Analizi .....	38
3.8 Klon İndüksiyon Frekansı ve Rekombinasyon Miktarının Hesaplanması ...	42
3.9 Verilerin Değerlendirilmesi .....	43
4. BULGULAR .....	45
4.1 Gemcitabine (Gemzar) .....	45
4.2 Fotemustine .....	48
4.3 Amifostine .....	49
4.4 Amifostine ve Gemcitabine'in Birlikte Uygulamaları .....	53
4.5 Amifostine ve Fotemustine Birlikte Uygulamaları .....	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	59
6. KAYNAKLAR .....	66
TEŞEKKÜR .....	77
ÖZGEÇMİŞ .....	78

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
cm	: Santimetre
g	: Gram
$\mu$	: Mikro
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece

### Kısaltmalar

5-BU	: 5-brom urasil
A	: Adenin
AML	: Akut myeloid lösemi
Ara-C	: Sitozin arabinosid
Bd <sup>s</sup>	: Beaded Serrat
CAS	: Chemical Abstract Service
CP	: Cyclophosphamid
CPT	: Camptothecine
CPT-11	: Irinotecane
dNTP	: deoksi nükleotid trifosfat
dCMP	: Deoksi sitidin monofosfat
dCDP	: Deoksi sitidin difosfat
dCTP	: Deoksi sitidin trifosfat
<i>D. melanogaster</i>	: <i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dFdC	: Difloro deoksisitidin

dFdCTP	: Difloro deoksistidin trifosfat
dFdUMP	: 2'-2'-deoksiüridin monofosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EMS	: Etil metan sülfonat
ENNG	: N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
ENU	: N-ethyl-N-nitrosourea
flr <sup>3</sup>	: Flare geni
G	: Guanin
G <sub>2</sub>	: Hücre döngüsü gap2 safhası
H <sub>a</sub>	: Alternatif hipotez
H <sub>o</sub>	: Orijinal hipotez
MDS	: Myelodysplastic sendrom
MMS	: Methyl methane sulfonate
MN	: Mikronükleus
MNNG	: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MNU	: N-methyl-N-nitrosourea
mwh	: Multiple Wing Hair geni
PCE	: Poli Chromatic Erithrosit
RNA	: Ribonükleik asit
S	: Hücre döngüsünde DNA sentez safhası
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCE	: Sister Chromatid Exchange
SMART	: Somatic Mutation and Recombination Test
<i>S. typhimurium</i>	: <i>Salmonella typhimurium</i>
T	: Timin
TM3	: Dengeleyici kromozom
TPT	: Topotecane
VBL	: Vinblastine
VCR	: Vincristine
VNR	: Vinoralbine
WR 1065	: Aktif defosforile tiyol



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1 :Gemcitabine'nin hücredeki metabolik işleyişi .....	21
Şekil 2. 2 : <i>D. melanogaster</i> 'de imajinel disk yerleşimleri .....	26
Şekil 2. 3 : <i>D. meanogaster</i> 'de imajinal diskler ve oluşturduğu kısımlar .....	26
Şekil 3.1 : Drosophila Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinin şematik olarak gösterimi .....	28
Şekil 3. 2 : Dengeleyici kromozomu taşımayan normal ve dengeleyici kromozomu taşıyan Bd <sup>S</sup> bireylerinin kanat fenotipleri .....	30
Şekil 3. 3 : Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimler .....	31
Şekil 3. 4 : mwh/mwh ve flr <sup>3</sup> /TM3, Bd <sup>S</sup> bireyleri arasındaki çaprazlamalar .....	33
Şekil 3. 5 : Gemcitabine bileşiğinin kimyasal formülü .....	34
Şekil 3. 6 : Fotemustine bileşiğinin kimyasal formülü .....	34
Şekil 3. 7 : Amifostine bileşiğinin kimyasal yapısı .....	35
Şekil 3. 8 : Kanat sektörlerinin şematik görünümü .....	38
Şekil 3. 9 : Küçük tek tip mwh mutant klonların mikroskoptaki görünümü .....	39
Şekil 3. 10 : Büyük tek tip mwh mutant klonların mikroskoptaki görünümü .....	39
Şekil 3. 11 : İkiz mutant klonların mikroskoptaki görünümü .....	40
Şekil 3. 12 : mwh/flr3 genotipli bireylerde görülebilecek değişik olay ve sonuçlar .....	40
Şekil 4. 1 : Gemcitabine dozlarının normal kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı .....	45
Şekil 4. 2 : Gemcitabine dozlarının serrat kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı .....	45
Şekil 4. 3 : Fotemustine dozlarının normal kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı .....	47
Şekil 4. 4 : Fotemustine dozlarının serrat kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı .....	48
Şekil 4. 5 : Amifostine dozlarının normal kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı .....	50
Şekil 4. 6 : Amifostine dozlarının serrat kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı .....	50
Şekil 4. 7 : Amifostine ve Gemcitabine'in birlikte uygulamalarında normal kanatlarda oluşan toplam mutant klon sayısı .....	52

Şekil 4. 8 : Amifostine ve Gemcitabine'in birlikte uygulamalarında serrat kanatlarda oluşan toplam mutant klon sayısı .....	53
Şekil 4. 9 : Amifostine ve Fotemustine'in birlikte uygulamalarında normal kanatlarda oluşan toplam mutant klon sayısı .....	56
Şekil 4. 10 : Amifostine ve Fotemustine'in birlikte uygulamalarında serrat kanatlarda oluşan toplam mutant klon sayısı .....	56

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3. 1 : Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi .....	42
Çizelge 4.1 : Gemcitabine'in <i>D. melanogaster</i> hatlarındaki etkileri.....	47
Çizelge 4.2 : Fotemustine'in <i>D. melanogaster</i> hatlarındaki etkileri.....	50
Çizelge 4.3 : Amifostine'in <i>D. melanogaster</i> hatlarındaki etkileri.....	52
Çizelge 4.4 : Amifostine ve Gemcitabine birlikte uygulamalarının <i>D. melanogaster</i> hatlarındaki etkileri.....	55
Çizelge 4.5 : Amifostine ve Fotemustine'in birlikte uygulamalarının <i>D. melanogaster</i> hatlarındaki etkileri.....	57

## 1. GİRİŞ

İnsan hücrelerindeki DNA hem endojen hem de eksojen ajanlara maruz kalmanın sonucu devamlı olarak hasara uğramaktadır. Mutajen olduğu bilinen ya da tahmin edilen ajanlara bilerek ya da bilmeyerek maruz kalabiliriz. Potansiyel mutajenler veya karsinojenler mantar ve yeşil bitkilerde kendiliğinden doğal olarak bulunabileceği gibi, yiyeceklerin pişirilmesi sırasında da oluşabilirler. İyonize veya ultraviyole radyasyon, 4000 kadar kimyasal madde karışımını içeren tütün veya tütün ürünleri, insan yapımı kimyasallar olarak niteleyebileceğimiz trafik ve çevre kirliliği, kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar insanların temas halinde olabileceği mutajen ajanlara verilen örnekler arasındadırlar. Endojen metabolik süreçlerle oluşan reaktif oksijen türleri, lipid peroksidasyonu, deaminasyon, depürinasyon gibi süreçler de mutajen etkiye sahip olup mutasyonları meydana getirirler (Venitt ve Phillips 1995).

DNA'da oluşan hasarlar gen düzeyinde (gen mutasyonları veya nokta mutasyonları) veya kromozom düzeyinde (sayısal ve yapısal aberasyonlar) mutasyonlar olarak adlandırılırlar. Genellikle kimyasalların etkileriyle oluşan nokta mutasyonlar tek bir nükleotidi etkileyen mutasyonlar olup, nükleotid ilavesi ya da kaybı veya bir nükleotidin diğerine değişmesiyle oluşurlar (Ripley 1990, Smith ve Wood 1991). Bu mutasyonların belirlenmesinde sıklıkla bakteriyel test sistemleri kullanılır (Auletta ve ark. 1993). Yapısal kromozom aberasyonları (translokasyon, delesyon) ve sayısal kromozom aberasyonları (aneuploidi ve poliploidi) farklı mekanizmalarla oluşurlar (IPCS 1985, Natarajan ve Obe 1986, Traş 1998).

İnsanlarda her saniyede  $10^7$  hücre bölünmektedir. Bu hücrelerin yaklaşık üçte birinde spontan mutasyon olduğu düşünülmektedir. Bu mutasyonlar DNA replikasyonu ve DNA onarımı sırasında oluşabilirler. Hidroliz, oksidasyon ve elektrofilik atakları içeren kimyasal olaylar DNA hasarına öncülük ederler. Bu reaksiyonlar hücrelerin eksojen kimyasallar (çevresel ajanlar, besin içerikleri vb.) veya endojen metabolik süreçler sonucu oluşabilen ajanlara maruz kalması ile tetiklenebilir. Eksojen kaynaklı kimyasallar insandaki DNA hasarının en önemli kaynağıdır (Marnett ve Plataras 2001).

Çok çeşitli olan bu çevresel ajanlar mutasyon oluşturarak kanser gelişiminde önemli rol oynarlar. Mutasyonlar tümörlerde kritik genlerde bulunurlar. Kanser hücrelerinde hücre döngüsünün kontrolü bozulmuş, hücre bölünmesi çoğalmış ve

hızlanmıştır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar etkilerini bölünme hızı yüksek olan hücrelerde gösterdiklerinden kanserli hücreler bu ilaçlardan etkilenmektedirler. Ancak bu sırada vücudun yüksek bölünme hızına sahip sağlıklı hücreleri de hasara uğramaktadır (Venitt ve Phillips 1995, Kirsch-Volders ve ark. 2002). Kemoterapötik ilaç hem kemoterapi uygulanan bireyde hem de bu ilaçla temas eden sağlık görevlilerinde DNA hasarları oluşturması açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle de antitümör tedavisinde kullanılacak olan yeni antineoplastik maddelerin seçilen *in vitro* ya da *in vivo* test sistemleriyle genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi gereklidir (Auer ve ark.1997).

Bu çalışmada kullanılan antikanser ajanlardan birisi Gemcitabine'dir. Nükleosid analogu olan Gemcitabine küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, göğüs, ovaryum, pankreas ve meme kanserinin tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ajandır (Plunket ve ark. 1995a, Mason ve ark. 1999). Gemcitabine, DNA molekülünün oluşturulmasında, doğal nükleotid olan deoksitidin trifosfatla yarışır. Gemcitabine fosforilasyon yoluyla monofosfat, difosfat ve trifosfat formları yönünde aktive olur. Bu aktivasyondaki hız sınırlayan enzim, deoksitidin kinazdır. Sonuçta meydana gelen metabolit, yani gemcitabine trifosfat, gemcitabine'in DNA yapısına girmesini sağlayan substrat olarak hizmet eder. Bu molekülün girmesi, devam etmekte olan DNA sentezinin inhibisyonuna yol açarak hücre çoğalmasını durdurur. Gemcitabine'in DNA yapısına girmesinden sonra çoğalmakta olan DNA ipliğine polimerizasyon sona ermeden önce bir nükleotid daha eklenir. Maskelenmiş zincir terminasyonu olarak adlandırılan bu olay, gemcitabine molekülünün, DNA onarım mekanizmaları tarafından kesip çıkarılmasını önler (Huang ve ark. 1991, Heinemann ve ark. 1995)

Çalışmamızda genotoksitesisi araştırılan diğer bir kemoterapötik bileşik ise Fotemustine'dir. Fotemustine alkilleyici ve karbomilleyici etkiye sahip nitrozüre ailesinden geniş antitümöral aktiviteye sahip sitostatik bir antikanser ajandır. Bileşiğin kimyasal yapısı kan-beyin bariyerine iyi nüfuz edebilmeyi sağlamaktadır. Kemoterapötik aktivitesi baş boyun kanserleri, beyin tümörleri ve bazı katı tümörler üzerinde gösterilen kemoterapötik bir bileşiktir (Hargrave ve ark. 2002). Fotemustine ilgili SMART sisteminin kullanıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Çalışmamızda hücre koruyucu ajan olarak kullandığımız bileşik ise Amifostine'dir. Amifostine, Ethyol adlı ilacın etken maddesidir. Amifostine kemoterapi

veya radyasyon tedavisi gören hastalarda sağlıklı hücreleri kemoterapi veya radyasyonun etkisinden korumak amaçlı kullanılmaktadır (Blasiak ve ark. 2003). Sisteamin analogu olan amifostine fosforlanmış aminotiol ön ilacıdır. Amifostine'in membrana bağlı alkalın fosfatazlar aracılığıyla defosforile olup aktif hale geçmesi gereklidir (Campos Nebel ve ark. 2002, Acosta ve ark. 2003).

Çalışmamızda bu bileşiklerin genotoksik etkilerini *Drosophila melanogaster* kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testini kullanarak belirlemeyi amaçladık. Kimyasalların canlıda genotoksik etkilerini belirlemede kullanılan testlerin bazıları için *D. melanogaster* en sık tercih edilen model organizmadır.

*Drosophila* kanat SMART testi 1984 yılında Graf ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu testle mutasyonların daha geniş bir spektrumda incelenme olanağı sağlanmıştır. Kanat SMART testi *in vivo* bir test sistemi olup, aynı anda nokta mutasyonu, delesyon, ayrılmama gibi mutasyon çeşitlerinin ve rekombinasyonun fenotipte gözlenebilmesine imkan sağlamaktadır (Graf ve Würzler 1996, Graf ve ark. 1998). Smart test sistemi heterozigot veya hemizigot hayvanlarda mutasyon ya da rekombinasyon ile heterozigotinin kaybolması üzerine temellendirilmiştir (Würzler ve Vogel 1986, Graf ve ark 1996). Bu çalışmada belirleyici gen olarak flare (*flr*<sup>3</sup>), Bd<sup>s</sup> (Beaded serrat) multiple wing hair (*mwh*) kullanılmıştır. Bu genler üçüncü kromozom üzerine bulunmaktadır. Dengeleyici kromozom TM3'ün rekombinasyonu baskılama özelliği vardır. Dengeleyici kromozom sayesinde homozigot halde iken letal etki gösteren genlerin öldürücü etkisinden hattı korumak mümkün olmaktadır. Bu kromozomun varlığı dengeleyici kromozom üzerindeki baskın olan mutant serrat geni ile belirlenmektedir. Kanat SMART testinin bu özelliklerinden dolayı genotoksik etkileri araştırılmak istenilen kimyasal maddenin (herbisid, insektisit, çeşitli gruplarda yer alan birçok ilaç) mutajenik ve rekombinojenik özellikleri belirlenebilir. Bu test sisteminde araştırılan kimyasal ile uygulamadan elde edilen kanatlar fenotiplerine bakılarak, dengeleyici kromozomu taşıyan serrat ile dengeleyici kromozomu taşımayan normal kanatlar ayrı olarak değerlendirilir. Serrat kanatlı bireylerde rekombinasyon baskılandığından kimyasalın neden olduğu etkinin mutasyon veya rekombinasyondan hangisiyle oluştuğu belirlenebilmekte, ayrıca gerçekleşen mutasyon ve rekombinasyon oranı hesaplanabilmektedir. Bu çalışmada Gemcitabine ve Fotemustine'in genotoksik etkileri, varsa bu etkilerin rekombinasyon yoluyla mı, mutasyon yoluyla mı olduğunun

belirlenmesi ve de Amifostine'in antimutajenik etkisi ve varsa mutajenik etkisinin kanat SMART test sistemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

## **2. KAYNAK ARAŞTIRMASI**

### **2.1. Mutasyonlar, Mutajen Ajanlar ve Mutajenite Testleri**

Çeşitli kimyasal maddelerin insanlarda kansere neden olduğu bilinmektedir. Farmasötik ilaçları, besin koruyucularını, pestisitleri, petrol ürünlerini içeren binlerce kimyasal madde halen çevremizde bulunmakta ve bunlara her yıl yenileri eklenmektedir. Bu saydıklarımıza radyasyon (Maki 2002), mutajenik ya da karsinojenik olduğu bilinen ancak doğal olarak oluşan yiyeceklerdeki mikotoksinlerde katılmaktadır. İnsanlar ilaç kullanırken farkında olarak ya da günlük yaşamlarında örneğin evsel ürünlerde, kozmetiklerde farkında olmadan değişik kimyasallara maruz kalmaktadırlar. Tüm bu etkenler, genetik hasar ve kanser oluşturma potansiyelleri açısından test edilirler. İnsanlarda kanserle bağlantılı olduğu bilinen birçok kimyasal madde mutajenik olarak belirlenmiştir (IPCS 1985).

Bir hücrenin yapısı, gelişmesi ile ilgili tüm bilgiler DNA'da kaydedilmiş durumdadır. Çeşitli kimyasal ya da fiziksel etkenlerin genotoksik etkileriyle DNA moleküllerinde yaptıkları değişikliklere mutasyon denir. Buna neden olan maddeye mutajen, mutasyon sonucu oluşan organizmaya da mutant denir (Traş 1998). Mutasyonlar, kimyasallara, radyasyona, virüslere maruz kalma ile ya da mitoz ve mayoz gibi süreçler sırasında hücresel kontrol altında da meydana gelebilirler (Maki 2002). Mutasyon bir anlamda, genetik bilginin hatasız depolanmasındaki başarısızlıktır (Klug ve Cummings 2002). Mutasyon, evrimi işleten çeşitli güçlerden birisi olup, evrimi devam ettirme yeteneğindedir (Venitt ve Phillips 1995, Maki 2002). Genetik araştırmalarda mutasyonlar, soydan soya geçişlerde takip edilebilirliği sağlayan gen belirleyicileri (marker) olarak kullanılırlar (Klug ve Cummings 2002). Uygun olmayan mutasyonlar gen havuzundan doğal seleksiyonla uzaklaştırılırken, yararlı mutasyonlar birikme eğilimi gösterirler (Maki 2002).

DNA'da meydana gelen hasarlar kromozom düzeyinde (kromozomal aberasyon veya kromozomal mutasyon) veya gen düzeyinde (gen veya nokta mutasyonu) mutasyonlar olarak ortaya çıkmaktadırlar. Gen mutasyonu tüm genetik ve evrimsel değişikliklerin nedenidir (Natarajan ve Obe 1986).

Çok hücreli organizmalarda mutasyonlar meydana geliş yerine göre germ hücreleri mutasyonları ve somatik hücre mutasyonları olarak ikiye ayrılırlar. Germ



hücresi mutasyonları gelecek kuşaklara aktarılabilen değişikliklerdir ve gelecek nesillere aktarıldığı için de kalıtsal hastalıkların oluşmasına sebep olurlar (Griffits ve ark. 2000, Malling 2004). Germ hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar, dominant ve resesif olmalarına bağlı olarak farklı etkiler ortaya çıkarırlar. Mutasyonlar dominant olduğunda etkileri ilk generasyonda gözlenirken, resesif olduklarında etkilerini gözlemek için birkaç generasyon beklemek gerekir (Venitt ve Parry 1984).

Mutasyonlar germ hücreleri yerine somatik hücrelerde meydana geldiklerinde somatik mutasyon olarak adlandırılırlar. Somatik mutasyonlar oluştukları hücrelerden meydana gelen tüm hücrelerde olacaktırlar. Somatik mutasyonlar hücrelerin ölümünden veya hasarlanmalarından, hücrelerin malign hale dönüşüp kanser oluşumundan ve yaşlanmadan sorumludurlar (Griffits ve ark. 2000, Malling 2004, Smith ve Wood 1991).

Nokta mutasyonlar, sıklıkla kimyasalların etkileri ve DNA replikasyonundaki hatalar ile oluşurlar. Nokta mutasyonlar tek veya birkaç nükleotidi etkileyen mutasyonlar olup, bir nükleotidin diğerine değişmesi veya nükleotid eklenmesi ya da nükleotid kaybı ile meydana gelirler. Nötral mutasyonlarda, triplet kodonun kodladığı aminoasit değişmez veya benzer bir aminoasidi kodlar. Böylece herhangi bir değişiklik olmaz. Böyle sessiz mutasyonlar DNA'da yığılırlar (Smith ve Wood 1991). Missense mutasyonda normalde yapıya girmesi gereken aminoasitin yerine başka bir aminoasit kodlanır ve yapıya farklı bir aminoasit girer. Nonsense mutasyon, zamansız bir stop kodonunun oluşup protein zincirinin zamanından önce sonlanmasına neden olur. Nonsense mutasyon her zaman fonksiyon kaybı ile sonuçlanır (IPCS 1985, Smith ve Wood 1991, Maki 2002). Bir nokta mutasyonu, diğer bir nokta mutasyonu tarafından geriye çevrilebilir.

Kromozomal mutasyonlar, kromozomların yapısında (yapısal aberasyonlar) veya sayılarında (sayısal aberasyon veya aneuploidi) meydana gelen değişiklikler olarak gözlenirler. Hem yapısal hem de sayısal kromozom aberasyonları içsel ve dışsal faktörlerden dolayı meydana gelebilir (Natarajan ve Obe 1986). Yapısal aberasyonlar DNA'da hasar meydana getirirlerken, sayısal değişiklikler de hücre bölünmesi sırasında kromozomların düzenli dağılımına engel olurlar (IPCS 1985).

Mutasyonlar bazen organizmanın kendisinden kaynaklanan sebeplerle de oluşabilir. Bu şekilde kendiliğinden oluşan mutasyonlar spontan mutasyon olarak adlandırılır (Venitt ve Phillips 1995). Spontan mutasyonlar genel olarak DNA

replikasyonu sırasında meydana gelirler. Spontan mutasyonlar DNA replikasyonundaki hatalardan oluşmalarına ek olarak, DNA onarımındaki hatalı denemelerden ve birden fazla eşleşme özelliğine sahip tautomerik bazların bulunmasıyla da oluşabilirler. Ayrıca, oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon gibi endojen olaylar spontan mutasyonu artırır (Glickman ve ark. 1995). Organizmalardaki normal aerobik metabolizma sonucunda meydana gelen süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türevleri DNA'da oksidatif hasar meydana getirebilirler. Böyle bir hasar sonucunda oluşan ürünler yine yanlış baz eşleşmelerine sebep olabilirler (Collins ve ark. 1996). Genomda bir pozisyonun diğerine hareket edebilen hareketli elemanlar (transpozonlar) ile genomu bir veya daha fazla nükleotidin eklenmesi (insersiyon) ya da çıkarılmasıyla da (delesyon) değişiklikler olabilir. Genlerin okuma çerçevesini ya da mRNA splicing'ini değiştirerek etkili olurlar (Loeb ve Preston 1986, Maki 2002).

DNA replikasyonu sırasındaki yanlış baz eşleşmeleri, bazlardaki tautomerik değişimlerden kaynaklanabilir. Tautomerik değişimler, DNA'da yer alan bazlarda bir H atomunun pozisyonunu değiştirmesiyle bazların keto formundan enol formuna, amino formundan imino formuna dönüşmesiyle olmaktadır (Maki 2002, Traş 1998). Bazı çok tekrarlı DNA bölgelerinde özellikle delesyon ve duplikasyon şeklindeki mutasyonlara sık rastlanmaktadır. Bu tip mutasyonların da replikasyon esnasındaki hatalardan meydana geldiği bilinmektedir. Depürinasyon ve deaminasyon kendiliğinden oluşan mutasyonlardır. Depürinasyon, DNA'da yer alan pürin bazı ile deoksiriboz arasındaki glikozidik bağın bozulması sonucu guanin veya adenin bazlarının DNA'dan uzaklaşması ve apürinik bölgeler meydana gelmesi olarak açıklanabilir. Deaminasyon sonucunda ise özellikle sitozin bazının urasil ve metil sitozinin timine dönüşümü gerçekleşir ve urasil veya timin dönüşümü gerçekleşir ve urasil veya timin replikasyon esnasında adenin bazı ile eşleşebilmektedir. Böylece GC-AT dönüşümü meydana gelir. Bu tip mutasyonlar organizmalarda yüksek sıklıkla görülen ancak DNA onarım mekanizmalarınca hemen onarılan mutasyonlardır (Loeb ve Preston 1986).

Mutajenlerin neden olduğu mutajenik değişiklikler, fonksiyonel proteinlerin sentezini engelleyebilir veya modifiye yapıdaki proteinlerle, aktivitesi ve özellikleri değişmiş enzimlerin sentezlenmesini sağlayabilir. Bu mutasyonlar dişi veya erkek germ hücreleriyle taşınan genetik bilgide değişiklikler yaptığında kalıtsal anormallikler ve

hastalıklar ortaya çıkar. Mutasyonlar somatik hücrede oluştuklarında hücrelerde geriye dönüşümü olmayan değişiklikler oluştururlar ve bu da genel olarak kanser oluşumunu ortaya çıkarır (IPCS 1985).

DNA'da hasar oluşturabilen mutajen ajanlar arasında baz analogları, alkilleyici ajanlar, akridin oranj gibi maddeler sayılabilir. DNA ile doğrudan ilişkiye giren mutajen ajanların bir grubu baz analoglarıdır. Bunlar DNA bazlarına benzer moleküller olup DNA sentezi esnasında analog oldukları bazlar yerine DNA yapısına girebilirler. Baz analoglarına 5- brom urasil örnek verilebilir. Eğer 5- brom urasil timin yerine DNA'ya girse ve enol formuna neden olan tautomerik bir kayma olursa, 5-BU guanin ile eşleşir. Bir replikasyondan sonra A=T yerine G=C şeklinde bir transisyon olur. DNA ile doğrudan ilişkiye giren kimyasal maddelerin bir grubu da etil metan sülfonat, metil metan sülfonat gibi kimyasallardır. Nükleotidlerdeki amino veya keto gruplarına bir alkil grubu ekleyerek yanlış baz eşleşmelerine sebep olurlar (Klug ve Cummings 2002, Maki 2002).

Alkilleyici ajanlar çeşitli hücrel moleküllere bağlanırlar. Bu moleküllerin en önemlisi DNA'dır. Nükleik asitlerin temel yapısını oluşturan fosfat, hidroksil ve amino gruplarına kovalent bağlanan alkil grupları DNA'da zincir kırıkları, mikronükleus oluşumuna ve hücre ölümüne neden olurlar (Mazur ve Blawat 1999).

Akridin oranj, etidium bromide gibi kimyasal mutajenler bazlar arasına girerek çerçeve kayması mutasyonlarını oluştururlar. Bu şekilde etki eden ajanlar bir azotlu baz çifti boyutunda olup pürin ve pirimidinler arasına sıkışarak interkalasyon yaparlar. DNA'daki okuma çerçevesini değiştirirler (Klug ve Cummings 2002).

Endojen olaylar sonucunda da mutajenler oluşabilir. Örneğin lipid peroksidasyonu, mutajenik türlerin oluşumuna öncülük edebilir. Mutajenik nitrozaminler, sekonder aminler ve nitritler endojen olarak da oluşturulabilirler (Venitt ve Phillips 1995).

Bir kimyasalın değerlendirilmesinin ilk adımı, genetik materyalde bir değişiklik yapabilmesi ve DNA ile bağlanabilme yeteneğinin araştırılmasıdır. Germ hücrelerindeki kalıtsal değişiklikler, belli kimyasallar tarafından indüklenebilirler ve genetik risk oluştururlar. Çok sayıda kısa zamanlı test, bu kimyasalların neden olduğu değişikliklerin belirlenebilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Bu testler, geniş bir alanda

oldukça yaygın ve rutin olarak başarıyla kullanılmaktadır. Bakteri, maya, *Drosophila* ve *in vitro* memeli hücre metodu bu amaç için dizayn edilmiştir (IPCS 1985).

Birçok yeni kimyasal madde ile yirminci yüzyılda tanışmış bulunmaktayız ve her yıl yeni sentezlenen bileşikler bunlara katılmaktadırlar. Karsinojenik aktivite genellikle laboratuvar hayvanları kullanılarak araştırılmakta ve test hayvanlarının yaşam süreleri boyunca maruz bırakıldıkları kimyasal maddenin tümör oluşturma yeteneği ile belirlenmektedir. Kimyasal maddelerin kanser oluşturma potansiyellerinin alternatif yollarla belirlenmesi amacıyla daha ekonomik olan ve bakteriden memeliye kadar diğer biyolojik sistemlerin kullanıldığı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler klasik uzun zamanlı çalışmalardan daha kısa sürede tamamlanıp ve kısa zamanlı testler olarak refere edilirler. Bu sebeple mutajenik ve karsinojenik kimyasalların saptanması için kullanılan hızlı sonuç alınan ve ekonomik çok sayıda test bulunmaktadır. Bu kısa süreli testlerin tümü kromozomal hasarın, gen mutasyonlarının ve DNA hasarının gösterilmesine imkan veren *in vitro* yöntemlerdir. Canlı organizma kullanmaksızın deneysel biyolojik sistemlerde geçen süreçlerdir. Test organizmaları bakteriden mayaya kültüre alınmış hayvan hücrelerine kadar geniş bir yelpaze oluşturmaktadır. Pratik olarak *in vitro* prosedürde, test edilen kimyasalın DNA ile reaksiyona girebilme yeteneği ve mutasyon oluşturabilmesi araştırılır (IPCS 1985).

1955 ve 1970'lerde karsinojenlerin mutajenitesini göstermek için bakteriyel testler kullanılmış ancak bu testler mutasyon ve kanser arasındaki ilişkinin gösterilmesi için yetersiz kalmıştır. Bruce Ames ve ark. 1973 yılında *Salmonella typhimurium* geriye mutasyon testini geliştirmişlerdir. Testte kullanılan *S. typhimurium* suşlarından her biri spesifik bir gende mutasyon taşırlar. *S. typhimurium* ve *Escherichia coli* kimyasalları metabolize edecek enzim sistemleri olmadığından bu bakterilere memeli laboratuvar hayvanlarının karaciğerlerinden hazırlanan ekstrakt eklenir. Bu amaçla kullanılan sıçanlara öldürülmeden birkaç gün önce Araclor 1254 ya da fenobarbital gibi karaciğer enzimlerini indükleyen kimyasallar enjekte edilir. Karaciğer parçalanıp yüksek hızda santrifüj edildiğinde üstte kalan sıvıda metabolik enzimler bulunur. Bu karışıma S9 fraksiyonu adı verilir. Bu testlerde kullanılan bakteriler genelde özgün bir gende mutasyon taşıyan suşlardır. Testin sonunda mutant allelin kontrole göre geriye dönüşüm oranına bakılarak kimyasalın mutajenitesi hakkında bilgi edinilir (Venitt ve ark. 1984, IPCS 1985).

Maya hücreleri yüksek yapılı organizmalara benzerlik göstermektedir. Maya ve mantarlar genetik yapılarına bakıldığında bakteriler ile hayvanlar arasında yer almaktadır. Fungal DNA ve kromozom organizasyonu memelilere pek çok yolda benzerlik göstermektedir. *S. cerevisiae* gibi mayalarla yapılan testler ileriye ve geriye mutasyonları, mitoz ve mayoz sırasındaki kromozom anöploidilerini saptar (IPCS 1985).

Gen mutasyonlarının taranmasında bakteriyel test sistemleri, ökaryotik maya, *in vitro* memeli hücre kültürleri ve *Drosophila* test sistemleri kullanılırken, kromozom aberasyonlarının belirlenmesinde *in vitro* sitogenetik testler (Sister Chromatid Exchange, Chromosome Aberrations), *in vivo* rodent kemik iliği kromozom aberasyon ve mikronükleus testleri, dominant letal test ve germ hücre kromozom aberasyon testlerinden yararlanılmaktadır (IPCS 1985, Natarajan ve Obe 1986).

Eukaryotik organizma *D. melanogaster* ile gerçekleştirilen testler de genotoksikite testleri içinde önemli bir yere sahiptir. Gen mutasyonları (cinsiyete bağlı resesif letal test, zeste somatik göz mutasyon testi, kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi) ile kromozom hasarlarının (aneuploidi belirleme ve kısmi kromozom kaybı testleri ile somatik mutasyon ve rekombinasyon testi) belirlenmesi için *Drosophila*'da değişik genetik özellikte hatlar oluşturulmuştur (IPCS 1985).

## **2.2. *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ve Çeşitli Kimyasallarla Kanat SMART ile Yapılan Çalışmalar**

Mutajenite testlerinde, mutajenlerin saptanması ve tanımlanması temel bir amaçtır. Diğer önemli bir amaç ise pek çok karsinogenesis ve mutagenesis olaylarını baskılayan antimutajen olarak bilinen ajanların tanımlanmasıdır. Mutajenlerden farklı olarak antimutajenlerin belirlenmesinde kullanılan çok az test sistemi vardır. İki kısa zamanlı mutajenite testinden birisi Ames Salmonella testidir. Ames testi, mutajenlerin ve antimutajenlerin belirlenmesi için çok uygun bir deneydir. Diğer test ise mutajenitenin belirlenmesinde oldukça etkili görülen ancak antimutajenitenin belirlenmesinde daha az kullanılan *Drosophila* Wing Spot testidir (Karekar ve ark. 2000).

Son yıllarda daha fazla kullanılan *Drosophila* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi, kimyasalların mutajenik ve rekombinojenik aktivitelerinin saptanması için uygun bir test sistemi olup (Graf ve ark. 1984), hassas ve ucuz bir metoddur. Mutajenlerin belirlenmesinde kullanılan *in vivo* bir test sistemidir (Frei ve Würgler 1996, Karekar ve ark. 2000). Bu çok yönlü kısa zamanlı test (Hamms ve ark. 1999), sadece mutasyonel olayların çeşitlerini belirlemez, genotoksisite taraması için primer önemli bir bileşiğin rekombinojenik aktivitesinin etkisiyle oluşan mitotik rekombinasyonun belirlenmesine de izin verir (Graf ve Würgler 1996). *Drosophila* ile yapılan bu *in vivo* test yöntemi, mikroorganizmal *in vitro* ve memeli *in vivo* genotoksisite test sistemleri arasında bağlantı oluşturabilir (Frei ve Würgler 1996). Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, nokta mutasyonu, delesyon, kararsız translokasyon, mitotik rekombinasyon ve kromozom kaybı veya ayrılmama gibi, belirli kromozom aberasyonlarının genetik sonuçlarının geniş yelpazesinin saptanmasına izin verir (Graf ve ark.1984, Graf ve ark. 1996, Graf ve ark. 1998). SMART yönteminde kullanılan iki test vardır. Bunlar kanat ve göz leke testidir. Her ikisi de erken embriyonik gelişim sırasında hücre gruplarının (imajinal disk) ayrılması esasına dayanmaktadır. Bunlar, larval gelişimleri esnasında yetişkin sineğin vücut yapısına farklılaşmaya kadar, mitotik olarak çoğalırlar (Graf ve ark. 1996, Graf ve ark. 1998). Somatik sistem çok sayıda avantaj sunmaktadır. Testi yapabilmek için sadece bir sinek generasyonu gereklidir. İki iyi bilinen somatik doku (kanat ve göz) tek bir sinekte çok sayıda hücrenin (bir kanatta yaklaşık 25.000 hücre, bir gözde de yaklaşık 800 ommatidium) analizine izin verir. Sayımı kolay ve hücre belirleyicileri güvenilirdir (Graf ve Würgler 1996). Yaklaşık 20 yıl önce kanat hücre belirleyicileri multiple wing hair (mwh), ve flare'in (flr) kullanımı geliştirilmiştir (Graf ve ark. 1984).

Larvaların imajinel disklerinde mitotik olarak çoğalan büyük hücre populasyonları vardır ve somatik testler bu büyük hücre populasyonunun avantajından faydalanırlar (Graf ve ark.1984, Graf ve ark. 1996, Graf ve ark. 1998). Bu imajinel disk hücrelerinden birisinde bir genetik değişiklik meydana geldiğinde bu değişiklik bu hücrelerden oluşan tüm hücrelerde bulunur ve bunlar mutant hücre klonlarını oluştururlar. Değişimler fenotipte görünür değişimlere neden olursa, mutant hücre klonu, ergin sineğin vücut yüzeyinde mutant hücrelerden oluşan bir nokta olarak belirir

(Graf ve ark. 1984, Graf ve ark. 1998). Mutant lekeler, farklı mutasyon ve rekombinasyon mekanizmalarından oluşabilir (Frei ve Würzler 1996).

SMART test sistemleri, heterozigot veya hemizigot hayvanların vücut yüzeylerinde hücre klonlarının değişimine öncülük eden mutasyon ya da rekombinasyonlardan dolayı (Würzler ve Vogel 1986), heterozigotinin kaybı esasına dayanır (Graf ve ark. 1996, Frei ve Würzler 1996, Graf ve ark. 1998, Tiburi ve ark. 2002). Bu gen markerları, sineklerin gözleri (Würzler ve Vogel 1986) veya kanatlarında ifade edilebilen fenotipleri belirlerler (Graf ve ark. 1996, Graf ve ark. 1998). Somatik yöntemler, germ hücrelerindeki cinsiyete bağlı resesif letaller için olan klasik testlerden farklı olarak yalnızca bir sinek generasyonunda uygulanabilir. Germ hücrelerindeki yöntemlerin tamamlanması için en azından bir aya ihtiyaçları vardır. Ayrıca antigenotoksisite çalışmaları için SMART yöntemleri test bileşiklerinin uygulama protokollerinde çok çeşitlilik ve esneklik sunmaktadır. Bu yöntem test bileşiklerinin tek tek olabildiği gibi, ikili veya daha fazla kombinasyonlar şeklinde ve farklı sürelerde uygulanmasını sağlar. Kendine özgü bu avantajlar SMART yöntemlerini kimyasal ve fiziksel ajanların genotoksisite ve antigenotoksisite testleri için oldukça uygun yapmaktadır (Würzler ve Vogel 1986).

Daha önce yapılan çalışmalarla mutajen oldukları belirlenen, monofonksiyonel ve polifonksiyonel alkilleyici ajanların (etil-metan sülfonat, diepoksi bütan, mitomisin C, trenimon), mutajen yapısındaki büyük adductların (aflatoksin B1), DNA'yı kıran ajanların (bleomisin), interkalasyon yapan ajanın (5 aminoakridin), iğ ipliklerini etkileyen ilaçların (vinblastin) ve antimetabolitlerin (metatoraksat) de bu test yöntemiyle mutajen etkileri gösterilmiştir. Ayrıca test sulu ortamlarda stabil olmayan mutajenlerin (1,2-di brometan), metabolik aktivasyonda rol alan promutajenlerin (aflatoksin B1, dietilnitrozamin, dimetilnitrozamin, mitomisin C, prokarbazin) belirlenmesinde de kullanılır (Graf ve ark. 1984).

Yayınlanan çalışmaların birkaçında bu somatik test sistemleri tek veya karışım halindeki bileşiklerin antigenotoksisitesinin araştırılmasında kullanılmıştır. Örneğin Klorofilin Trp-P-2 (3-amino-1-meytil-5H-pyrido[4,3-b])'nin genotoksisitesini inhibe ettiği kanat leke testi ile ilk kez Negishi ve ark. tarafından gösterilmiştir (Graf ve ark. 1998).

Askorbik asitin gamma ışınlarına ve kromium VI oksidin genotoksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğu kanat somatik hücrelerinde gösterilmiştir (Graf ve ark. 1998).

Graf ve ark. 1998 yılındaki yayınlarında kanat leke testi ile birçok antipiretik ve analjezik maddenin mitomycin C'ye karşı antimutajenik aktivitelerinin Sato ve ark. (1996) tarafından gösterildiğini belirtilmektedir.

Tükettiğimiz yiyecek ve içeceklerin doğal bileşenlerinin, antimutajenik veya antikarsinojenik etkileri belgelenmiştir. Bu antigenotoksik veya antikarsinojenik aktiviteler belli sebze meyvelerde doğal olarak oluştuğu gösterilmiştir (baharat, kahve, çay). Hamss ve ark. 1999 yılında Kanat SMART ile, karışık diyetle zerdeçalın antigenotoksisitesini veya genotoksisitesini değerlendirmek istemişlerdir. İyi bilinen güçlü mutajen ürethan, zerdeçal anti-genotoksisitesini değerlendirmek için kullanılmıştır. Ürethan'ın yalnız kullanılan tüm konsantrasyonlarda üç leke kategorisini de arttırdığı gösterilmiştir. Zerdeçalın ürethan ile birlikte içeri alımı tüm leke kategorilerinin frekanslarında istatistiksel olarak benzer azalmaya neden olmuştur.

2000 yılında Karekar ve ark. birer antioksidan olan E vitamini, kafeik asit ve glutasyonun olası antimutajenitesini test etmek için Salmonella ve Drosophila test yöntemini kullanmışlardır. Promutajen aflatoksin B1'in Drosophila kanat imajinel disk hücrelerinde mutasyonlara neden olduğu için seçildiği bu çalışmada kafeik asit ve glutasyon, AFB1 tarafından arttırılan mutasyonel olayların indirgenmelerinde etkili olurken, E vitamininin böyle bir antimutajenik yanıtı gözlenmemiştir (Karekar ve ark. 2000).

Kaya ve ark. 2000 yılında beş herbisidin (amitrol, metribuzin, prometrin, terbütirin ve dikwad dibromid) Drosophila kanat SMART testi ile genotoksisitelerini araştırmışlardır. Deney sonuçlarında amitrolün 0,5 mM ve 1mM derişimleri küçük tek tip, büyük tek tip ve toplam spot frekanslarını arttırmış. Sadece terbütirin 5 mM derişimde küçük tek tip ve toplam spotların frekansında yanlış pozitif olduğu düşünülen az bir artışa neden olmuştur. Diğer üç herbisid ise hiçbir genotoksik etki göstermemiştir (Kaya ve ark. 2000).

Graf ve ark. 1994 yılında kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde genotoksisiteleri bakımından üç bitkisel çay, bir siyah çay, bir brendi ve beş şarap test edilmiştir. Üç günlük larvalar, içeceklerin farklı konsantrasyonlarıyla beslenmiştir. Kırmızı şaraplardan biri etanol içeriğinden kaynaklanmayan açık bir genotoksik aktivite



göstermiştir. Bitki çayları (*Urtica dioica*, *Achillea millefolium*) ve siyah çayın (*Camelia sinensis*) zayıf genotoksik olduğu ortaya çıkmıştır. Bitki orijinli içeceklerde bulunan 2-flavanol quersetin ve rutin *Drosophila* somatik hücrelerinde zayıf genotoksik aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar aynı zamanda *Drosophila in vivo* somatik metodun, içecekler gibi karışımların genotoksitelerini saptayabildiğini göstermektedir (Graf ve ark. 1994)

### **2.3. Kanser ve Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçların Etki Şekilleri**

Mutasyona neden olan çevresel ajanlar kanser gelişiminde rol oynamaktadırlar. İyonize radyasyon, kimyasallar ve virüsler gibi çevresel karsinojenler genelde etkilerini mutasyona neden olarak gösterirler. Oluşan bu mutasyonlar kanserde önemli rol oynarlar. Kanser, normal metabolik sınırlanmalarının (kontakt inhibisyon) çoğu kaybolmuş hücreler tarafından karakterize edilen bir hastalıktır. Kanser hücreleri anormal proteinler üretirler, farklı hücre yüzey proteinleri oluştururlar. Normal hücreler diğer hücreler ile kontakt inhibisyon içinde olup birbirlerine değdiklerine bölünmelerini durdururlar ancak kanser hücrelerinde bu kontakt inhibisyon kaybolduğundan diğer hücrelerle temas halinde bile kontrolsüzce bölünmektedirler (Smith ve Wood 1991).

Kanser hücreleri bulunduğu yerden metastaz yapabilme yeteneğine sahiptirler. Kanser hücrelerinde hücre döngüsünün kontrolü kaybolmuş ve hücre çoğalması hızlanmıştır (Waters ve ark. 1999). Kanser genetiği ile ilgili çalışmalar kanserin somatik hücrelerde mutasyonla başladığını ve bu mutasyonun hedef doku hücresine spesifik olması gerektiğini göstermektedir (Yuspa 2000). Karsinojenik süreç hem mutajenik ve mutajenik olmayan hem de karsinojenik olmayan kimyasallar tarafından indüklenebilmektedir (Barret 1995)

Hücre döngüsünü kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyonların kanser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Normal fonksiyonu hücre bölünmesini teşvik etmek olan proto-onkogenler sürekli çalışır hale gelirse kontrolsüz hücre bölünmesine neden olurlar (Klug ve Cummings 2002). Normalde hücre bölünmesi ve gelişimi gibi hayati hücre fonksiyonlarını gerçekleştiren proteinleri kodlayan bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu bu genler onkogenler veya kansere neden olan genler olarak karşımıza çıkarlar. Onkogenler hatalı protein üreterek hücre bölünmesinin aşırı artışına sebep olurlar (Brusick 1987, Smith ve Wood 1991).

Karsinogenes sürecinin tanımlanmasında kullanılan klasik ve de moleküler modeller malign tümörlerin gelişmesi için çeşitli mutajenik delillerin gerekli olduğunu göstermektedir (Waters ve ark. 1999). Kromozom kayıpları, kromozom lokuslarına viral DNA dizilerinin girmesi (Klug ve Cummings 2002), Gen mutasyonları, gen amplifikasyonları, kromozomların yeniden düzenlenmeleri ve anöploidi çeşitli tipte tümörlerle bağlantılıdır. Kimyasallar ve genetik değişikliklerin birçok tipine neden olan diğer ajanlar karsinogenesise karışan genlerde hasarlar yaparlar. Genetik hasarların bu tiplerini saptayan kısa zamanlı testler, özellikle *in vivo* memeli hücrelerinde kimyasalların karsinojenik risklerini ölçmek için bilgi sunmaktadır (Waters ve ark. 1999).

Antimetabolitler DNA, RNA ve proteinlerin sentez zincirlerinde değişik basamaklarda substrat veya koenzim olan çeşitli metabolitlerin analoglarıdır. Bu şekilde enzim bağlanmalarını inhibe ederek işlev görürler (Salmon ve Apple 1974). Bu antimetabolit bileşiklerden methotrexate, merkaptopurin, thioguanin, fluorourasil ve cytarabine’i kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara örnek olarak verebiliriz (Lazo ve Larner 1998).

Alkileyici ajanlar, DNA ile çapraz bağlanarak alkil grupları eklerler. Replikasyon ve transkripsiyonu engelleyebilirler. Bu yüzden alkileyici ajanların çoğu antitümör ilaç olarak kullanılmaktadır (Frenzilli ve ark. 2000). Bu tür ilaçlara, melphalan, chlorambucil, cyclophosphamide, carmustin ve procarbazine’i örnek gösterebiliriz (Lazo ve Larner 1998).

İnterkalasyon yapan ajanlar, bazlar arasına girerek okuma kalıbının değişimine sebep olurlar. Bu tip antibiyotik kökenli bileşiklere, daunorubicin, doxorubicin, actinomycin D, bleomycin ve mitomycin C örnek verilebilir (Lazo ve Larner 1998). Doxorubicin ve daunorubicin, çift zincirli DNA’da bazlar arasına girerek interkalasyon yapar, topoizomeraz II’yi baskılar ve serbest radikal oluşumuyla etki eder. Başlıca antitümör aktivitesi DNA topoizomeraz aktivitesini baskılamasıylaadır. Topoizomeraz II’de DNA replikasyonu için esastır.

Actinomycin D’ de DNA’ya interkalasyon yapar ve böylece transkripsiyonu bloke eder. Başlıca antitümör aktivitesi de bu şekilde gözükmektedir. Actinomycin serbest radikal oluşumuyla DNA çift zincir kırıklarının oluşumuna neden olur ve RNA’nın sentezini engeller (Lazo ve Larner, 1998).

Bitki alkaloidleri, mitoz sırasında hücre döngüsünün metafaz safhasında iğipliklerini bozar, mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek etkilerini gösteren gruptur. Bu gruptaki ilaçlara vincristin, vinblastin, etoposide, taxol örnek verilebilir (Lazo ve Larner, 1998).

#### **2.4. Antineoplastik Ajanlarla Yapılan Kanat SMART Çalışmaları**

*D. melanogaster* kanat SMART yöntemi ile kanser tedavisinde kullanılan birçok antineoplastik ajanın genotoksik ve mutajenik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlarla aslında tedavi amaçlı kullanılan birçok ilacın mutajenik ve genotoksik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmalara örnek verilebilecek birkaç araştırma aşağıda kısaca verilmiştir.

Deoksisitidin analogu olan 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine (sitosin arabinosid, sitarabin, ara-C) ve 5-aza-2'-deoksisitidin (desitabin, DAC, 5-aza-dC) akut myeloid lösemi tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçlardır. Ara-C ve 5-aza-dC'nin genotoksik potansiyelleri *D. melanogaster* kanat SMART yöntemi ile araştırılmıştır. Bu antimetabolitler mwh/TM3 ve mwh/flr<sup>3</sup> genotiplerinde 4 farklı konsantrasyonda denenmişlerdir. Mwh/flr<sup>3</sup> genotipinde her iki ilaç tüm konsantrasyonlarında ve tüm leke kategorilerinde pozitif genotoksik etki göstermiştir. mwh/TM3 genotipinde ise 5-aza-dC tüm dozlarda anlamlı mutajenik aktivite gösterirken ara-C yalnızca en yüksek konsantrasyonda mutajenik bulunmuştur. Bu sonuçlar da her iki antimetabolitin en büyük genotoksik etkisinin rekombinojenik aktivite olduğunu göstermiştir (Cunha ve ark. 2002a).

Heres-Pulido ve ark. (2004) yaptıkları bir çalışmada tamoksifen ve 4-nitroquinoline-1-oxide'nin genotoksik etkilerini *D. melanogaster* kanat SMART yöntemiyle araştırmışlardır. Tamoksifen meme kanserinden korunma ve tedavide kullanılan bir antiöstrojen, 4-nitroquinoline-1-oxide ise kısa zamanlı testlerde puliripotent bir karsinojen ve kuvvetli bir mutajen olduğu gösterilen bir ajandır. Çalışılan bu yöntemle tamoksifen zayıf bir genotoksisite gösterirken, 4-nitroquinoline-1-oxide ise tamoksifenden çok daha genotoksik bulunmuştur. Ayrıca 4-nitroquinoline-1-oxide sitokrom p-450 enzim metabolizmasına bağlı olarak yüksek rekombinojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

*D. melanogaster* kanat SMART yöntemi ile ökaryotik DNA topoizomeraz II inhibitörü olan ellipticine, teniposide, etoposide ve DNA topoizomeraz I inhibitörü olan camptothecine'in genotoksik etkileri araştırılmıştır. Spot frekansı maruz kalınan ajanların milimolar ünitesiyle standardize edilmiştir. mwh/flr<sub>3</sub> genotipinde en yüksek spot indüksiyon frekansı camptotechin de olup, sırasıyla teniposide, ellipticine, etoposide doğru spot indüksiyon frekansları azalmıştır. mwh/TM3 genotipinde spot frekansı önemli ölçüde azalmıştır (Frei ve Würzler 1996).

Camptothecine (CPT) ökaryotik DNA topoizomeraz (top I)'i hedef alan antikanser ajandır. CPT ve klinik antineoplastik analogları irinotecan (CPT-11) ve topotecan (TPT) *D. melanogaster* de kanat SMART ile değerlendirilmiştir. Bu bileşikler (CPT, CPT11, TPT) topoizomeraz-DNA kompleksine engel olurlar. Test sonuçları tüm bileşiklerin benzer genotoksik etkiye sahip olduklarını göstermiştir. TPT'nin en genotoksik bileşik olduğu gösterilmiştir. Maruz kalınan her milimolar üniteye karşılık CPT ve CPT11 sırasıyla 7 ve 28 kez TPT'den daha az mutant klon oluşturmuştur (Cunha ve ark. 2002b).

DNA topoizomeraz inhibitörleriyle yapılan genotoksisite çalışmalarından birisinde nalidixic asit, camptothecin, m-amsacrin ve etoposide'in genotoksik etkileri SMART yöntemiyle araştırılmıştır. Nalidixic asit ve amsacrin'in mutant klon sayısını arttırmadığı buna rağmen camptothecin ve etoposide'in mutant klon sayısını anlamlı derecede arttırdıkları, dolayısıyla genotoksik oldukları belirlenmiştir. Camptothecine'in etoposide den daha kuvvetli bir genotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Torres ve ark. 1998).

Vinca alkaloidleri olarak bilinen Vinblastine (VBL), Vincristine (VCR) ve semisentetik analogları Vinorelbine (VNR), otuz yılı aşkın bir süredir kanser tedavisinde kullanılmakta olan bileşiklerdir. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksisiteleri araştırılmıştır. Her üç ilacında toksisitesine bakıldığında, marker heterozigot larvalarda pozitif etki gösterdiği toplam spot frekansında istatistiksel açıdan anlamlı artışların olduğu belirlenmiştir. En düşük toksisiteye sahip ilacın VCR olduğu gösterilmiştir. İkiz klonlar hiçbir ilaç aktivitesinden etkilenmemiştir. Bu üç mikrotübül antagonisti transheterozigot sineklerde toplam single spot frekansını istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmıştır. VCR ve VBL'nin *Drosophila* göz veya kanat SMART deneyinde non-disjunction oluşturduğuna dair

pozitif sonuçlar elde edilmiştir. VCR'nin kanat SMART ile kromozom kırıklarını arttırdığı belirlenmiştir (Tiburi ve ark.2002).

## **2.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

### **2.5.1. Gemcitabine (Gemzar)**

Gemcitabine (2',2'-difluorodeoksisitidin), deoksiriboz şekerin 2' pozisyonundaki 2 hidrojen atomunun yerine 2 flor atomu içeren bir deoksisitidin analogudur. Gemcitabine adı kısmen, 2' pozisyonundaki (geminal pozisyon) 2 flor atomundan türetilmiştir.

Gemcitabine bir nükleosid analogu olup (Plunkett ve ark. 1995a, Heinemann ve ark. 1995, Mason ve ark. 1999), göğüs, ovaryum, pankreas, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve meme kanserinin tedavisinde kullanılan pirimidin antimetabolitidir (Heinemann 1996). 2'2'-difluorodeoksisitidin çeşitli katı tümörlere karşı aktivite gösteren (Plunkett ve ark. 1995a, Auer ve ark. 1997, Mason ve ark. 1999), *in vivo* ve *in vitro* anti-tümör etkisi kanıtlanmış antineoplastik bir ajandır (Heinemann ve ark. 1995, Auer ve ark. 1997, Rieger ve ark. 1999). Ayrıca Gemcitabine hücrel onarımı engelleyip, apoptosisi teşvikler ve tümör hücrelerinin büyümesini engeller (Mason ve ark.1999).

Genel olarak nükleosid antimetabolitleri, viral hastalıkların ve tümörlerin tedavisinde kullanılan en etkili sınıf ilaçlardandır. Nükleosid analoglarının tamamına yakını hücre içine girip nükleotid formlarına fosforlanmalarından sonra aktifleşirler. Nükleosid antimetabolitleri, biyolojik aktiviteleri nedeniyle, hücre bölünmesi ve diğer ajanların oluşturduğu DNA hasarının onarımı için gerekli olan DNA sentez metabolizmasını hedef alırlar (Plunkett ve ark. 1995a).

Diğer nükleosid analogları gibi Gemcitabine de tümör hücrelerine karşı etkisini gösterebilmesi için fosforlanarak aktifleşmesi gerekmektedir. Gemcitabine hücreler arası fosforilasyonla aktif ana metaboliti olan dFdC trifosfata dönüşür (Plunkett ve ark. 1995a, Heinemann ve ark. 1995, Heinemann 1996, Rieger ve ark. 1999).

Gemcitabine'in hücre içersine transportunun nasıl olduğu Çin Hamsteri ovaryum hücrelerinde araştırılmıştır. Gemcitabine'in, yine antineoplastik bir ilaç olan ara-C'den çok daha fazla oranda hücre içersine alındığı saptanmıştır. Gemcitabine'nin oldukça

lipofilik olduğu, ancak bu özelliğin özel transporterlara olan afinitesini etkileme şekli veya difüzyonla hücre zarından yeterli miktarda geçişine etkisi tam olarak bilinmemektedir (Plunket ve ark. 1995a). Hücre içine giren Gemcitabine deoksisitidin kinaz tarafından hızla fosforlanır (Plunket ve ark. 1995a, Plunket ve ark. 1995b, Rieger ve ark. 1999). Fosforlanma ile başlayan bu aktivasyonun oranı deoksisitidin aktivitesine bağlıdır (Heinemann ve ark. 1995). Deoksisitidin kinaz, Gemcitabine difosfat ve Gemcitabine trifosfat aktif metabolitlerinin oluşmasını sağlayan rate-limiting bir enzimdir (Plunket ve ark. 1995b). Gemcitabine, hücre içinde deoksisitidin kinazlar tarafından Gemcitabine monofosfata fosforlanmak için kullanılan iyi bir substrattır. İnsan Molt 4 hücrelerinden saflaştırılmış deoksisitidin kinazla yapılan çalışma bunu doğrulamaktadır. Ayrıca üridin trifosfat, adenosin trifosfattan daha etkili bir fosfat vericisidir. Deoksisitidin kinaz Gemcitabine'nin fosforlanması için çeşitli kaynakları kullanmaktadır. İlk olarak, hücrenin canlılığı deoksisitidin kinaz eksikliğinde Gemcitabine'den etkilenmez. İkinci olarak, eksojen deoksisitidin, konsantrasyondan bağımsız şekilde Gemcitabine sitotoksitesini ters çevirir. Son olarak, hücre ekstraktlarında nükleosid kinazların ayrılması, Gemcitabine'nin deoksisitidin kinaz tarafından fosforlandığını göstermiştir. Ancak deoksiguanosin kinaz ya da adenosin kinaz Gemcitabine'i fosforlamamıştır. Ayrıca deoksisitidin kinaz, hücrelerde Gemcitabine trifosfatın birikiminde orana bağlı sınırlayıcı etki gösterir. Gemcitabine yüksek konsantrasyonlarda deoksisitidin kinazın substrat inhibitörü olarak hareket eder. Difosfat Gemcitabine, Gemcitabine trifosfata (dFdCTP) ubiquitus non-spesifik enzim nükleosid difosfat kinaz tarafından dönüşür (Plunket ve ark. 1995a).

Gemcitabine monofosfat dCMP deaminaz için oldukça iyi bir substrattır. Substrat etkinliği, doğal substrat dCMP'in yaklaşık %10'u kadardır. Nükleosidin tersine ürün 2'-2'-deoksiüridin monofosfat (dFdUMP) fosforilasyon için iyi bir substrat olarak gözükmektedir (Plunket ve ark. 1995a).

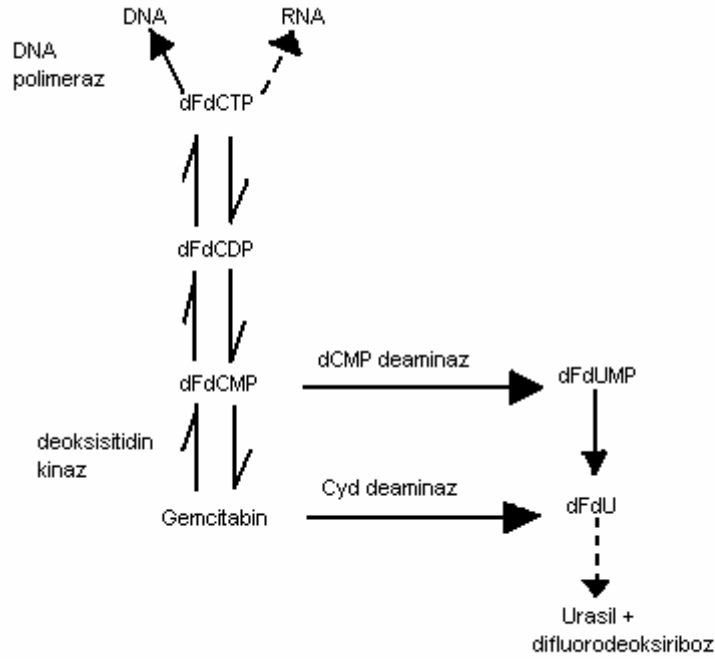
dCMP deaminaz aktivatör olarak dCTP'ye ihtiyaç duyar. dCTP yokluğunda enzim, Gemcitabine monofosfata doğru küçük bir aktivite gösterir. Gemcitabine ile inkübasyon sırasında dCTP konsantrasyonunda düşüş, dCMP deaminaz aktivitesinin kaybıyla paraleldir (Plunket ve ark. 1995a).

Gemcitabine difosfat ve Gemcitabine trifosfat DNA sentezi için gerekli olan çeşitli süreçleri baskılar (Plunket ve ark. 1995a). Örneğin Gemcitabine difosfat, DNA

sentezi ve onarımında gerekli olan deoksiniükleotidlerin yapımından sorumlu ribonükleotid redüktazı baskılamaktadır (Plunket ve ark. 1995b).

Hücrede deoksiniükleotidlerin özellikle dCTP'nin azalması Gemcitabine nükleotidlerinin DNA'ya bağlanmasının artışına sebep olur (Plunket ve ark. 1995a, Plunket ve ark. 1995b, Mason ve ark. 1999). Ayrıca hücresel düzenleyici süreçte rol oynayan Gemcitabine metabolitleri, hücre büyümesinde engelleyici aktivite gösterir. Bu etkileşim self potentiation olarak adlandırılır ve diğer antikanser ilaçlarının çok azında görülmüştür (Plunket ve ark. 1995a).

dFdC'nin *in vitro*'da lenfoblastoid hücre hatlarında apoptosise neden olduğu gösterilmiştir. Ribonükleotid redüktaz, ribonükleotid difosfat redüktaz, deoksisitidin kinaz ve deoksisitidin monofosfat baskılanması yoluyla deoksiniükleotid trifosfatın hücresel havuzunu bozar (Auer ve ark. 1997). *In vitro* primer extension metodu kullanılarak uzayan DNA zincirinin sonuna dFdC nükleotidinin girmesinin ardından, bir deoksiniükleotid eklenmesiyle 3' ucunun uzadığı ve DNA polimeraz için büyük bir ara bölge meydana getirildiği bulunmuştur (Plunket ve ark. 1995a, Auer ve ark. 1997). Bu noktadan sonra DNA polimerazlar sentez için ilerleyemezler. Bu etki maskelenmiş terminasyon olarak adlandırılır. Gemcitabine'nin DNA içine kilitlenmesi, proof-reading eksonükleaz aktivitesiyle sondan bir önceki konumdan Gemcitabine nükleotidinin çıkartılmasını engeller (Plunket ve ark. 1995a, Plunket ve ark. 1995b). Gemcitabine bir kez DNA'ya yerleştiğinde dFdC'nin karşısına komplementer zincirde uygunsuz nükleotidler yerleşir (Plunket ve ark. 1995a). Hücredeki Gemcitabine'nin bilinen metabolik işleyişi Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Gemcitabine'nin hücredeki metabolik işleyişi

Gemcitabine'nin biyolojik aktivitesinde önemli rol oynayan kimyasal değişikliklerden biri deoksisisitidin 2. karbonunun hidrojenlerinin yer değiştirmesidir. Bu bölge, DNA polimeraz ve ribonükleosid difosfat redüktazların diskriminasyonunda primer bölgedir. Bu enzimlerin, ilaçlar için hedef olabilecekleri tahmin edilebilir. Gemcitabine'nin baskılayıcı etkisi DNA metabolizmasına katılmasıyla yönetilir (Plunket ve ark. 1995a).

Radyoaktif işaretleyicilerle yapılan DNA, RNA ve protein sentezi çalışmaları, Gemcitabine'in doğrudan olan asıl etkisinin DNA üzerine olduğunu göstermiştir. Birkaç saat Gemcitabine ile muamele edilen insan T lenfoblastlarından elde edilen nükleik asitlerin yoğunluk gradientlerindeki ayrılma, radyoaktivitenin neredeyse tamamının DNA ile ayrıldığını göstermiştir. Uzun inkübasyon periyodu RNA ile radyoaktivitenin küçük bir fraksiyonunun bağlantısıyla sonuçlanmıştır. DNA yıkımı, Gemcitabine monofosfatın %90'dan daha fazlasının DNA'da iç kısımlarda lokalize olduğunu göstermiştir. Bu da DNA ve Gemcitabine monofosfatın, DNA polimerazlar ile uzatılabilen 3'terminal bölgede birleştiğini gösterir. DNA sentezinin model sistemi, Gemcitabine trifosfatın tüm insan DNA polimeraz alfa ve epsilon tarafından uzayan



primer ipliğe katıldığını doğrular. Ribonükleotid redüktazların Gemcitabine difosfatlarla inhibe edilmesi, hücrelerde dCTP'nin Gemcitabine trifosfata oranını azaltır. Çünkü bu nükleotidler DNA polimerazlarla DNA'ya girmek için yarışır (Plunket ve ark. 1995a).

Gemcitabine monofosfatın sondan bir önceki nükleotid konumuna yerleşmesinden sonra DNA polimeraz zincire bir deoksinekleotid daha ekler. Böylece Gemcitabine nükleotidinin aradan kesilip çıkartılması zorlaşır. Bu nedenle Gemcitabine nükleotidi DNA ile birleştiğinde DNA'da cap veya maske analogu olarak görev yapar ve buradan çıkartılmaya daha dirençli hale gelir. Bu olay maskeli terminasyon olarak adlandırılır (Plunket ve ark. 1995b). Bu model polimeraz ilerlemesini durduran arabinosil bileşiklerinin bağlanmasından farklıdır. DNA polimerazların 3'-5' eksonükleaz aktivitesi, Gemcitabine ve ara-C gibi karbohidrat analoglarının DNA'dan çıkarılmasını sağlar. Yapılan genetik çalışmalar DNA'ya bağlanmış olan ara-C monofosfatın DNA ucundan, insan DNA polimeraz epsilonununun 3'-5' proof-reading eksonükleaz aktivitesiyle çıkartılabileceğini göstermiştir (Plunket ve ark. 1995a). Tüm hücre tiplerinde, DFdC içeren DNA'lar DNA çift zincir kırıklarının oluşumuna öncülük eder (Auer ve ark. 1997).

Gemcitabin ile yapılmış çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. *In vivo* fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus (MN) ve kromozom aberasyonu (CA) yöntemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada Gemcitabin'in genotoksik etkileri araştırılmıştır. Gemcitabine çalışılan tüm dozlarda mikronükleus frekansını arttırmıştır. Benzer şekilde Gemcitabine kromozom aberasyonunu da istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmıştır (Aydemir ve Bilaloğlu 2003).

Gemcitabine ile insan lenfosit kültürlerinde *in vitro* yapılmış bir başka çalışmada ise gemcitabine uygulanan tüm dozlarda insan periferik kan lenfositlerinde yüksek düzeyde kromozom aberasyonu ve sister kromatid exchange (SCE) oluşturmuştur (Aydemir ve ark.2005).

### 2.5.2. Fotemustin (Muphoran)

Kloretilnitrozürelere, alkilleyici antineoplastik ajanların bir grubu olup, fotemustin lipofilik kloretilnitrozüreden türetilmiştir (Hargrave ve ark. 2002, Merlin ve ark. 2002). Fotemustine, nitrozüre radikalleri üzerine aşılınmış, fosfoalanin taşıyıcı bir grup ile karakterize edilebilen, düşük molekül ağırlıklı, yüksek lipofilik kapasitesi olan, üçüncü generasyon alkilleyici ve karbomilleyici etkiye sahip nitrozüre ailesinden sitostatik bir antikanser ajandır (Malhaire ve ark. 1999, Hargrave ve ark. 2002). Bu kimyasal yapı, aminoasit transport sistemini kullanarak kan-beyin bariyerine ve hücre membranına çok iyi nüfuz edebilmeyi sağlamaktadır (Hargrave ve ark. 2002). Terapötik aktivitesi beyin metastazlarını içeren yayılmış melanomlarda ve beyin tümörlerinde (Merlin ve ark. 2002), baş- boyun kanserlerinde (Merimsky ve ark. 1991) başta olmak üzere birçok katı tümöre karşı gösterilmiştir. İlacın hareket tarzı DNA zincir kırıkları ve DNA- protein çapraz bağlarının içerildiği, çapraz bağlar yapmak şeklindedir (Merlin ve ark. 2002). Ayrıca ilaç sitostatik aktivitesi ile G2 fazındaki hücrelerin akümüülasyonunu indükleyerek hücre siklusu üzerine etki etmektedir (Malhaire ve ark. 1999).

### 2.5.3. Amifostine (Etiyol)

Amifostine [(WR2721, S-2-(3-aminopropilamino)-etilfosforotiotik asit)], sisteamin analogu olup, fosforlanmış aminotiol ön-ilacıdır (Campos Nebel ve ark. 2002). Amifostine'in aktif hale geçebilmesi için defosforile olması gerekir. Bu defosforilasyon olayının membrana bağlı alkalın fosfatazlar aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Serbest ve defosforile olmuş tiyol WR1065 hücre içine geçebilen formudur (Campos Nebel ve ark. 2002, Blasiak ve ark. 2002, Acosta ve ark. 2003, Blasiak ve ark. 2003), WR1065 reaktif oksijen türlerinin potansiyel süpürücüsü olup (Acosta ve ark. 2003, Blasiak ve ark. 2003), normal dokularda bulunur (Campos Nebel ve ark. 2002).

Hücre koruyucu ajanların kullanımı, normal dokularda radyoterapötik ve kemoterapötik toksisitenin azaltılması için alternatif bir yoldur (Campos Nebel ve ark. 2002). Amifostine, kemoterapi veya radyasyon tedavisi olan hastalarda seçici bir hücre koruyucu ajan olarak kullanılmakta olup, reaktif oksijen türlerinin potansiyel süpürücüsüdür (Blasiak ve ark. 2003). Amifostine seçici olarak normal hücreleri,

kemoterapinin toksik etkilerine, serbest radikallerin süpürülmesiyle hidrojen iyonlarının serbest radikallere aktarılması, oksijenin tüketilmesi ve antineoplastik bileşiklerin aktif türevlerine bağlanmasıyla radyasyona karşı koruyabilir (Blasiak ve ark. 2002, Campos Nebel ve ark. 2002, Acosta ve ark. 2003). Amifostine'in hücre koruyucu etkisi, nefrotoksite, nörotoksiteye görülür. Bu koruyucu etki, ovaryum, serviks, akciğer, baş ve boyun kanserlerinde klinik olarak kullanılmaktadır. Amifostine'in hücre koruyucu etkisi, serbest radikalleri süpürebilme yeteneğine ve antimitojenik etkilerine bağlıdır (Acosta ve ark. 2003).

*In vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalar, Amifostine'in radyasyon terapisinden ya da kimyasal ilaçlardan (cisplatin, cyclophosphamid, carboplatin, doxorubicin, paclitaxel) kaynaklanan toksisiteye karşı etkili bir hücre koruyucu aktivitesi olduğunu öne sürmektedir (Campos Nebel ve ark. 2002).

Aminotiyol ön ilacı amifostine'in hücre koruyucu antioksidan etkisi MDS'li (myelodysplastic syndrome) hastalarda kullanımıyla gösterilmiştir (Invernizzi ve ark. 2002). Akut miyeloidli lösemili (AML) hastalarda, amifostine'in yararlı etkileri rapor edilmiştir. *In vivo* AML hücrelerinde telomeraz aktivitesinin azaltılmasıyla bağlantılı olduğu belirlenmiştir. *In vitro* da amifostine hücre canlılığını yükseltir, apoptosisi geciktirir (Acosta ve ark. 2003).

WR 1065'in içerdiği hücre koruyucu ve antijenotoksisite mekanizması şu şekilde işlemektedir:

- Serbest radikallerin süpürülmesi,
- DNA'nın kimyasal onarımına katılmak,
- Endojen antioksidanları koruma,
- Oto oksidasyon süreçlerden oluşan hücreler arası hipooksik durumları teşvik etmek,
- Bağlanan DNA'yı koruma ve dengede tutma (Campos Nebel ve ark.2002).

## 2.6. Drosophila'nın Yaşam Döngüsü

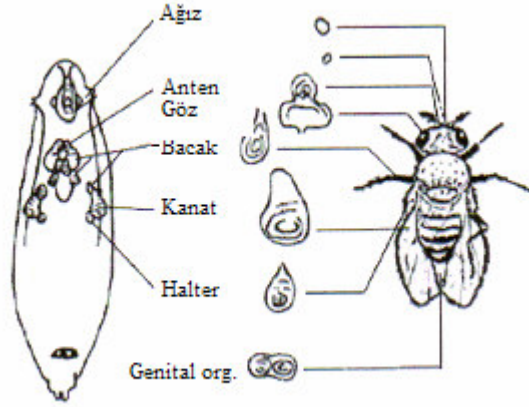
Yıllardır kapsamlı bir şekilde çalışılan *Drosophila melanogaster* tam başkalaşım gösteren diptera ordosuna ait bir meyva sineği türüdür (IPCS 1985, Mitchell ve Combes 1984, Würgler ve Vogel 1986). *Drosophila*'nın en ideal yaşam şartları 25 °C de %60 bağıl nem ortamıdır. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık peryotta tutulduğunda 9 ile 20 günde yumurtalardan yetişkin bireyler meydana gelir. Üç peryottan oluşan larval safhalarında 3. larval evrede oluşan pupa imago ya da yetişkin sineğe gelişir. Bu sıcaklık en hızlı üreme zamanı olup en iyi canlılıktadır. 25 °C den düşük sıcaklık *Drosophila*'nın yaşam döngüsünü uzatır. Stoklar en yüksek 29 °C ve en düşük 18 °C ye ayarlanarak daha hızlı veya yavaş üreme zamanı elde edilebilir (Greenspan 2004).

*Drosophilaların* yaşam döngüsünde embriyonik gelişim bir gün, birinci larval evre bir gün, ikinci larval evre bir gün, üçüncü larval evre iki gün, prepupa evresi 4 saat, pupa evresi 4.5 gün (IPCS 1985, Würgler ve Vogel 1986). Larval safhaları üç peryottan oluşan *Drosophilaların* üçüncü larval evrede oluşan pupanın imago ya da yetişkin sineğe gelişmesiyle bir generasyon tamamlanmış olur (Greenspan 2004). Yetişkin evrede ise sinek 40-50 gün arasında hayatta kalır. İlk instar larvalarda yumurtadan çıkmadan 1.5 saat sonra gonodal dokuların ayrılması görülür. Beyaz segmentli kurt benzeri larvalar sürekli beslenirler, mamanın içine doğru ilerlerler ve beş günlük varlıkları boyunca kendi ağırlıklarının üç katını tüketirler. Ağırlıkları 0.05 mg dan 2.0 mg'a ulaşır. Pupalaşma sırasında larval materyal dejenere olur ve imajinal disklerden kaynaklanan yetişkin dokular oluşur. Bu safha sırasında kütikül kararır, sertleşir ve pupa şişenin yüzeyine yapışır. Beş gün sonra pupa, yetişkin sineğe gelişir. Yetişkin sinekler 2-3 mm uzunluğunda olup, dişiler erkeklerden biraz uzundur. Vücutları üç segmentten oluşur, baş, toraks, abdomen. Dişilerde kuyruk yoğun bir şekilde melaninlenmiş olarak abdomenin sonundadır ve kuyruğun sonu tam olarak yuvarlaktır. Dişilerin abdomeni dengeli olarak renklenmiştir, bileşik segment değildir ve renklenme daha belirgindir. Bu özellikler cinsiyetin belirlenmesinde yeterlidir. Ancak, çok genç erkeklerde abdomen yoğun bir şekilde melaninlenmediğinden dişi birey seçiminde hatalar olabilir. Cinsiyetin tam olarak anlaşılması için erkeklerin her bir ön ayağındaki seks tarağı karakteristiktir (Mitchell ve Combes 1984) Seks tarağı ön ayağın hemen hemen yarısındaki eklem

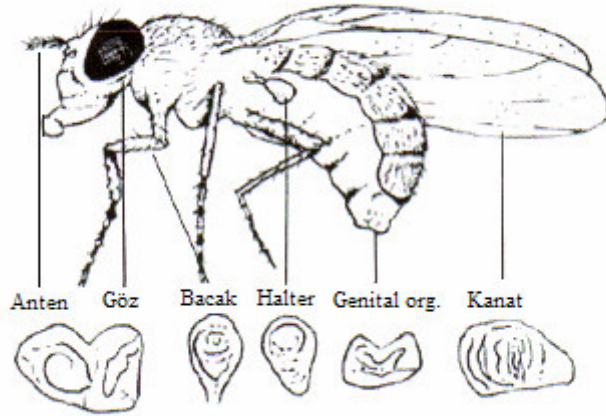
yerinde koyu renk sıra sıra kıllardır (Mitchell ve Combes 1984, Graf ve ark.1992). *Drosophila*'nın imajinel disk yerleşimleri Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'te verilmiştir.

Dişiler iki X kromozomundan, erkeklerde bir X ve bir de Y kromozomundan oluşurlar (Mitchell ve Combes 1984, Greenspan 2004).

Kendilerini fenotipik ya da letal mutasyonlar olarak ifade eden *Drosophila* genleri belirlenip haritalandırılmıştır. Genetik olaylar hem somatik hem de germ hücrelerinde analiz edilebilir. Memeli benzeri detoksifikasyon yolu *Drosophila*'da gösterilmiştir. Bakterilerden farklı olarak çok hücreli ökaryot *Drosophila*, memelilere daha benzer hücresel ve kromozomal yapıya sahiptir. Test sistemlerinde model organizma olarak *Drosophila* kullanmanın çeşitli avantajları vardır. *Drosophila*'nın yaşam döngüsü süresi kullanışlıdır. Çok sayıda soyun hızlı analizine izin vermesi bakımından yeterince kısa ancak, kronik, akut ve ayrıştırılmış dozları ayırt etmek için de yeterince uzundur (Mitchell ve Combes 1984, Greenspan 2004). *Drosophila*'nın beslenmesi kolay ve ucuz, bayılması kolaydır. Tek bir dişi birey 1 ile 400 arasında değişen sayıda döl verebilir. Küçük yapılı canlı olup, çok sayıda birey oluşturabilme kapasitesi *Drosophila* deneysel üretimler ve kullanımlar için avantajlı konuma getirmektedir(Kohler 1994). Genetik çalışmalar için kullanılacak birçok mutant hatta sahiptir. *Drosophila*'da sitokrom p-450 bağımlı oksijenazlar, sitokrom b<sub>5</sub>, aril hidrokarbon hidroksilaz ve xenobiotik metabolizma enzim bileşenlerinin bulunduğu gösterilmiştir. *Drosophila*, genetik olarak aktif türlerde promotajen ve prokarsinojenlerin geniş bir dizisinin değiştirilmesi için potansiyel enzimatik aktiviteye sahiptir (IPCS 1985).



Şekil 2.2. *D. melanogaster*'de imajinel disk yerleşimleri

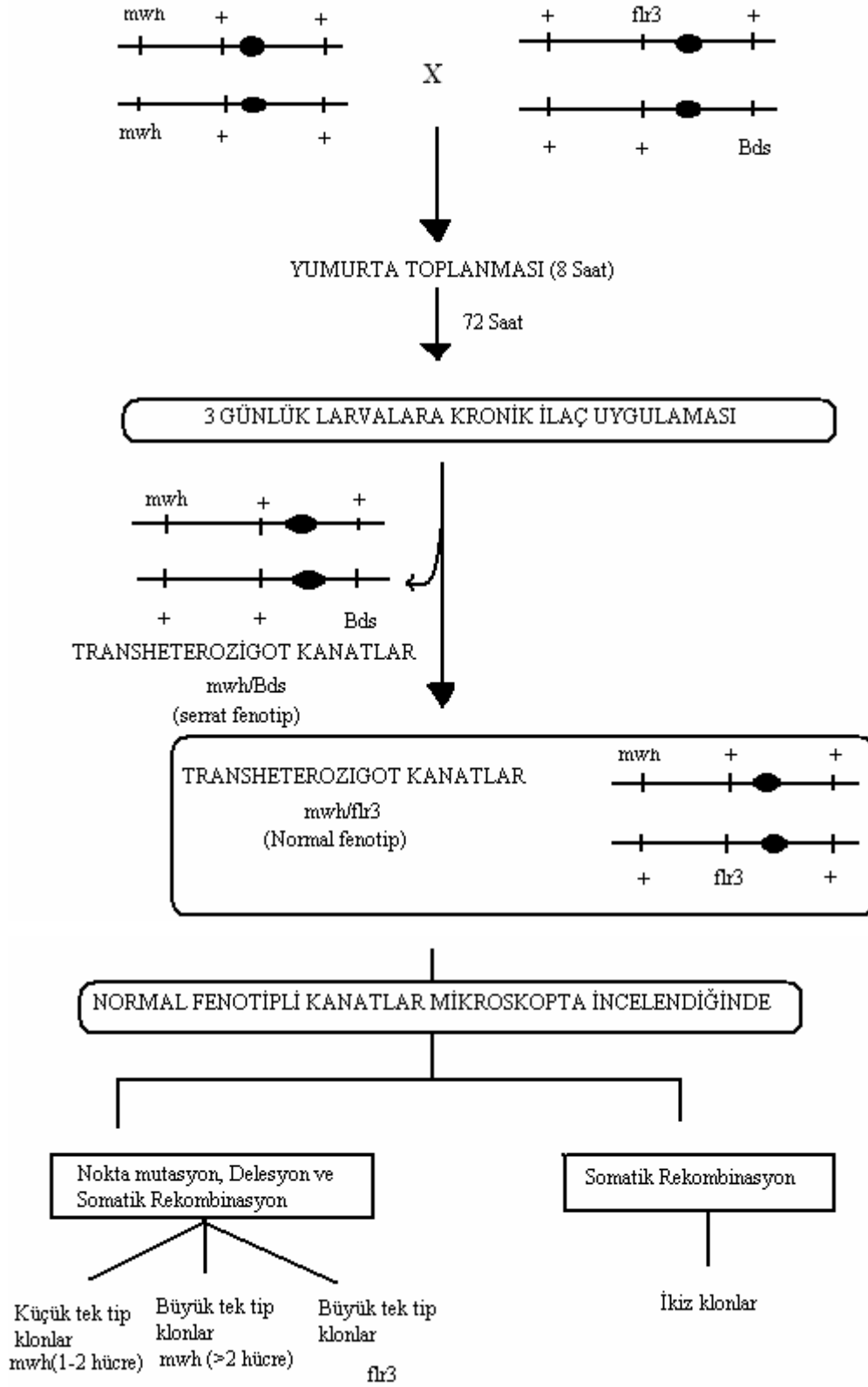


Şekil 2.3. *D. melanogaster*'de imajinel diskler ve oluşturduğu kısımlar

### 3. MATERYAL VE METOD

Antineoplastik ajan olan Gemcitabine ve Fotemustine ile hücre koruyucu etkisi olan Amifostine'in genotoksikolojik etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada Graf ve arkadaşları tarafından (1984) ayrıntılı olarak tanımlanan Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi kullanıldı. Kimyasalların mutajenik ve/veya rekombinojenik etkilerinin saptanabildiği bu test ökaryotik *in vivo* bir test sistemidir (Graf ve ark.1984, Frei ve Würzler 1996). Bu test mutasyonel olayların çeşitlerini belirleyip genotoksisite taraması için primer önemli bir bileşiğin rekombinojenik aktivitesinin etkisiyle oluşan mitotik rekombinasyonun saptanmasına da olanak sağlar (Graf ve Würzler 1996).

Kimyasalların mutajenik ve rekombinojenik aktivitelerinin belirleyebilen bu test sisteminde multiple wing hair (mwh) ve flare (flr) mutasyonları için transheterozigot *D. melanogaster* larvaları kullanılmaktadır (Graf ve ark. 1984). Esas olarak bu test, transheterozigot larvalarda delesyon, nokta mutasyon, ayrılmama ve rekombinasyon ile kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan genetik değişimlerin fenotipte gözlenmesi esasına dayanır (Graf ve ark. 1984, 1989). Bu tür genetik değişimlerin fenotipte gözlenebilmesi için *D. melanogaster*'de kanat trikomlarının fenotipini belirleyen mwh ve flr genleri belirleyici gen olarak kullanılmıştır. *D. melanogaster*'in kanatlarındaki somatik mutasyon ve rekombinasyonun saptanabilmesi şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinin şematik olarak gösterimi



### 3.1. Kullanılan Drosophila Hatlarının Genetik Yapısı

Bu çalışmada kullanılan normal metabolik aktiviteye sahip hatlar Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümünden getirilip bölümümüzde standart besin ortamında, Drosophila için ideal yaşama koşulları olan 25 °C'de %60 bağıl nem ortamının sağlandığı iklimlendirme ortamında kültüre alındı.

Somatik mutasyon ve rekombinasyonları belirlemek için bu hatların üçüncü kromozomları üzerinde bulunan iki belirleyici gen kullanıldı. Bireylerin genetik yapısı şu şekildedir;

- mwh / mwh
- flr3 / In (3LR) TM3, ri p<sup>p</sup> sep bx<sup>34e</sup> e<sup>s</sup> Bd<sup>s</sup> bu kısaca
- flr3 / TM3, Bd<sup>s</sup> olarak gösterilmektedir.

Belirleyici genlerden biri olan flare geni, sineklerin kanatlarındaki normal, düz ve uzun kıllar yerine, kısalmış nokta şeklinde, koyu renkli balon şeklinde veya kalın ve düzgün olmayan bir şekilde olmak üzere çok çeşitlilik göstermektedir (Würgler ve Vogel 1986)

Belirleyici flare 3 (flr<sub>3</sub>, 3-38,8) geni homozigot halde iken embriyonik evrede letal etki göstermektedir (Graf ve ark. 1996, Graf ve ark. 1998). Bireyleri flare geninin embriyonik letal etkisinden korumak ve de rekombinasyonu baskılamak için dengeleyici TM3 kromozomu kullanılmaktadır. Sonuçların güvenilirliği için gerçek mutant klonların olası varyasyonlarından ayrılması gerekmektedir. Bu nedenle, daha önce yapılmış olan çalışmalarda flare klonlar için dörtten daha az sayıda gözlenen sadece flare fenotipteki trikomların oluşturduğu klonlar varyasyon nedeniyle ortaya çıktığından, flare fenotipteki klonlar için dörtten daha fazla sayıdaki hücrelerin sayıma dahil edilmesi esasına uyulması tavsiye edilmektedir. Bu çalışmada da sayımlar bu tavsiye dikkate alınarak yapılmıştır.

Belirleyici genlerimizin diğeri ise mwh'tır ( mwh, 3-0,3), mwh geni, normal tek trikomların yerine kıllarının aynı hücreden üç veya daha fazla çıkması şeklinde kendini ifade etmektedir (Würgler ve Vogel 1986, Graf ve ark. 1996).

Birbirine komşu iki mutant klonun sayımında, eğer iki klon arasında üç ya da daha fazla sayıda yaban tip trikoma sahip hücre sırası varsa iki farklı klon olarak

değerlendirilmişlerdir. Bu çalışmada Graf ve arkadaşlarının 1984'de uyguladığı değerlendirme şekli göz önüne alınarak klon kayıtları tutulmuştur.

Dominant gen olan  $Bd^S$  (beaded-serrat) homozigot halde letal etki göstermektedir normal kanatlardaki kanatlar düzgün bir şekilde iken  $Bd^S$  genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün değildir (Graf ve ark. 1996). Normal ve serrat kanat yapıları Şekil 3.2'de verilmiştir.  $Bd^S$  geni TM3 dengeleyici kromozomunun üzerinde yer aldığı için TM3 dengeleyici kromozoma sahip bireyler kanat fenotiplerinin incelenmesiyle diğer (dengeleyici kromozom taşımayan) bireylerden kolaylıkla ayrılabilir.

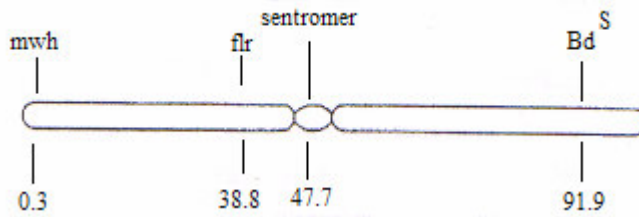


Şekil 3.2. Dengeleyici kromozomu taşımayan normal ve dengeleyici kromozomu taşıyan  $Bd^S$  bireylerinin kanat fenotipleri

Dengeleyici kromozom, letal etkisinden kurtulmak istenen genin bulunduğu homolog kromozomlardan birinde bulunmaktadır. Dengeleyici kromozomlar sayesinde homozigot olduğunda embriyonik evrede letal etki gösteren genlerin bu öldürücü etkisinden o hattı korumak mümkündür. Bu kromozomların rekombinasyonu baskılaması nedeniyle mutasyon veya rekombinasyon ile oluşan fenotipik değişimlerin hangi oranda rekombinasyonun etkisiyle olduğu belirlenebilmektedir. Bu kromozomların rekombinasyonu baskılama özelliklerinden yararlanırken amaca uygun dengeleyici kromozomun seçilmesi sonuçlar bakımından önemlidir. Yirmiden fazla dengeleyici kromozom bulunmaktadır. Bunların bazıları belli bir kromozom üzerindeki rekombinasyonları baskılamakta bazıları da bütün kromozomlardaki rekombinasyonları baskılamaktadır (Lindsley ve Zimm 1992). Bu çalışmada kullanılan genetik hatların

taşıdığı dengeleyici kromozom (TM3) çalışılan kromozom olan üçüncü kromozom üzerindeki rekombinasyonları baskılamaktadır.

Çalışmada belirleyici olarak kullanılan *mwh*, *flr* ve *Bd<sup>S</sup>* genleri *Drosophila*'nın en büyük kromozomu olan üçüncü kromozom üzerinde bulunduğundan (Şekil 3.3) belirleyici genler arasındaki mesafenin uzak olması rekombinasyon ve mutasyonların büyük aralıkta incelenmesi açısından avantaj sağlamaktadır.



Şekil 3.3. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri

### 3.2. *Drosophila* Hatlarının Kültürü

Standart besin içeriği 510 ml distile su için aşağıdaki gibidir;

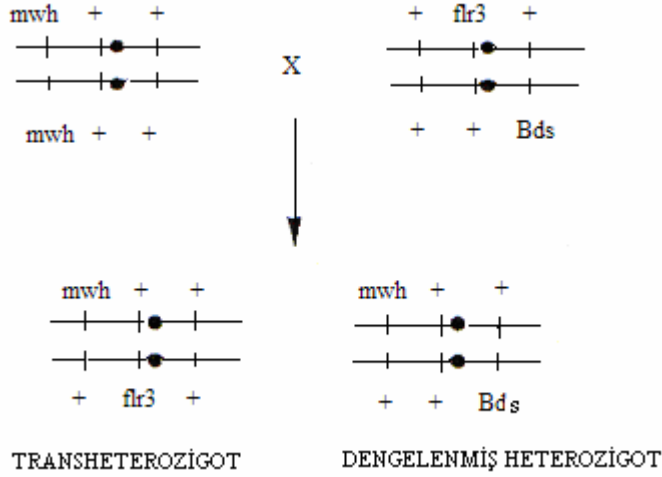
Mısır unu	52 g
Şeker	47 g
Maya	9.5 g
Agar	3 g
Asit karışımı	3 ml
Distile su	510 ml

Besin ortamında kullanılan asit karışımında propiyonik asit, ortofosforik asit ve distile su bulunmaktadır. Bu asit karışımı besinin kontaminasyonunu engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu karışım kullanılmadığı takdirde besin ortamı fungus ile kontamine olduğunda bireylerin gelişimi olumsuz yönde etkilenmekte ve yumurta verimi düşmektedir.

Besin ortamının hazırlanması için verilen ölçülerdeki distile su, agar, şeker ve mısır unu ateş üzerinde karıştırılarak kaynatılır. 1-2 dakika kaynaması sağlandıktan sonra maya ve asit karışımı eklenerek mamamın her yerine dağılması için karıştırıldı. Hazırlanan standart Drosophila besini daha önceden otoklavda steril edilen şişelere 2 cm kalınlığında düzgünce döküldü. Şişelerin ağızları kurutma kağıdı ile kapatılarak iki gün süreyle kurumaya bırakıldı. Yeterince kurumuş olan besin ortamına, döllenmemiş dişi birey toplayabilmek için Drosophila'lar aktararak kültür zenginleştirildi. Kültürler, 25 °C de %60 bağıl nem ortamında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olan ortamda yetiştirildi.

### **3.3. Çaprazlama İçin Birey Seçimi**

Uygulamanın yapılacağı transheterozigot larvaları elde etmek için, dişi flare ve erkek mwh bireylerden çaprazlama yapıldı. Dişilerin döllenmesi için bilinen bir genotipten spermlerin kullanılması Drosophila metodunda esastır. Bakire dişi bireylerin toplanabilmesi için, flare hattının bulunduğu kültür ortamındaki ergin bireyler ortamdan uzaklaştırıldı. Hiç ergin bireyin bırakılmadığı flare şişesinden 8 saat içerisinde çıkan bireylerin dişileri toplandı. Yeterince birey toplandıktan sonra transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için her şişede 40 dişi flare ve 40 erkek mwh birey olacak şekilde çaprazlamalar yapıldı (Şekil 3.4). Döllenmenin ve embriyogenezin gerçekleşebilmesi için bireyler iki gün süre ile çaprazlama şişesinde bırakıldı. Uygulama yapılacak olan larvaların tamamının aynı evrede olabilmesi için döllenme ve embriyogenezi gerçekleştirmiş olan bireyler yeni bir besin ortamına alınarak 8 saat süreyle burada bırakılarak yumurta bırakmaları sağlandı. Çaprazlama şişesine eksilen bireylerin yerine yeni mwh erkekler ve bakire flareler dişiler belli zaman aralıklarında eklenerek ortam zenginleştirildi (Graf ve ark. 1984).



Şekil 3.4. Dengelenmiş heterozigot  $mwh/Bd^S$  ve transheterozigot  $mwh/flr3$  bireylerin elde edilebilmesi için  $mwh/mwh$  ve  $flr^3/TM3, Bd^S$  bireyleri arasındaki çaprazlamalar.

### 3.4. İlaç Dozlarının Belirlenmesi

#### 3.4.1. Pozitif Kontrol

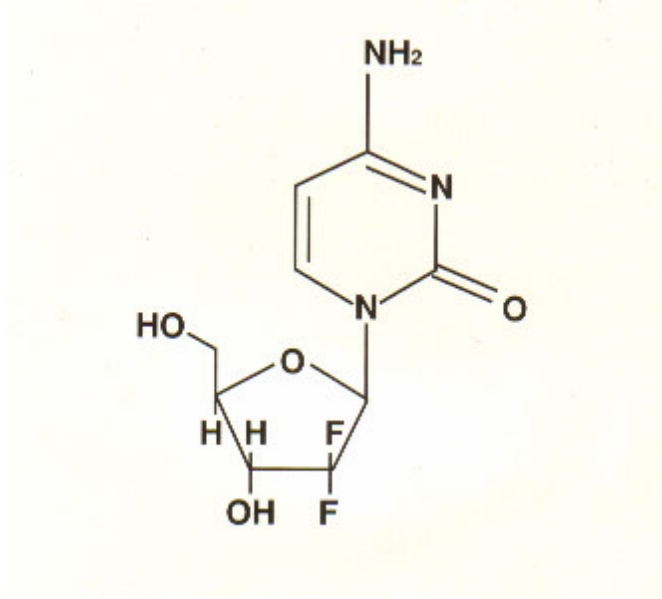
Pozitif kontrol için 20 ve 25  $\mu\text{g/ml}$ 'lik etil metan sülfonat (EMS) dozları, SMART testinde transheterozigot larvaların kültür ortamlarına verildi. EMS nin Chemical Abstract Service (CAS) numarası 62-50-0. EMS'nin 20 ve 25  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozları larvalar üzerinde toksik etkili olduğundan canlı birey elde edilemedi. 1 ve 2  $\mu\text{g/ml}$  EMS dozları denenerek 1  $\mu\text{g/ml}$  uygun doz olarak seçildi ve çalışıldı.

#### 3.4.2. Gemcitabine (Gemzar)

Gemcitabine, Gemzar isimli ilacın etken maddesidir. İlaç Lilly ilaç firması tarafından üretilmektedir. Gemcitabine'in kimyasal formülü aşağıda verilmiştir (Şekil 3.5). Gemcitabine'in CAS numarası 103882-84-42' dir.

Gemcitabine bileşiğinin doz belirleme denemeleri sırasında 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16 ve 32  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlar denendi. 0.5 ve 1  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlar düşük mutasyon frekansı nedeniyle çalışılmadı. 12, 16 ve 32  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlar larvalar üzerinde toksik etkili

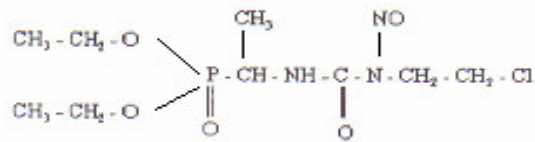
olduğundan canlı birey elde edilemedi. 2, 4 ve 8 µg/ml'lik Gemcitabine dozları çalışma dozları olarak belirlendi ve çalışıldı.



Şekil 3.5. Gemcitabine bileşiğinin kimyasal formülü

### 3.4.3. Fotemustin (Muphoran)

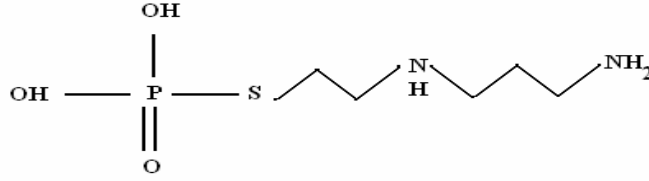
Muphoran adlı ilacın etken maddesi Fotemustine'dir. CAS No: 92118-27-9. Servier ilaç firması tarafından üretilmektedir. Kimyasal formülü aşağıda verilen (Şekil 3.6) Fotemustine bileşiğinin doz denemelerinde 2, 4 ve 8 µg/ml'lik dozlar denendi. Uygun mutasyon frekansının gözlenmesiyle bu dozlar çalışılmaya devam edildi.



Şekil 3.6. Fotemustine bileşiğinin kimyasal formülü

### 3.4.4. Amifostine (Ethyol)

Etken maddesi Amifostine olan Ethyol, MedImmune Pharma tarafından üretilmektedir. CAS No: 20537-88-6. Amifostine'in 1- 2 ve 4 µg/ml'lik dozları denendi ve çalışıldı. Amifostine'in kimyasal formülü aşağıda verilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Amifostine bileşiğinin kimyasal yapısı

### 3.4.5. Gemcitabine ve Fotemustine'in Amifostine ile Kombine Uygulamaları

Amifostine'in hücre koruyucu etkisinin gözlenmesi amacıyla 1 µg/ml Amifostine + 8 µg/ml Gemcitabine ve 1 µg/ml Amifostine + 8 µg/ml'lik Fotemustine kombine uygulamaları çalışıldı.

### 3.5. İlaçların Uygulanması

Yukarıda etken maddeleri verilen 3 ilacın bu çalışmada her birinin 3 dozu çalışıldı. mwh/flr<sup>3</sup> çaprazlamalarından elde edilen ve 8 saat süresince biriktirilen larvalar üçüncü larva evrelerine ulaştıklarında buldukları kültür ortamından su ile yıkanarak ayrıldılar. İnce gözenekli elekten geçirilerek larvalar besin artıklarından ayrıldılar. Uygulama ortamı olarak kullanılan cam tüpler içerisine 4.5g hazır Drosophila besini (Drosophila Instant Medium Carolina Biological Supply Formula 4- 24) konuldu. Cam tüp içerisindeki besinler uygulamadan hemen önce hazırlanmış olan

kimyasal çözeltinin 9 ml'si ile ıslatılarak hazırlandı.  $72 \pm 4$  saatlik, elekten geçirilmiş larvalardan mikrospatül ile 1- 2 spatül dolusu larva uygulama ortamına bırakıldı. Tüplerin ağızları sıkıca pamuklarla kapatıldı. Uygulamanın üçüncü larva evresinde yapılmasının nedeni; daha önce Graf (1995) tarafından yapılan çalışmada *Drosophila* kanat SMART için uygulama yapılacak en uygun zaman olarak belirlenmiş olmasıdır.

Çalışılan her bir derişim için hem *mwh/flr<sup>3</sup>* hem de *mwh/TM3* bireylerden 80 kanat (40 birey) tesadüfi olarak seçilerek kanat preparatları hazırlandı. Her bir derişim için 80 kanadın istatistiksel değerlendirmeler için yeterli olduğu Frei ve Würbler (1995) tarafından belirlenmiştir.

### **3.6. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması**

Uygulama ortamında antineoplastik ilaçlara maruz bırakılan larvaların pupa evresini takiben çıkan ergin bireyler günlük olarak, eterle bayıltılarak toplandı ve kanat preparatlarını hazırlamak için yeterli birey elde edilene kadar toplanan bireyler %70'lik etil alkol de (+) 4 derecede buzdolabında saklandı. Alkolde saklanan bireyler distile su bulunan bir petriye alındı. Bireyler kanat morfolojilerine göre normal kanatlı (*transheterozigot mwh/flr<sup>3</sup>*) ve serrat kanatlı (dengelemiş heterozigot *mwh/TM3*) bireyler olarak iki gruba ayrıldı. Bu kanatlardan normal fenotipe sahip (*mwh/flr<sup>3</sup>*) kanatlar hem mutasyon hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonları içermesine karşın düzgün olmayan kenarlı (*mwh/TM3*, *Bd<sup>S</sup>*) kanatlar dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan klonları içermektedir. Bu sebeple bu iki fenotipteki kanatların preparatları ayrı ayrı hazırlanarak değerlendirildi.

Kanat preparatlarının hazırlanmasında kullanılan Faure solüsyonu Graf ve ark. 1984 ile Würbler ve Vogel'in 1986 çalışmasındaki tarife göre hazırlandı. Faure solüsyonun içeriği aşağıdaki gibidir:

Gum arabik	30 g
Gliserol	20 ml
Kloral hidrat	50 g
Distile su	50 ml



Kanat preparatları hazırlanırken çukur lam üzerine faure solüsyonundan bir iki damla konuldu. (+) 4 derecede % 70 etanol içerisinde bekletilen ancak daha önce kanat morfolojilerine göre ayrılmış olan sinekler distile su bulunan petriye alındılar. Kanat preparatı yapılmak için alınan distile sudaki her bir sinek vücudundaki fazla su kurutma kağıdına emdirilerek faure solüsyonu damlatılmış çukur lama konuldu. Sterio mikroskop altında ince uçlu pens ile kanatlar vücuttan dikkatlice ayrıldı. Kanatların vücuttan ayrılması işleminde, kanatlar vücuda bağlandığı yerden tutularak kanat üzerindeki kıllara ve kanat bütünlüğüne zarar vermeden ayrıldı. Kopartma işleminde kanat üzerindeki kılların zarar görmesi halinde bu kanatlar kullanılmadı. Her bir bireyin kanadı ayrıldıktan sonra aynı bireye ait kanatlar lam üzerine uygun aralıklarla yerleştirildi. Lam üzerine yeterince kanat çifti yerleştirildikten sonra preparatlar kuruması için tozsuz bir ortamda bir gün bekletildi. Preparatlar kuruduktan sonra lamalara bir iki damla faure solüsyonu damlatılarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri lamel (24 x 60 mm) ile kapatıldı. Kanatların düzgün bir şekilde kuruması için kapatılan preparatların üzerine 30- 40 g ağırlığında metal bloklar kondu. Preparatlar bu şekilde üç gün kıpırdatmadan bekletildi. Üç gün sonra preparatların üzerinden metal ağırlıklar alınarak lam ve lamel arasından taşmış olan faure solüsyonu distile su ve kurutma kağıdı yardımıyla silinerek temizlendi. Preparatlar ışık mikroskopunda sayım işlemi için hazır hale getirildi (Graf ve ark.1984).

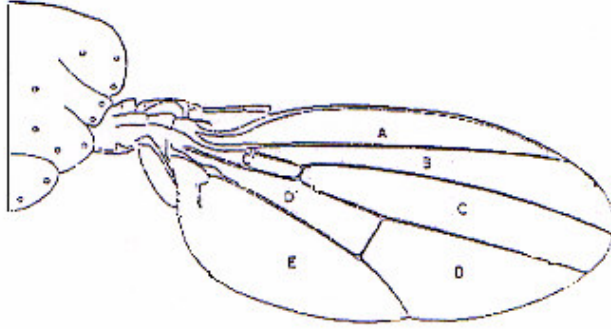
### **3.7. Kanat Preparatlarının Mikroskop Analizi**

Hazırlanmış olan kanat preparatları 10 X 40 büyütmede ışık mikroskopunda incelendi. Kanatların incelenmesinde kolaylık olması açısından kanat üzerindeki sektörler Şekil 3.8'deki gibi A, B, C, C<sup>1</sup>, D, D<sup>1</sup>, E olarak bölümlere ayrıldı.

Kanatlar incelenirken dorsal ve ventral yüzdeki hücre tabakalarının her ikisi de mikrovida yardımıyla mutant klonların olup olmadığı incelendi. Kanat yüzeyindeki her bir sektör ayrı ayrı taranarak mwh ve/veya flr mutant fenotipler sayılarak kayıtları tutuldu. Sayımda kayıtları tutulan mutant klonlar:

- Küçük tek tip klon ( 1-2 mwh hücre)
- Büyük tek tip klon ( $\geq 3$  mwh veya flr hücre)

- İkiz klon (mwh ve flr hücrelerin ikisini de yan yana aynı klonda içeren klonlar)



Şekil 3.8. Kanat sektörlerinin şematik görünümü

Bu sınıflandırmanın biyolojik açıdan anlamlı olduğu Graf ve arkadaşları (1984) tarafından gösterilmiştir. Sınıflandırmada küçük tek tip klonlar yalnızca mwh hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 3.9). Çünkü varyasyonla oluşan ve flare gibi görünen hücreleri mutantlardan ayırmak için 4'den daha az sayıdaki flare hücreler bu sayıma dahil edilmedi (Graf ve ark. 1984). Bu nedenle küçük tek tip klonlar sadece mwh klonları içermektedir. Büyük tek tip klonlar Şekil 3.10'da görüldüğü gibi 3 veya daha fazla mwh ya da flare mutant hücrenin oluşturduğu klonlardır.

İkiz klonlar, mwh ve flare hücreler aynı klon içerisinde dağılmış olarak bulunduğu durumda oluşan klonlardır (Şekil 3.11). İkiz klon, mwh ve flare hücrelerin yan yana iki ayrı klon olarak bulunmasıyla da oluşabilir. Ancak yan yana bulunan mwh ve flare klonların arasındaki yabancı tip trikomların sayısı üçü geçmiyorsa aynı klon içerisinde değerlendirilerek ikiz klon denebilir.

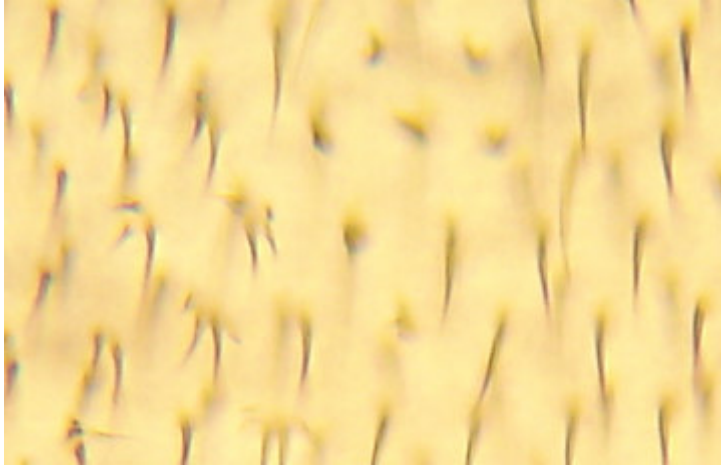
mwh klonların oluşması nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama, ve rekombinasyon sonucu olmaktadır. Flare klonlar ve ikiz klonlar ise flare geni ile sentromer arasında gerçekleşen rekombinasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Normal kanatlı bireylerde görülebilecek değişik genetik olayların şematik gösterimi Şekil 3.12'de verilmiştir.



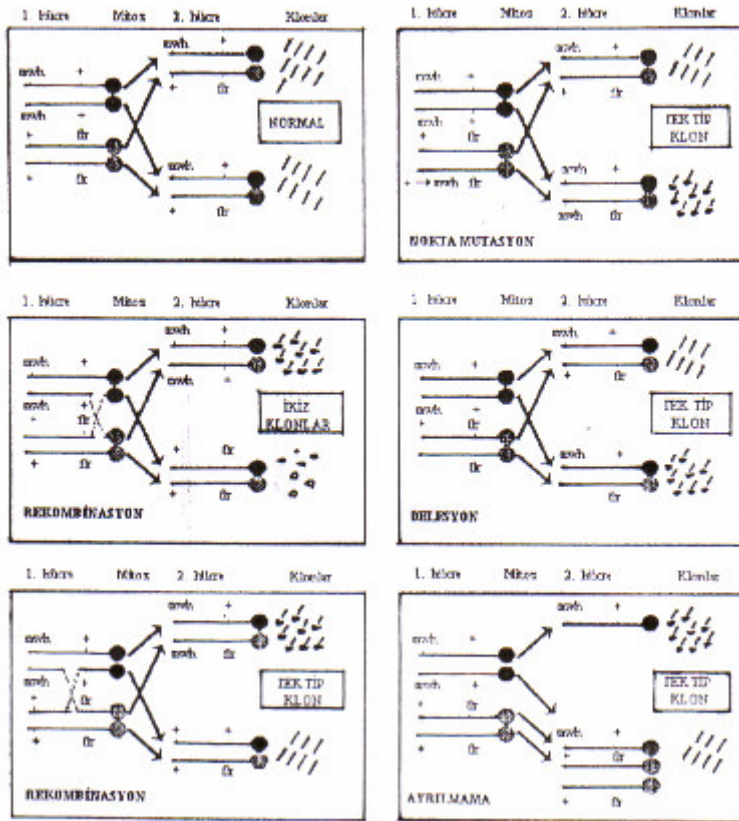
Şekil 3.9. Küçük tek tip mwh mutant klonların mikroskoptaki görünümü



Şekil 3.10. Büyük tek tip mwh mutant klonların mikroskoptaki görünümü



Şekil 3.11. İkiz mutant klonların mikroskoptaki görünümü



Şekil 3.12. *mwh/flr3* genotipli bireylerde görülebilecek değişik olay ve sonuçlar

### 3. 8. Klon İndüksiyon Frekansı ve Rekombinasyon Miktarının Hesaplanması

Kronik uygulamada her hücrede ve her hücre bölünmesindeki indüksiyon frekansı aşağıdaki eşitlikle hesaplanmaktadır (Szabad ve ark. 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^{-5}$$

Bu denkleme göre sadece mwh klonları göz önüne aldığımızda denklemdaki “f” mwh klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “n” gözlenmiş olan toplam mwh klon sayısını, “N” analiz edilmiş olan kanat sayısını ve “C” bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Bir kanat üzerinde incelenebilecek hücre sayısının önceki çalışmalarla 24.400 olduğu bilinmektedir (Würgler ve Vogel 1986).

Yapılan çaprazlamalar sonucunda oluşan transheterozigot larvalardan gelişen bireyler kanat bakımından normal ve serrat kanat kenarlı olmak üzere iki farklı fenotipe gözlenmektedir. Serrat kenarlı kanatlara sahip bireylerde bulunan dengeleyici kromozomun varlığı, bu kromozom parçası üzerine yerleştirilmiş dominant mutant bir gen olan Serrate (Ser) sayesinde tespit edilebilmektedir. Dengeleyici kromozomun (TM3) rekombinasyonu baskılaması nedeniyle bu fenotipe sahip bireylerde gözlenen mutant klonlar sadece mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Böylece serrat kenarlı bireylerden elde edilen verilerle normal kenarlı kanatlardan elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla çalışmada kullanılan ajanın mutajenik ve/veya rekombinojenik etkileri ayrı ayrı tespit edilebilmektedir (Vogel 1992, Frei ve Würgler 1996).

Normal ile serrat kanatlardan elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla gerçekleşen rekombinasyon yüzdesi şu şekilde hesaplanmaktadır.

$$\% \text{ rekombinasyon} = \frac{a-b}{b} \times 100$$

Formülde;

a: normal fenotipteki kanatlarda gözlenen mwh sektörlerinin frekansı

b: serrat fenotipteki kanatlarda gözlenen mwh sektörlerinin frekansı

### 3. 9 Verilerin Değerlendirilmesi

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilirken orijinal (null) hipotez ( $H_0$ )’de uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayıldı. Alternatif hipotez ( $H_a$ ) de ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan  $m$  defa daha fazla olduğu varsayıldı. Orijinal ve alternatif hipotezlerin Binomial Şartlı Test kullanılarak hesaplanmasıyla sonuçlar; pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) ve negatif (-) olarak gösterildi (Frei ve Würger 1988).

Çizelge 3.1. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		$H_A$	
		KABUL ( $1-\beta$ )	RED ( $\beta$ )
$H_0$	KABUL ( $1-\alpha$ )	<b>ÖNEMSİZ FARK</b> $P=(1-\alpha)(1-\beta)=1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	<b>NEGATİF</b> $P=(1-\alpha)\beta=\beta-\alpha\beta$
	RED ( $\alpha$ )	<b>POZİTİF</b> $P=\alpha(1-\beta)=\alpha-\alpha\beta$	<b>ZAYIF POZİTİF</b> $P=\alpha\beta$

Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesine karar verilirken Kastenbaum ve Bowman (1970) çizelgesinde yararlanıldı. Hipotezlerin kurulması sırasında yapılan hesaplamalarda kullanılan parametreler aşağıda verilmiştir.

$N_C$ = Kontrol grubunda incelenen kanat sayısı

$N_t$ = Uygulama grubunda incelenen kanat sayısı

$n_c$ = Kontrol grubunda gözlenen mutant klon sayısı

$n_t$ = uygulama grubunda gözlenen mutant klon sayısı

$n = n_t + n_c$ = toplam mutant klonların sayısı

$P_o$ = Kontrol grubunda beklenen mutant klon frekansı, orijinal hipotez ( $H_o$ ) için

$$P_o = N_c / (N_c + N_t)$$

$q_o$ = uygulama grubunda beklenen mutant klon frekansı, Orijinal hipotez ( $H_o$ ) için

$$q_o = N_t / (N_c + N_t)$$

$P_A$ = Kontrol grubunda beklenen mutant klon frekansı, Alternatif hipotez ( $H_a$ ) için

$$P_A = N_c / (N_c + mN_t)$$

$q_A$ = uygulama grubunda beklenen mutant klon frekansı, Alternatif hipotez ( $H_a$ ) için

$$q_A = mN_c + mN_t$$

$P_{o_n}$ = Kontrol grubunda beklenen mutant klon sayısı, Orijinal hipotez ( $H_o$ ) için

$q_{o_n}$ = Uygulama grubunda beklenen mutant klon sayısı, Orijinal hipotez ( $H_o$ ) için

$P_{A_n}$ = Kontrol grubunda beklenen mutant klon sayısı, Alternatif hipotez ( $H_a$ ) için

$q_{A_n}$ = Uygulama grubunda beklenen mutant klon sayısı, Alternatif hipotez ( $H_a$ ) için

$M$ = Çarpım sabiti

Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için hazırlanmış olan bilgisayar programı Microsta ile öncelikle yukarıda verilen parametreler hesaplandı. Hesaplama sonucunda eğer uygulama grubundaki ( $n_t$ ) mutant klon sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse  $H_o$  red edildi. Aynı şekilde kontrol grubundaki ( $n_c$ ) mutant klon sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse ( $H_a$ ) red edildi.

$H_o$  ve  $H_a$ 'nın kabul veya red edilmesine göre Çizelge 3.1 kullanılarak sonuçlar pozitif (+), zayıf pozitif (+), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

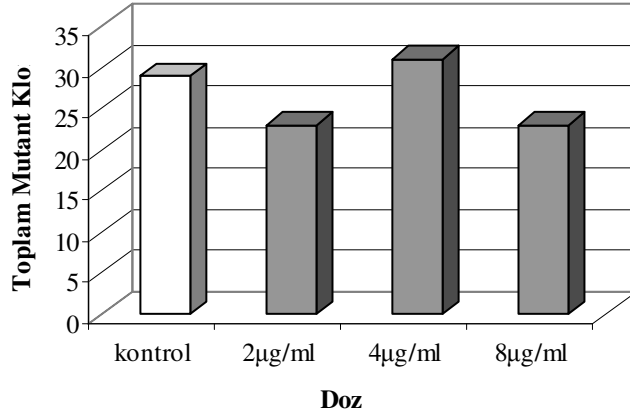
Bu çalışmada antineoplastik ilaç olan Gemcitabine ve Fotemustine ile kanser tedavisi esnasında normal hücreleri koruyucu etkisi olan Amifostine'in *Drosophila* kanat SMART ile genotoksikolojik etkileri araştırılmıştır. Etkileri araştırılan ajanlardan elde edilen sonuçların tümü çizelgelerde verilmiştir. Genotoksik etkileri değerlendirilen ilaçların denenen her bir derişimi için dengeleyici kromozom (TM3) taşıyan serrat kanatlı bireylerden ve dengeleyici kromozom taşımayan normal kanatlı bireylerden 80 kanat preparatı hazırlanarak incelemeleri yapılmıştır.

### 4.1. Gemcitabine (Gemzar)

Etken maddesi Gemcitabine olan antineoplastik ilaç bir nükleosid analogudur. Distile suda çözülerek farklı dozlarda hazırlanan ilaç larvaların beslenmesinde kullanılan Instant Medium'a emdirilmiş ve uygulama için en uygun evre olan üçüncü larva evresindeki (72 saat) larvalar kronik uygulamaya bırakılmıştır. Gemcitabine'in 12, 16 ve 32 µg/ml'lik dozları *Drosophila* larvaları üzerinde aşırı toksik etki gösterdiğinden canlı birey elde edilemedi. Bu nedenle en yüksek olarak doz denemesinde belirlenen 8 µg/ml dozu çalışıldı. Gemcitabine'in diğer çalışma dozları 2 ve 4 µg/ml'dir. Gemcitabine mwh/flr<sup>3</sup> genotipinde çalışılan üç derişimde küçük tek tip klonlar açısından doz artışına bağlı olarak kontrole göre artış göstermemiştir. Sonuç kontrole göre negatif etkili olmaktadır. Büyük tek tip ve ikiz klon oluşumunda kontrole göre artış gözlenmiştir ancak istatistiksel açıdan önemsiz fark oluşturmaktadır. mwh/TM3 genotipli bireylerde ise Gemcitabine'in artan dozlarına bağlı olarak küçük tek tip klonlarda ve toplam klon sayılarında azalma göze çarpmaktadır. Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan sonuç negatif olmuştur. Bu genotipte büyük tek tip klon oluşumunda doz artışıyla birlikte kontrole göre artış olmuştur ancak istatistiki sonucu kontrole göre Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi önemsiz fark ve negatif etkili olmuştur. Sonuçlara genel olarak bakıldığında Gemcitabine dozlarının her iki genotipte de pozitif etkisi görülmemektedir. Gemcitabine dozlarının normal ve serrat kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayı grafiği Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de görülmektedir.

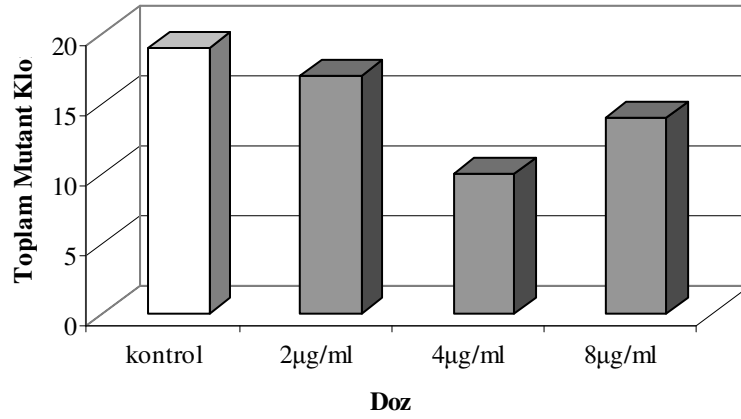


### GEMCITABINE



Şekil 4.1. Gemcitabine dozlarının normal kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı

### GEMCITABINE



Şekil 4.2. Gemcitabine dozlarının serrat kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı

Çizelge 4.1: Gemcitabine'in *D. melanogaster* hatlarında etkileri

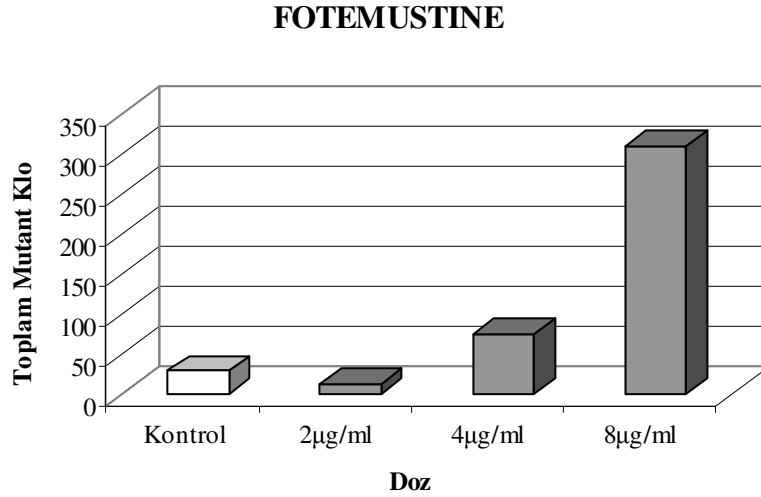
Derişimler	kanat sayısı (N)	küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (>2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			klon indüksiyon frekansı (10 <sup>5</sup> hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
		Normal Kanat															
Distile su	80	28	(0,35)		1	(0,01)		0	(0,00)		29	(0,36)		29	(0,36)		1,48
1mM EMS	40	40	(1,00)	i	48	(1,20)	+	8	(0,20)	+	77	(1,93)	+	85	(2,13)	+	8,7
2µg/ml	80	18	(0,23)	z	3	(0,04)	i	2	(0,03)	i	20	(0,25)	-	23	(0,29)	-	1,17
4µg/ml	80	24	(0,30)	-	6	(0,08)	i	1	(0,01)	i	30	(0,38)	-	31	(0,39)	-	1,58
8µg/ml	80	15	(0,19)	-	5	(0,06)	i	3	(0,04)	i	19	(0,24)	-	23	(0,29)	-	1,17
Serrat Kana																	
Distile su	80	19	(0,24)		0	(0,00)		0	(0,00)		19	(0,24)		19	(0,24)		0,97
1mM EMS	40	12	(0,30)	-	5	(0,13)	+	0	(0,00)		17	(0,43)	-	17	(0,43)	-	1,74
2µg/ml	80	16	(0,20)	-	1	(0,01)	i	0	(0,00)		17	(0,21)	-	17	(0,21)	-	0,87
4µg/ml	80	9	(0,11)	-	1	(0,01)	-	0	(0,00)		10	(0,13)	-	10	(0,13)	-	0,51
8µg/ml	80	12	(0,15)	-	2	(0,03)	i	0	(0,00)		14	(0,18)	-	14	(0,18)	-	0,71

Fr., frekans D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0,05

z: zayıf pozitif

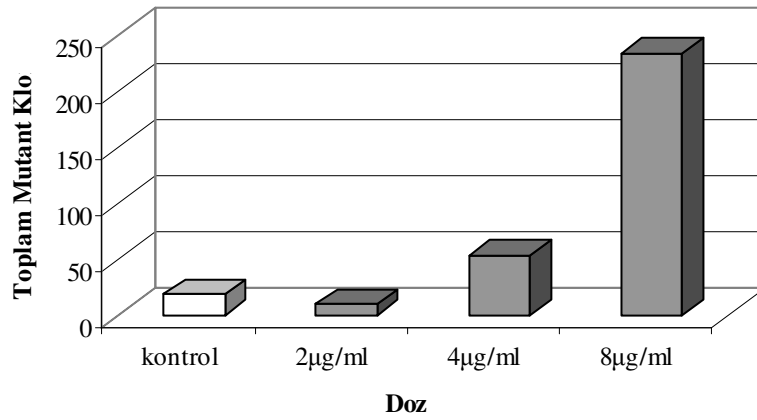
## 4.2. Fotemustine

Genotoksikolojik etkileri çalışılan diğer ikinci ilaç Fotemustine'dir. Fotemustine'in 2, 4 ve 8 µg/ml dozları çalışılmıştır. mwh/flr<sup>3</sup> genotipinde en düşük doz hariç 4 ve 8 µg/ml'lik dozlarda kontrole göre küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon, toplam mwh ve toplam klonlarda doz artışına bağlı artış görülmektedir (Çizelge 4.2). Bu artan mutant klon sayısı kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan sonuçlar pozitif bulunmuştur. Klon indüklemeye frekanslarındaki artışlar da Çizelge 4.2'de görülmektedir. Dengeleyici kromozoma sahip mwh/TM3 genotipindeki bireylerde en düşük doz 2 µg/ml'lik dozda kontrole göre mutant klon sayısında düşüş söz konusudur ve sonuç istatistik açıdan negatif olmuştur. İkiz klona bu genotipte Fotemustine'in uygulanan hiçbir dozunda rastlanmamıştır. 4 ve 8 µg/ml'lik dozlar da kontrole göre küçük tek tip, büyük tek tip, toplam mwh ve toplam klonlarda artış görülmektedir ve de sonuç kontrole göre pozitif etkili olmuştur. Bu pozitif etkinin klon indüklemeye frekanslarına yansımaları Çizelge 4.2'de verilmektedir.



Şekil 4.3. Fotemustine dozlarının normal kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı

## FOTEMUSTINE



Şekil 4.4. Fotemustine dozlarının serrat kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı

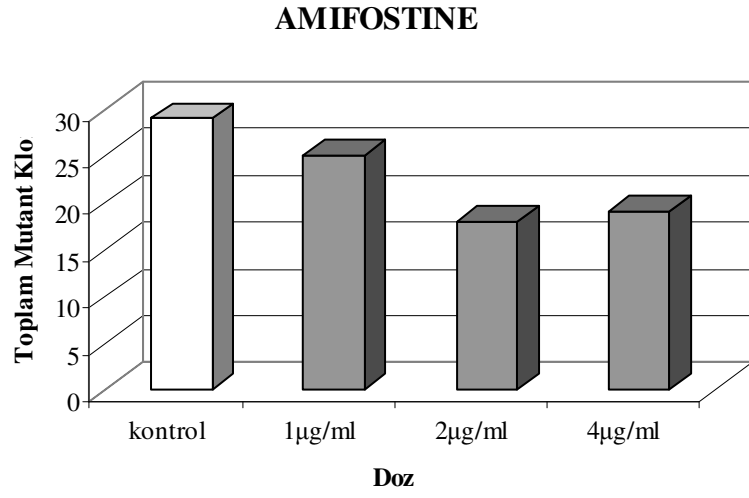
### 4.3. Amifostine

Kanser tedavisinde normal hücreleri koruyucu etkisi olan Amifostine'in 1, 2 ve 4 µg/ml'lik dozları çalışılmıştır. Çalışılan dozların hiçbirinde hem mwh/flr<sup>3</sup> hem de mwh/TM3 genotipinde ikiz klon oluşumu görülmemiştir. Amifostine'in artan dozuna bağlı olarak küçük tek tip, büyük tek tip, toplam mwh ve toplam klonlarda az da olsa bir azalma Çizelge 4.3'te görülmekte, ancak istatistiksel anlamda negatif etki göstermektedir. Bunun yanında 2 ve 4 µg/ml'lik doz uygulamalarından elde edilen bireylerde büyük tek tip klonlarda az da olsa bir artış olmasına rağmen sonuç önemsiz olarak belirlenmiştir. mwh/TM3 genotipinde 1 µg/ml'lik doz da küçük tek tip klon, toplam mwh ve toplam klonlarda azalma görülmekte, sonuç kontrole göre negatif etkili olmaktadır. Amifostine'in çalışılan dozlarının normal ve serrat kanatlarda oluşturdukları toplam mutant klon sayılarını gösteren grafik Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmektedir.

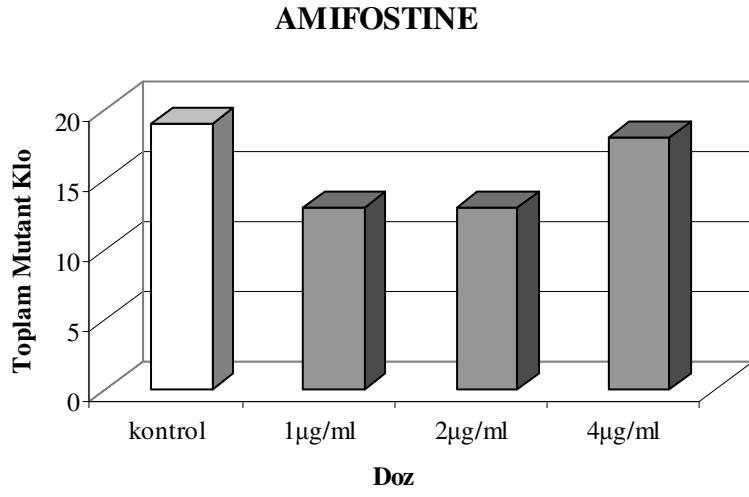
Çizelge 4.2: Fotemustine'in *D. melanogaster* hatlarında etkileri

Derişimler	kanat sayısı (N)	küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (>2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			Klon indüksiyon Frekansı (10 <sup>5</sup> hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
		Normal Kanat															
Distile su	80	28	(0,35)		1	(0,01)		0	(0,00)		29	(0,36)		29	(0,36)		1,48
1mM EMS	40	40	(1,00)	i	48	(1,20)	+	8	(0,2)	+	77	(1,93)	+	85	(2,13)	+	8,7
2µg/ml	80	7	(0,09)	-	5	(0,06)	i	1	(0,01)	i	12	(0,15)	-	13	(0,16)	-	0,66
4µg/ml	80	48	(0,60)	+	22	(0,28)	+	6	(0,08)	+	70	(0,88)	+	76	(0,95)	+	3,89
8µg/ml	80	209	(2,61)	+	77	(0,96)	+	24	(0,30)	+	283	(3,54)	+	310	(3,88)	+	15,88
Serrat Kanat																	
Distile su	80	19	(0,24)		0	(0,00)		0	(0,00)		19	(0,24)		19	(0,24)		0,97
1mM EMS	40	12	(0,30)	-	5	(0,13)	+	0	(0,00)		17	(0,43)	-	17	(0,43)	-	1,74
2µg/ml	80	8	(0,10)	-	2	(0,03)	i	0	(0,00)		10	(0,13)	-	10	(0,13)	-	0,51
4µg/ml	80	51	(0,64)	+	3	(0,04)	i	0	(0,00)		54	(0,68)	+	54	(0,68)	+	2,76
8µg/ml	80	211	(2,64)	+	23	(0,29)	+	0	(0,00)		234	(2,93)	+	234	(2,93)	+	12

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; z, zayıf pozitif; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0,05



Şekil 4.5. Amifostine dozlarının normal kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı



Şekil 4.6. Amifostine dozlarının serrat kanatlarda oluşturduğu toplam mutant klon sayısı

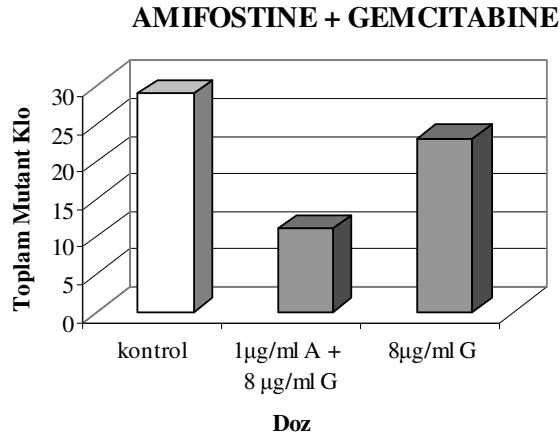
Çizelge 4.3: Amifostine'in *D. melanogaster* hatlarında etkileri

Derişimler	kanat sayısı (N)	küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (>2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			Klon indüksiyon frekansı (10 <sup>5</sup> hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
		Normal Kanat															
Distile su	80	28	(0,35)		1	(0,01)		0	(0,00)		29	(0,36)		29	(0,36)		1,48
1mM EMS	40	40	(1,00)	i	48	(1,20)	+	8	(0,20)	+	77	(1,93)	+	85	(2,13)	+	8,7
1µg/ml	80	22	(0,28)	-	3	(0,04)	i	0	(0,00)		25	(0,31)	-	25	(0,31)	-	1,28
2µg/ml	80	14	(0,18)	-	4	(0,05)	i	0	(0,00)		18	(0,23)	-	18	(0,23)	-	0,92
4µg/ml	80	17	(0,21)	-	1	(0,01)	i	1	(0,00)	i	18	(0,23)	-	19	(0,24)	-	0,97
Serrat Kanat																	
Distile su	80	19	(0,24)		0	(0,00)		0	(0,00)		19	(0,24)		19	(0,24)		0,97
1mM EMS	40	12	(0,30)	-	5	(0,13)	+	0	(0,00)		17	(0,43)	-	17	(0,43)	-	1,74
1µg/ml	80	13	(0,16)	-	0	(0,00)		0	(0,00)		13	(0,16)	-	13	(0,16)	-	0,66
2µg/ml	80	11	(0,14)	-	2	(0,03)	i	0	(0,00)		13	(0,16)	-	13	(0,16)	-	0,66
4µg/ml	80	16	(0,20)	-	2	(0,03)	i	0	(0,00)		18	(0,23)	-	18	(0,16)	-	0,92

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; z, zayıf pozitif; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0,05

#### 4.4. Amifostine ve Gemcitabine'in Birlikte Uygulamaları

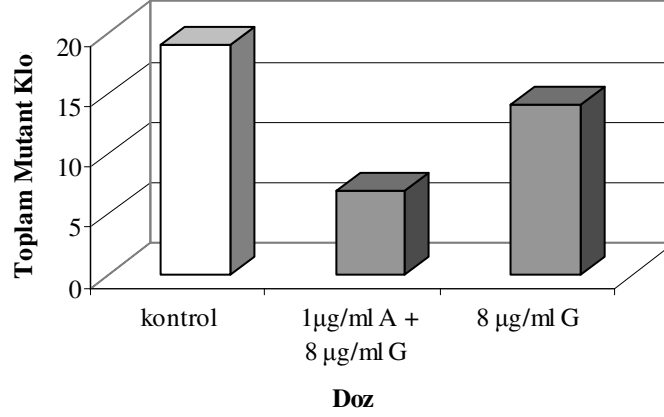
1 µg/ml Amifostine ve 8 µg/ml Gemcitabine'in birlikte uygulamasından elde edilen sonuçlar, Gemcitabine'in 8 µg/ml'lik doz uygulaması ile karşılaştırıldığında mwh/flr<sup>3</sup> genotipinde göre küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam mwh, ve toplam klon sayılarında azalma görülmekte ve sonuç istatistik anlamda negatif etkili olmaktadır. mwh/ TM3 genotipe ait sonuçlarda da küçük tek tip, büyük tek tip, toplam mwh ve toplam klonlarda 8 µg/ml'lik Gemcitabine uygulamasına göre azalma görülmekte ve sonuç negatif olmaktadır. Klon indüksiyon frekanslarında ise her iki genotipe 8 µg/ml'lik Gemcitabine uygulamasına göre azalma Çizelge 4.4'te görülmektedir. Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 de Amifostine ve Gemcitabine'in birlikte uygulamalarında normal ile serrat kanatlarda oluşan toplam mutant klon sayılarını görmekteyiz.



Şekil 4.7 Amifostine ve Gemcitabine'in birlikte uygulamalarında normal kanatlarda oluşan toplam mutant klon sayısı



### AMIFOSTINE + GEMCITABINE



Şekil 4.8 Amifostine ve Gemcitabine'in birlikte uygulamalarında serrat kanatlarda oluşan toplam mutant klon sayısı

#### 4.5. Amifostine ve Fotemustine Birlikte Uygulamaları

1 µg/ml'lik Amifostine ile 8 µg/ml'lik Fotemustine'in birlikte uygulanmasından alınan sonuçlar, 8 µg/ml Fotemustine uygulaması ile karşılaştırıldığında mwh/flr<sup>3</sup> genotipinde küçük tek tip, büyük tek tip, toplam mwh ve toplam klonlarda Çizelge 4.5'te de görüldüğü gibi azalma varken, Amifostine ikiz klon sayısında azalma sağlayamamıştır. Amifostine'in burada rekombinojenik etkiyi baskılayamadığını görmekteyiz. Sonuçlar 8 µg/ml Fotemustine uygulamasına göre istatistiksel olarak negatif olmuştur. mwh/TM3 genotipli bireylerdeki mutant klon oluşum değerleri 8 µg/ml Fotemustine uygulamasıyla karşılaştırıldığında ikiz klonlar dışında tüm mutant klon kategorilerinde azalma olmuştur. İkiz klon oluşumu bu genotipte görülmemiştir. İstatistiksel sonuçlar negatif olmuştur.

Klon indüksiyon frekanslarında normal ve serrat kanatlarda Fotemustine'in 8 µg/ml'lik uygulamasına göre düşüş Çizelge 4.5' te görülmektedir.

Çizelge 4.4: Amifostine ve Gemcitabine birlikte uygulamalarının *D. melanogaster* hatlarında etkileri

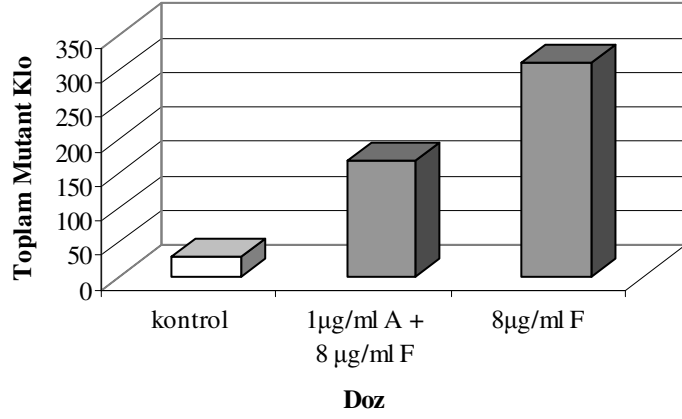
Derişimler	kanat sayısı (N)	küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (>2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			Klon indüksiyon Frekansı (10 <sup>5</sup> hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
		Normal Kanat															
Distile su	80	28	(0,35)		1	(0,01)		0	(0,00)		29	(0,36)		29	(0,36)		1,48
1mM EMS	40	40	(1,00)	i	48	(1,20)	+	8	(0,20)	+	77	(1,93)	+	85	(2,13)	+	8,7
8µg/ml gemc	80	15	(0,19)	-	5	(0,06)	i	3	(0,04)	i	19	(0,24)	-	23	(0,29)	-	1,17
*1µg/ml amif + 8µg/ml gemc	80	8	(0,10)	-	3	(0,04)	i	0	(0,00)		11	(0,14)	-	11	(0,14)	-	0,56
**1µg/ml amif+ 8µg/ml gemc	80	8	(0,10)	-	3	(0,04)	-	0	(0,00)	-	11	(0,14)	-	11	(0,14)	-	0,56
Serrat Kanat																	
Distile su	80	19	(0,24)		0	(0,00)		0	(0,00)		19	(0,24)		19	(0,24)		0,97
1mM EMS	40	12	(0,30)	-	5	(0,13)	+	0	(0,00)		17	(0,43)	-	17	(0,43)	-	1,74
8µg/ml gem	80	12	(0,15)	-	2	(0,03)	i	0	(0,00)		14	(0,18)	-	14	(0,18)	-	0,71
*1µg/mlamif + 8µg/ml gemc	80	6	(0,08)	-	1	(0,01)	i	0	(0,00)		7	(0,09)	-	7	(0,09)	-	0,35
**1µg/mlamif + 8µg/ml gemc	80	6	(0,08)	-	1	(0,01)	i	0	(0,00)		7	(0,09)	-	7	(0,09)	-	0,35

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0,05

\* :1µg/ml amifostine+ 8µg/ml gemcitabine uygulamasının, distile su kontrol değerlerine göre yapılmış istatistiksel sonuçları

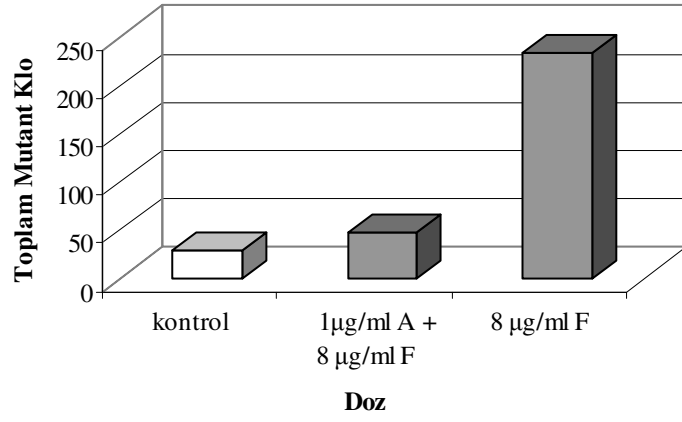
\*\* : 1µg/ml amifostine+ 8µg/ml gemcitabine uygulamasının, 8µg/ml gemcitabine uygulaması değerlerine göre yapılmış istatistik sonuçları

### AMIFOSTINE + FOTEMUSTINE



Şekil 4.9 Amifostine ve Fotemustine'in birlikte uygulamalarında normal kanatlarda oluşan toplam mutant klon sayısı

### AMIFOSTINE + FOTEMUSTINE



Şekil4.10 Amifostine Fotemustine'in birlikte uygulamalarında serrat kanatlarda oluşan toplam mutant klon sayısı

Çizelge 4.5: Amifostine ve Fotemustine birlikte uygulamalarının *D. melanogaster* hatlarında etkileri

Derişimler	Kanat sayısı (N)	küçük tek tip klonlar (1-2 hücre)(m=2)			Büyük tek tip klonlar (>2 hücre)(m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			Klon indüksiyon frekansı (10 <sup>5</sup> hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
		Normal Kanat															
Distile su	80	28	(0,35)		1	(0,01)		0	(0,00)		29	(0,36)		29	(0,36)		1,48
1mM EMS	40	40	(1,00)	i	48	(1,20)	+	8	(0,20)	+	77	(1,93)	+	85	(2,13)	+	8,7
8µg/ml fote	80	209	(2,61)	+	77	(0,96)	+	24	(0,30)	+	283	(3,54)	+	310	(3,88)	+	15,88
*1µg/ml amif+ 8µg/ml fote	80	74	(0,93)	+	71	(0,89)	+	24	(0,30)	+	142	(1,78)	+	169	(2,11)	+	8,65
**1µg/ml amif+ 8µg/ml fote	80	74	(0,93)	-	71	(0,89)	-	24	(0,30)	-	142	(1,78)	-	169	(2,11)	-	8,65
Serrat Kanat																	
Distile su	80	19	(0,24)		0	(0,00)		0	(0,00)		19	(0,24)		19	(0,24)		0,97
1mM EMS	40	12	(0,30)	-	5	(0,13)	+	0	(0,00)		17	(0,43)	-	17	(0,43)	-	1,74
8µg/ml fote	80	211	(2,64)	+	23	(0,29)	+	0	(0,00)		234	(2,93)	+	234	(2,93)	+	12
*1µg/ml amif + 8µg/ml fote	80	38	(0,48)	+	9	(0,11)	+	0	(0,00)		46	(0,58)	+	47	(0,59)	+	2,41
**1µg/ml amif+ 8µg/ml fote	80	38	(0,48)	-	9	(0,11)	-	0	(0,00)		46	(0,58)	-	47	(0,59)	-	2,41

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; z, zayıf pozitif; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0,05

\* : 1µg/ml amifostine+ 8µg/ml fotemustine uygulamasının, distile su kontrol değerlerine göre yapılmış istatistik sonuçları

\*\* : 1µg/ml amifostine+ 8µg/ml fotemustine uygulamasının, 8µg/ml fotemustine uygulaması değerlerine göre yapılmış istatistik sonuçları

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Değişik kimyasal gruplara ait ilaçlar, insanlarda tedavi ve koruma amaçlı kullanılmaktadır. Modern tıbbın ilerlemesi ile birlikte değişik antineoplastik ilaçların kemoterapide kullanımı söz konusu olmuştur. Bu ilaçlar içerisinde genotoksik olanların bulunma olasılığı çok yüksektir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, üretim aşamasında hazırlanmasında ve uygulama aşamasında temas eden personelin ve hastaların bu kimyasalların toksik ve mutajenik etkilerine maruz kalmaları söz konusudur. Bu sebeple bu bileşiklerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinin çeşitli test yöntemleriyle belirlenmesi önemlidir.

Bu çalışmada iki antikanser ilaç olan Gemcitabine ve Fotemustine'in üç farklı dozu *Drosophila* kanat SMART ile mutajenik ve rekombinojenik özellikleri bakımından *in vivo* olarak test edildi. Ayrıca bu ilaçların olası mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin kemoterapide koruyucu olarak kullanılan Amifostine tarafından azaltılıp azaltılmadığı da aynı test sistemi ile değerlendirildi.

Bu ilaçlardan biri olan Gemcitabine bir DNA sitidin baz analogudur ve sentez fazında DNA'ya girerek DNA replikasyonunu engeller. Ayrıca ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe ederek hücre içi dNTP havuzunda azalmaya sebep olur ve böylece DNA sentezini indirekt olarak ta engeller. Gemcitabine bu özellikleri sebebiyle çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Plunket ve ark. 1995a).

Çalışmamızda Gemcitabine bileşiği, distile suda çözülerek 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml dozlarında larvalara uygulandı. Gemcitabine muamelesinden elde edilen sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında *mwh/flr<sup>3</sup>* genotipinde küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klonların frekansının istatistiksel olarak önemli düzeyde artmadığı belirlenmiştir. *mwh/TM3* genotipinde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Gemcitabine'in 12 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml'lik dozları da larvalara uygulanmıştır, ancak gemcitabine'in bu yüksek dozları larval gelişimde toksik etki gösterdiğinden canlı birey elde edilememiştir. Bu nedenle bu dozların mutajenik aktiviteleri çalışılamamıştır. Bununla birlikte bu test sisteminde anlamlı mutajenik etki göstermemesine rağmen Gemcitabine'in zayıf rekombinojenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Gemcitabine'in rekombinasyon potansiyeli hakkında çok az bilgi olmakla birlikte, Gemcitabine'e benzer ajanlar olan ara-C ve 5-aza-dC'nin *Drosophila* SMART yönteminde mutajenik ve rekombinojenik olduğunu gösteren çalışmalar

mevcuttur (Cunha ve ark. 2002a). Buna göre ara-C'nin topoizomeraz I kırılma kompleksini engellediği, böylece DNA'nın tekrar bağlanmasını önlediği öne sürülmektedir. Bunun sonucunda onarılmamış DNA hasarının oluşturduğu boşluk S fazından sonra çift zincir kırığına dönüşebilmekte, böylece ara-C'nin rekombinojenik aktivitesinin arttığı düşünülmektedir. Aynı çalışmada 5-aza-dC'nin ise DNA metil transferaz ile bağlandığı DNA arasında kalıcı bir addukt oluşturduğu ve bu adductlar uzaklaştırıldıktan sonra yine topoizomerazların etkisiz hale geldiği ve sonuçta homolog rekombinasyon oranı yükselebileceği yorumu yapılmıştır. Gemcitabine bileşiği yukarıda anılan her iki bileşik ile çok benzer bir yapıya sahiptir ve DNA sentezini inhibe ederek faaliyet göstermektedir. Gemcitabine'in LPF ve V79 hücrelerinde DNA tek zincir kırıkları oluşturduğu Auer ve ark. 1997 tarafından gösterilmiştir. Bu sebeple Gemcitabine'in DNA'da oluşturacağı tek zincir kırıklarının çift zincir kırığına dönüştükten sonra homolog rekombinasyon oluşturması mümkün olabilir. Gemcitabine'in anlamlı mutajenik etki göstermemesi, test yöntemi veya uygulama protokolü ile bağlantılı olabilir. Çalışmamızda Gemcitabine'in SMART test yönteminde mutajenik etki göstermemesi, ilacın mutajenik olmadığını kesin bir kanıtı olarak alınmamalıdır. Nitekim Gemcitabine, diğer test yöntemlerinde mutajen bulunmuştur. DNA'ya bir kez girdikten sonra sadece tek bir nükleotid ilave edilmekte, sonrasında DNA polimeraz işlevini sürdürememektedir (Plunket ve ark. 1995a). Bunun sonucunda hücre programlı ölüme yani apoptosise girmektedir. Gemcitabine'in nokta mutasyon ya da non disjunction oluşturma etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte kromozom mutasyonu oluşturmaları ile ilgili *in vivo* ve *in vitro* çeşitli çalışmalar mevcuttur. Fareler ile yapılan *in vivo* bir çalışmada Gemcitabine her dozda kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyonu ve mikronükleuslu PCE oranını yüksek oranda arttırmıştır (Aydemir ve Bilaloğlu 2003). Aynı ilaç ile gerçekleştirilen *in vitro* bir çalışmada ise Gemcitabine insan periferik kan lenfositlerinde yine yüksek düzeyde kromozom aberasyonu ve SCE oluşturmuştur (Aydemir ve ark. 2005). Gemcitabine her iki çalışmada da yüksek oranda özellikle kromatid tipte olmak üzere kırık, asentrik kromozom parçası ve karşılıklı kromatid değişimini indüklemiş, aynı zamanda mitotik crossingover için bir delil sayılan SCE oluşumunu da arttırmıştır. SCE oluşum mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte replikasyon çatalındaki olası bir DNA replikasyon hatasının sonucu olabilir. Böylece DNA replikasyon ürünleri arasında

karşılıklı değiş tokuş gerçekleŐebilir (Tucker ve Preston 1996). Gemcitabine'in topoizomerazlar üzerine etkisi bilinmemekle birlikte DNA ipliğinde oluşturduğu kırıklar sebebiyle bu enzimin aktivitesi engellenebilir ve böylece somatik rekombinasyon gerçekleŐebilir.

Çalışmada kullanılan diğer antikanser ilaç Fotemustine alkilleyici özelliğe sahip bir antitümör ilaçtır. Alkilleyici ajanlar DNA- protein ve DNA- DNA apraz bağları oluşturarak etkilerini gösterirler (Karayianni ve ark. 2003). Ayrıca alkilleyici ajanlar DNA'ya bağlanarak zincir kırıklarına, mikronükleus oluşumuna ve hücre ölümüne de neden olurlar (Mazur ve Blawat 1999). Fotemustine'in üç farklı dozu (2, 4 ve 8 µg/ml) distile suda çözülerek larvalara uygulandı. Mwh/flr<sup>3</sup> genotipinde 4 ve 8 µg/ml'lik dozlarda kontrole göre küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon, toplam mwh ve toplam klonlarda anlamlı bir artış görülmüştür. Dengeleyici kromozoma sahip mwh/TM3 genotipindeki bireylerde yine 4 ve 8 µg/ml'lik dozlarda kontrole göre ikiz klon hariç tüm diğer klon frekanslarında istatistiksel anlamlı bir artış bulunmuştur. Fotemustine muamelesi sonucunda mwh/flr<sup>3</sup> genotipinde gözlenen anlamlı orandaki ikiz klon oluşumu bu ilacın rekombinojenik aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Çünkü ikiz klonların varlığı flare geni ile sentromer arasında gerçekleşen rekombinasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Fotemustine'in dahil olduğu alkilleyici ajanlarla gerçekleştirilmiş *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite çalışmaları bulunmaktadır. *E. coli* ve *Salmonella*'nın bazı suŐlarının alkilleyici ajanların mutasyon oluşturma etkilerini belirlemek üzere kullanıldığı bir çalışmada alkilleyici ajanlar N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine ( MNNG), N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG), ethyl methanesulfonate (EMS), N-methyl-N-nitrosourea (MNU), N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), methyl methane sulfonate'ın (MMS) *E. coli* WP3102P suşunda çok yüksek oranda GC→ AT transisyonuna sebep oldukları belirlenmiştir. Aynı çalışmada, bu ilaçların *Salmonella typhimurium*'un üç suşunda AT→ TA transversiyonu, GC→ AT transisyonu ve GC→ TA transversiyonuna sebep oldukları da belirtilmektedir (Ohta ve ark. 2000). Çalışmamızda da Fotemustine'in mutajenik etkisinin yüksek olduğu özellikle dengeleyici kromozom taşıyan mwh/TM3 bireylerindeki yüksek klon frekansından anlaŐılmaktadır. Alkilleyici bir ajan olan Fotemustine, DNA bazlarını alkilleyerek, baz substitüsyonu tipinde mutasyonlara, diğer alkilleyici ajanlar gibi neden olabilir. Gerçekte alıŐmamızda gözlenen yüksek

mutasyon frekansı Fotemustine'in bu tip bir etkisine bağlanabilir ve bu açıdan diğer alkilleyici ajanlara bir benzerlik söz konusudur. Fotemustine'in *Salmonella*'daki mutajenitesi ile ilgili bir çalışmada *Salmonella G-46* suşunda yüksek oranda baz çifti mutajeni olarak etkili olduğu bildirilmiştir (Ashby 1993).

Alkilleyici ajanlar MMS ve cyclophosphamid (CP) *in vivo* fare kemik iliğinde yapılan bir çalışmada yüksek oranda DNA hasarı oluşturduğu Comet testi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada özellikle MMS'in DNA daki ve aminoasit moleküllerindeki nükleofilik bölgeleri metilleştirebildiği, özellikle de azot atomlarında metilleşme yapabildiği belirtilmiştir. Böylece baz değişimlerine sebep olup, DNA ipliğinde depürinasyon/depirimidinasyona yol açtığı ve dolayısıyla apürinik (AP) bölgeler oluşturduğu düşünülmektedir. AP bölgelerinin DNA'dan uzaklaştırılması sonucunda bu bölgelerde kırıklar meydana gelmektedir (Rech Franke ve ark. 2005).

Yabani tipteki *Drosophila* larvalarının kullanıldığı bir Comet testi çalışmasında MMS'in diğer alkilleyicilere (EMS, ENU, CP) nazaran her dozda en yüksek oranda DNA hasarı oluşturduğu belirlenmiştir (Siddique ve ark. 2005). Alkilleyici ajanların belirlenen bu mutajenik etkileri aynı gruba dahil olan Fotemustine'in mutajenik etki oluşturma mekanizmasına bir açıklık getirdiği düşünülebilir.

Fotemustine'in kromozom aberasyonu ve SCE oluşturma etkisiyle ilgili *in vitro* bir çalışmada bu ilacın insan kan lenfositlerinde yüksek oranda kromozom ve kromatid tipte kırıklar oluşturduğu belirlenmiştir (Çelikler 2004). Yine aynı çalışmada yüksek oranda SCE oluşumunu indüklediği de belirtilmektedir. Fotemustine ve analogları nitrososulfamid 4 ve 8'in A375 melanoma hücre hattında Comet testiyle yapılan *in vitro* bir çalışmada DNA fragmentasyonu oluşturdukları bulunmuştur (Passagne ve ark. 2003). Fotemustine ve alkilleyici bir başka ajan olan streptozotosinin kullanıldığı bir çalışmada, bu iki ajanın fare kemik iliğinde MN'li eritrosit oranını anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir (Chinnasamy ve ark. 1998).

Fotemustine ile gerçekleştirilmiş genotoksisite çalışmalarının pozitif sonuçları bizim çalışmamızdaki bulgularla uyumluluk göstermektedir. Buna göre Fotemustine'in *Drosophila* kanat SMART yönteminde mutajenik ve rekombinojenik olduğu ileri sürülebilir.

Amifostine, kemoterapi ve radyasyon tedavisi alan hastalarda seçici bir hücre koruyucu ajan olarak kullanılmaktadır. Amifostine'in hücre koruyucu etkisi, onun



serbest radikalleri yakalama yeteneğine ve antimutajenik etkilerine bağlıdır (Acosta ve ark. 2003).

Hücre içerisinde serbest tiyol formuna dönüşen Amifostine, normal hücrelere girerek yüksek oranda antimutajenik ve hücre koruyucu etki oluşturmaktadır. *In vivo ve in vitro* deneysel çalışmalar, Amifostine'in radyasyon terapisinden veya Cisplatin, Cyclophosphamid, Carboplatin, Doxorubicin, Paclitaxel veya 5 fluorouracil gibi antikanser ilaçlarından kaynaklanan toksik etkilere karşı hücre koruyucu etkisini göstermektedir (Campos Nebel ve ark. 2002). Bir *in vitro* çalışmada antikanser ilaç Idarubicinin insan normal lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarını, Amifostine'in anlamlı oranda azalttığı Comet testi ile belirlenmiştir (Blasiak ve ark. 2002). Başka bir *in vitro* çalışmada normal insan lenfositleri ve insan lösemi HL 60 hücrelerinde antikanser ilaç Amsakrin uygulanmış ve amifostine kullanılarak bu ilacın DNA üzerindeki etkisini azaltıp azaltmadığı Comet testi ile incelenmiştir. Bunun sonucunda Amifostine'in normal hücrelerdeki DNA hasarını azalttığı, kanser hücrelerinde ise etkisiz kaldığı belirlenmiştir (Blasiak ve ark. 2003).

Amifostine'in genotoksisiteyi önleyici etkisine ilişkin bir çalışmada CP ile muamele edilen farelerin kemik iliğinde meydana gelen yüksek orandaki MN'lu eritrosit oranını Amifostine'in düşürdüğü belirlenmiştir (Mazur ve Blawat 1999). Böylece alkilleyici ajanların DNA üzerinde meydana getirdiği hasarın Amifostine tarafından önenebileceği öne sürülmüştür. Bu sonuç çalışmamızdaki bulgularla uyumlu gözükmektedir

Lösemi hücre hatlarında Daunorubicin ve Daunoxome antrasiklinlerinin kullanıldığı bir çalışmada Amifostine, bu ilaçların normal hücrelerdeki sitotoksitesini azaltırken ilaçların lösemi hücrelerindeki sitotoksik etkisini değiştirmemiştir. Bu sebeple Amifostine, normal hücreleri antikanser ilaçların sitotoksik etkisinden korumak için ideal bir ilaç olarak önerilmektedir (Michelutti ve ark. 2006).

Amifostine'in çalışmamızda kullanılan ilaçların mutajenik etkisini engelleyip engellemediğini belirlemeden önce, ilacın kendisinin *Drosophila* kanat SMARTta mutajenik veya rekombinojenik etkisinin olup olmadığını öncelikle belirledik. Amifostine'in 1, 2 ve 4 µg/ml dozları çalışılmıştır. Amifostine kontrol ile karşılaştırıldığında, önemsiz oranda mutant klon oluşumu görülmüştür. Hem *mwh/flr<sup>3</sup>* genotipinde hem de *mwh/TM3* genotipinde ikiz klon oluşumunu indüklememiştir.

Çalışmamızın 1 µg/ml Amifostine ile 8 µg/ml Gemcitabine'in birlikte uygulanmasında Amifostine, Gemcitabine'in 8 µg/ml'lik dozuna göre tüm klonlarda bir azalma oluşturmuştur. Bu azalma istatistiksel olarak negatif etkili olduğundan amifostine'in antimutajenik etkisi gemcitabine'in 8 µg/ml'lik uygulamasından elde edilen sonuçları hem mwh/flr<sup>3</sup> genotipinde hem de mwh/TM3 genotipinde daha da indirmiştir.

1 µg/ml Amifostine ile 8 µg/ml Fotemustine'in birlikte uygulanmasının sonucunda mwh/flr<sup>3</sup> ve mwh/TM3 genotiplerinde, 8 µg/ml'lik Fotemustine uygulamasına göre tüm mutant klon kategorilerinde bir azalma sağlanmıştır. Ancak bu azalma distile su kontrol değerlerine tam olarak ulaşamamıştır. Amifostine'in hücre koruyucu etkisini, Fotemustine gibi alkilleyici bir ajan olan CP'in toksik etkilerine karşı gösterdiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar onun antimutajenik etkisini destekler gözükmektedir. Benzer şekilde Amifostine'in, Fotemustineden kaynaklanan mutajenik etkiyi indirgediği de görülmektedir.

Bu çalışmada, kanser tedavisinde kullanılan Gemcitabine ve Fotemustine'in *in vivo* Drosophila kanat SMART yönteminde mutajenik ve rekombinojenik etkileri araştırılmıştır. Bu anılan ilaçlarla daha önceden gerçekleştirilmiş kanat SMART çalışmasına rastlanmaması ayrıca, *D. melanogaster*'in model organizma olarak insana büyük oranda benzerlik göstermesi ve ökaryotik bir organizma olması (Valencia ve ark.1984, Venitt ve Parry 1984), testin *in vivo* bir test olması, elde edilen bulgular açısından önemlidir. *In vivo* testlerin organizmanın bütünlüğü içinde yapıyor olması, herhangi bir ajana karşı organizma tarafından verilen cevabın böyle bir test ile gösterilmesi büyük öneme sahiptir (Kaya 2000).

Teknoloji ve tıbbi imkanların ilerlemesiyle birlikte piyasaya hergün yeni bir kimyasal madde ve antineoplastik ilaç sunulmaktadır. Bu yeni ilaçların üretim, hazırlanma ve uygulama aşamasında özellikle sağlık personeli bu ilaçlarla temas etmek durumundadır. Özellikle tedavinin uygulandığı kanser hastalarının fertiliteleri üzerinde olumsuz etkiler oluşmaktadır (Tiburi ve ark. 2002). DNA'nın hasarlanma özellikleri, kemoterapinin kesilmesinden yıllar sonra ilk kanserle ilgisiz ikincil tümörlerin başlamasına öncülük edebilmektedir (Auer ve ark. 1997). Meslekleri gereği antineoplastik ilaçlara kronik olarak maruz kalan kişilerde DNA hasarlarının oluşması açısından risk faktörü önemli bir rol oynamaktadır. Bu sebeple kanser tedavisinde

kullanılan her bir yeni antineoplastik maddenin sitotoksik ve genotoksik potansiyellerinin *in vitro* ve özellikle *in vivo* test sistemleriyle belirlenmesi gerekmektedir (Tiburi ve ark. 2002).

Drosophila SMART yöntemi ile değerlendirdiğimiz Gemcitabine uygulanan dozlarda mutajenik etki göstermemiş, ancak rekombinojenik etkili olarak bulunmuştur. Gemcitabine'in bu deney sisteminde 12 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml dozları larvalara uygulanmış ancak larvalarda yüksek dozların toksik etkisi nedeniyle bu dozların mutajenik etkileri değerlendirilememiştir. Başka test sistemlerinde mutajenik bulunan Gemcitabine, bu test sisteminde mutajenik bulunamamıştır. Bunun yanı sıra Fotemustine hem mutajenik hemde rekombinojenik etki göstermiştir. Ayrıca Amifostine tek başına Drosophila SMART yönteminde herhangi bir mutajenik, rekombinojenik etki oluşturmamıştır ama, Fotemustine'in mutajenik etkisini azaltmıştır. Bu üç bileşiğin de Drosophila SMART yöntemiyle ilk kez çalışılması elde edilen sonuçların anlamlılığını arttırdığı düşüncesindeyiz. Ayrıca, yine özellikle kanser hastalarına kemoterapi uygulanması esnasında uygun antimutajenik ajanlarla sağlıklı hücreler üzerindeki olumsuz etkilerinin kanser ilaçlarının etkileri mümkün olduğunca azaltılması amaçlanmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız antimutajen Amifostine'in *in vivo* Drosophila SMART yönteminde antimutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu tip çalışmaların gelecek kanser kemoterapi uygulamalarında yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

ACOSTA, J. C., C. RICHARD, M. .D. DELGADO, M. HORITA, M. G. RIZZO, J. L. FERNANDEZ-LUNA and J. LEON, 2003, Amifostine impairs p53-mediated apoptosis of human myeloid leukemia cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2: 893-900.

ASHBY, J., E. W. VOGEL, H. TINWELL, R. D. CALLANDER and D. E. G. SHUKER, 1993, Mutagenicity to Salmonella, Drosophila and the Mouse bone marrow of the human antineoplastic agent fotemustine: Prediction of carcinogenic potency. *Mut. Res.* 286: 101-109.

AUER, H., R. OEHLER, R. LINDNER, H. KOWALSKI, G. SLIUZ, L. OREL, E. KUCERA, M. M. SIMON and J. GLOSSL, 1997, Characterisation of genotoxic properties of 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mut. Res.* 393: 165-173.

AULETTA, A.E., K. L. DEARFIELD and M. C. CIMINO, 1993, Mutagenicity test schemes and guidelines: U. S. EPA Office of Pollution Prevention and Office of Pesticide Programs. *Env. Mol. Mutagen.* 21: 38-45.

AYDEMIR, N and R. BILALOGLU, 2003, R. BILALOGLU, 2003, Genotoxicity of two anticancer drugs, gemcitabine and topotecan, in Mouse bone marrow in vivo. *Mut. Res.* 537/1: 43-51.

AYDEMIR, N., S. CELIKLER and R. BILALOGLU, 2005, In vitro genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes. *Mut. Res.* 582: 35-41.

BARRET, J. C., 1995, Role of mutagenesis and mitogenesis in carcinogenesis. In PHILLIPS, D. H. and S. VENITT. *Environmental Mutagenesis*, Bios Scientific Publisher, p. 21-32. Abingdon, UK.

BLASIAK, J., E. GLOC, K. WOZNIAK, W. MLYNARSKI, M. STOLARSKA, T. SKORSKI and I. MAJSTEREK, 2002, Genotoxicity of idarubicin and its modulation by vitamins C and E and amifostine. *Chemico- Biological Interactions*, 140: 1-18.

BLASIAK, J., E. GLOC, J. DRZEWOSKI, K. WOZNIAK, M. ZADROZNY, T. SKORSKI and T. PERTYNSKI, 2003, Free radical scavengers can differentially modulate the genotoxicity of amsacrine in normal and cancer cells. *Mut. Res.* 535: 25-34.

BRUSICK, D., 1987, *Principles of Genetic Toxicology*. 2nd Edition. Plenum, p. 284, New York.

CAMPOS NEBEL, M., I. LARRIPA and M. GONZALEA-CID, 2002, Differential antigenotoxic and cytoprotective effect of amifostine in idarubicin-treated mice. *Environ. Mol. Mutagens.* 39: 3-9.

CHINNASAMY, N., L. J. FAIRBAIRN, J. LAHER, M. A. WILLINGTON and J. A. RAFFERTY, 1998, Modulation of O<sup>6</sup>-alkylating agent induced clastogenicity by enhanced DNA repair capacity of bone marrow cells. *Mut. Res.* 416: 1-10.

COLLINS, A. R., M. DUSINSKA, C. M. GEDIK and R. STETINA. 1996. Oxidative damage to DNA, Do we have a reliable biomarker? *Environ. Health. Persp.*, 104(Suppl.3): 465-469.

CUNHA, K. S., M. L. REGULY, U. GRAF and H. H. R. ANDRADE, 2002a, Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolite chemotherapeutic drugs in *Drosophila melanogaster*. *Mut. Res.* 514: 95-103.

CUNHA, K. S., M. L. REGULY, U. GRAF and H. H. R. ANDRADE, 2002b, Comparison of camptothecin derivatives presently in clinical trials: genotoxic potency and mitotic recombination. *Mutagenesis*, 17: 141-147.

ÇELİKLER, S., 2004, Antineoplastik ajanlardan Muphoran ve navelbine'in mutajenik etkisinin insan lenfosit kültürlerinde araştırılması. xiii+112 Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

FRANKE, S. I. R., D. PRA, B. ERDTMANN, J. A. P. HENRIQUES and J. SILVA, 2005, influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents on in vivo analysis. *Mutagenesis*, 20: 279-283.

FREI, H. and F. E. WURGLER, 1988, Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutat. Res.* 203: 297-308.

FREI, H. and F. E. WURGLER, 1995, Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334: 247-258.

FREI, H. and F. E. WURGLER, 1996, Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 11: 315-325.

FRENZILLI, G., E. BOSCO, R. BARRALE, 2000, Validation of Single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mut. Res.* 468: 137-163.

GLICKMAN, B. W., G. KOTTURI, J. BOER and W. KUSSER, 1995, Molecular mechanisms of mutagenesis and mutational spectra. In PHILLIPS, D. H. and S. VENITT, *Environmental Mutagenesis*, pp33-61, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.

GRAF, U., F. E. WURGLER, A. J. KATZ, H. FREI, H. JUAN, C. B. HALL and P. G. KALE, 1984, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.

GRAF, U., A. A. MORAGA, GRAF, UR. CASTRO and E. CARRILLO, 1994, Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Food Chem. Toxicol.* 32: 423-430.

GRAF, U., 1995, Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 51: 168-173.

GRAF, U. and F. E. WURGLER, 1996, The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 27: 219-226.

GRAF, U., M. A. SPANO, J. G. RINCON, S. K. ABRAHAM and H. H. ANDRADE, 1996, The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *African Newsletter*, 1: 9-13.

GRAF, U., N. V. SCHAİK and F. E. WURGLER, 1992, *Drosophila* genetics 'a practical course'. 239 pp., New York

GRAF, U., S. K. ABRAHAM, J. GUZMAN-RINCON and F. E. WURGLER, 1998, Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mut. Res.* 402: 203-209.

GREENSPAN, R. J., 2004, Fly Pushing; The Theory and Practise of *Drosophila* Genetics. Second Editions, pp 191 Cold Spring Harbor Laboratory Pres, New York.

GRIFITS, A. J., J. H. MILLER, D. T. SUZUKI, R. C. LEWANTIN and W. M. GELBART, 2000, An introduction to genetic analysis. Seventh Edition W. H. Freeman XVII+860 New York.

HAMSS, R. E., M. ANALLA, J. CAMPOS-SANCHEZ, A. ALONSO-MORAGA, A. MUNOZ-SERRANO and M. IDAOMAR, 1999, A dose dependent anti-genotoxic effect of turmeric. *Mut. Res.* 446: 135-139.

HARGRAVE, D. R., E. BOUFFET, J. GAMMON, N. TARIQ, R. M. GRANT and S. BARUCHEL, 2002, Phase I study of fotemustine in pediatric patients with refractory brain tumors. *Cancer*, 95: 1294-1301.

HEINEMANN, V., L. SCHULZ, R. D. ISSELS and W. PLUNKET, 1995, Gemcitabine: A modulator of intracellular nucleotide and deoxynucleotide metabolism. *Seminars in Oncology*, 22: 11-18.

HEINEMANN, V., 1996, Gemcitabine: mechanism of action and clinical activity. *Cancer Detection and Prevention*, 20: (5).

HERES-PULIDO, M. E., I. DUENAS-GARCIA, L. CASTANEDA-PARTIDA, A. SANCHEZ-GARCIA, M. CONTRERAS-SOUSA, A. DURAN-DIAZ and U. GRAF, 2004, Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 19: 187-193.

HUANG, P., S. CHUBB and L. W. HERTEL, 1991, Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* 51: 4417-4422.

INVERNIZZI, R., A. PECCI, E. TRAVAGLINO, P. G. GOBBI, L. MALABARBA, I. RAMAJOLI and E. ASCARI, 2002, Clinical and biological effects of treatment with amifostine in myelodysplastic syndromes. *British J. Haematology*, 118: 246-250.

IPCS, 1985, Guide to Short-term Test for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemicals. World Health Organization. Pp 208. Geneva



KARAYIANNI, V., E. MIOGLOU, Z. IAKOVIDOU, D. MOURELATOS, M. FOUSTERIS, A. KOUTSOUREA, E. ARSENOU and S. NIKOLAROPOULOS, 2003, A new approach for evaluating in vivo anti-leukemic activity using the SCE assay. An application on three newly synthesised anti-tumour ssteroidal esters. Mutat. Res. 535: 79-86.

KAREKAR, V., S. JOSHI and S. L. SHINDE, 2000, Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. Mut. Res. 468: 183-194.

KASTENBAUM, M. A. and K. O. BOWMAN, 1970, Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutat. Res. 9: 527-549

KAYA, B., 2000, Bazı pestisidlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması. pp xiv+134 Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

KAYA, B., A. YANIKOGLU, A. CREUS and R. MARCOS, 2000, Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. Mutation Research, 465: 77-84.

KIRSCH-VOLDERS, M. A. VANHAUWAERT, M. DE BOEK, and I. DECORDIER, 2002, Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. Mutat. Res. 504: 137-148.

KOHLER, R. E., 1994, Lords of the Fly; *Drosophila* Genetics and the Experimental Life. The University of Chicago Pres, pp xv+321 Chicago

KLUG, W. S. and M. R. CUMMINGS, 2002, Genetik Kavramlar, pp xxv+816 Palme Yayıncılık, Ankara

LAZO, J. S. and J. M. LARNER, 1998, Individual antineoplastic drugs. In: BRODY, T. M., J. LARNER and K. P. MINNEMAN, Human Pharmacology, p 599-613, Mosby St. Louis MO.

LINDSLEY, D. L. and G. G. ZIMM, 1992, The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Pres, 1133 pp. San Diago, CA.

LOEB, L. A. and B. D. PRESTON, 1986, Mutagenesis by apurinic/ apyrimidinic sites. Ann. Rev. Genet. 20: 379-385.

MAKI, H., 2002, Origins of spontanous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequens-substitution mutagenes. Annual Review of Genetics, 36: 279-303.

MALHAIRE, J. P., B. LUCAS, H. SIMON, H. PERSON, P. DAM-HIEU and J. P. LABAT, 1999, Fotemustine (Muphoran) in 22 patients with relapses of high-grade cerebral gliomas. Bulletin Cancer, 86: 289-294.

MALLING, H. V., 2004, Incorporation of mammalian metabolism into mutagenicity testing. Mut. Res. 566: 183-189.

MARNETT, L. J. and J. P. PLASTARAS, 2001, Endogenous DNA damage and mutation. Trends in Genetics, 17: 214-221.

MASON, K. A., L. MILAS, N .R. HUNTER, M. ELSHAIKH, L. BUCHMILLER, K. KISHI, K. W. HITTELMAN and K . K. ANG, 1999, Maximizing therapeutic gain with gemcitabine and fractionated radiation. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 44: 1125-1135.

MAZUR, L. and A. BLAWAT, 1999, Effects of GSH and WR-2721 on inductionof micronuclei by cyclophosphamide. Toxicology Letters, 110: 67-72.

MERLIN, J. L., S. MARCHAL, C. RAMACCI, M. BERLION and M. G. POUILLAIN, 2002, Enhancement of fotemustine (muphoran) cytotoxicity by amifostine in malignant melanoma cell lines. *Anti-Cancer Drugs*, 13: 141-147.

MERIMSKY, O., M. INBAR, I. REIDER- GROSWASSER and S. CHAITCHICK 1991, Fotemustine with or without dacarbazine for brain metastasis of malignant melanoma, *Eur. J. Cancer* 27: 1066-.

MICHELUTTI, A., R. STOCCHI, A. CANDONI, M. TIRIBELLI, E. CALSTRI, D. RUSSO, R. FANIN and D. DAMIANI, 2006, Effect of amifostine on the cytotoxicity of daunorubicin and daunoxome in tumor and normal cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 57: 517-524.

MITCHELL, I. G. and R. D. COMBES, 1984, Mutation tests with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. In VENITT, S. and I. M. PARRY, *Mutagenicity testing a practical approach*. pp. 149-185, IPRL.

NATARAJAN, A. T. and G. OBE, 1986, How do in vivo mammalian assays compare to in vitro assays in their ability to detect mutagens. *Mut. Res.* 167: 189-201.

OHTA, T., M. WATANABE-AKANUMA and H. YAMAGATA, 2000, A comparison of mutation spectra detected by *Escherichia coli* Lac<sup>+</sup> reversion assay and the *Salmonella typhimurium* His<sup>+</sup>. *Mutagenesis*, 15: 317-323.

PASSAGNE, I., A. EVRARD, J. Y. WINUM, P. DEPEILLE, P. CUQ, J. L. MONTERO, D. CUISSOL and L. VIAN, 2003, Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by new fotemustine analogs on human melanoma cells in relation to O<sup>6</sup>-methylguanine DNA- methyltransferase expression. *J. Pharmacology and experimental therapeutics*, 307: 816-823.

PLUNKET, W., P. HUANG, Y. Z. XU, V. HEINEMANN, R. GRUNEWALD and V. GANDHI, 1995a, Gemcitabine: Metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Seminars in Oncology*, 22: 3-10.

PLUNKET, W., P. HUANG and V. GANDHI, 1995b, Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs*, 6: 7-13.

RIEGER, S. DURKA, J. STREFFER, J. DICHGANS and M. WELLER, 1999, Gemcitabine cytotoxicity of human malignant glioma cells: modulation by antioxidants, BCL-2 and dexamethasone. *European J. Pharmacology*, 365: 301-308.

RIPLEY, L. S., 1990, Frameshift mutation: Determinants of specificity. *Annu. Rev. Genet.* 24: 189-213.

SALMON, S. E. and M. APPLE, 1974, Chemotherapeutic agents cancer chemotherapy. In MEYERS, H. F., E. JAWETZ and A. GOLDFIEN (Editor). *Review of Medical Pharmacology*, 4. Edition, p: 470-503. Los Altos, California.

SIDDIQUE, H. R., D. K. CHOWDHURI, D. K. SAXENA and A. DHAWAN. 2005, Validation of *Drosophila melanogaster* is an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 20: 285-290.

SMITH, C. A. and E. J. WOOD, 1991, *Molecular Biology and Biotechnology*, First edition, Chapman and Hall Limited, London.

SZABAD, J., I. SOOS, G. POLGAR and G. HEJJA 1983, Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex linked recessive lethal test. *Mut. Res.* 113: 117-133.

TIBURI, M., M. L. REGULY, G. SCHWARTSMANN, K. S. CUNHA, M. LEHMANN and H. H. R. ANDRADE, 2002, Comparative genotoxic effect of

vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mut. Res. 519: 141-149.

TORRES, C., A. CREUS and R. MARCOS, 1998, Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerase in larval cells of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay. Mut. Res. 413: 191-203.

TRAŞ, B., 1998, Genetik Toksikoloji. Edt. KAYA, S., İ. PİRİNÇCİ ve A. BİLGİLİ, Veteriner hekimliğinde toksikoloji, Median Yayınevi, s. 443-470. I. Baskı, Ankara.

TUCKER, J. and R. J. PRESTON, 1996, Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. Mut. Res. 365: 147-159.

VALENCIA, R. L., S. ABRAHAMSON, W. R. LEE, E. S. VON HALLE, R. C. WOODRUFF, F. E. WURGLER and S. ZIMMERING, 1984, Chromosomal mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 134: 61-88.

VENITT, S. and D. H. PHILLIPS, 1995, The importance of environmental mutagens in human carcinogenesis and germline mutation. In PHILLIPS, D. H. and S. VENITT, Environmental Mutagenesis, pp 1-20, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.

VENITT, S. and I. M. PARRY, 1984, Background to mutagenicity testing. In VENITT, S. and I. M. PARRY, Mutagenicity testing a practical approach. pp. 1-24, IPRL.

VENITT, S., C. CROFTON- SLEGH and R. FORSTER, 1984, Bacterial mutation assays using revers mutation. In VENITT, S. and I. M. PARRY, Mutagenicity testing a practical approach. pp. 45-98, IPRL.

VOGEL, E. W. 1992, Test for recombination in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.*, 284: 159-175.

WATERS, M. D., H. F. STACK and M. A. JACKSON, 1999, Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mut. Res.* 437: 21-49.

WÜRGLER, F. E. and E. W. VOGEL, 1986, In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In chemical mutagens, Principle and methods for their detection. WÜRGLER, F. E. and E. W. VOGEL (Editors) Vol. 10. Plenum Pres, pp 1-73. New York.

YUSPA, S. H., 2000, Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis*, 21: 341-344.

## **TEŞEKKÜR**

Tez konumun belirlenmesinde ve alıőmamın her aşamasında değerli bilgilerini esirgemeyen danıőmanım Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU' na, çalışmada kullanılan Drosophila hatlarının sağlanmasından dolayı Akdeniz Üniv. Biyoloji Bölümü öğretim görevlilerinden Doç. Dr. Bülent KAYA' ya, çalıőmamın her aőamasındaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Nilüfer AYDEMİR, Araő. Gör. Dr. Serap ÇELİKLER ve ablam Dr. Çiğdem EGEL' e, yardımlarını ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve eőime sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Nurdan SEVİM 1978 yılında Bursa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. 1996 yılında Uludağ Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. Biyoloji Bölümü'nden Biyolog ünvanını alarak 2000 yılında mezun oldu. 2003 yılında Uludağ Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladı.