

ÖZET

Bu çalışmada topoizomerez II inhibitörlerinden olan ve genellikle memelilerde antikarsinojenik ilaç olarak kullanılan Etoposidin farklı konsantrasyonlarının *Allium cepa* (soğan) meristematik dokusuna etkileri incelendi.

Allium cepa tohumlarının kök uçlarına, Dimetilsülfoksit içinde hazırlanan 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml ve 100µg/ml konsantrasyonlarındaki Etoposid uygulandı. Meristematik dokunun mikroskopik analizleri ezme preparat yöntemiyle aseto-orsein boyası kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışmalar sonucunda doz gruplarında etoposid miktarının artışına bağlı olarak bazı toksik etkiler bulundu. Etoposidin 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml ve 100µg/ml doz gruplarının kök büyümesine olumsuz etkisi sırasıyla %9.64, %12.66, %27.71, %88.56 olarak saptandı. istatistiksel olarak, 100µg/ml doz grubunda anlamlı şekilde büyümenin azaldığı bulundu ($p=0,056$). Etoposid konsantrasyonu arttıkça, mitotik indeksler de sırasıyla %10.15, %7.32, %2.6 ve %0.4 oranlarında azalma olduğu, buna karşın mitoz evrelerindeki anormalliklerin artışının, konsantrasyonun doğrudan artışına bağlı olmadığı saptandı. I.Doz grubunda en sık nükleusu olmayan hücreler belirlenirken II.Doz grubunda en sık anafazda kromozom köprüleri ve mikronükleus oluşumları gözlemlendi. III. Doz grubunda ise en çok kromozomlarda yapışma anormalliği görüldü. Mitotik indeks ve kök uzaması arasında bir ilişki tespit edilemedi.

Elde edilen sonuçlar, memeli topoizomerez II inhibitörleri çalışmalarıyla kıyaslandığında, bu enzimin *Allium cepa* bitkisinin gelişiminde de önemli olduğu saptandı. Yapılan bu çalışma etoposidin herbisit olarak kullanımında ortaya çıkacak tehlikenin boyutunu göstermesi bakımından da önemlidir. Kullanılacak dozların miktarlarına dikkat edilmediği takdirde etoposidin bitki dokularında (bu çalışma için *Allium cepa*'da) meydana getirdiği zararlı etkileri hayvanlar ve insanlarda da benzer şekilde ortaya çıkacaktır.

ABSTRACT

In this study, the effects of different concentrations of Etoposide, which is a topoisomerase II inhibitor and usually used as an anticarcinogenic medicine for mammals, have been investigated using *Allium cepa* root-tip meristematic tissue.

Concentrations of 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml and 100µg/ml were used for dilutions of Etoposide in Dimethyl sulfoxide (DMSO). Microscopic meristematic tissue analysis were carried out following aceto-orcein squash procedure.

As a result, some toxic effects have been observed depending on the increase of Etoposide concentration. Negative effect of Etoposide on root growth in 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml and 100µg/ml dose groups were estimated in percentages of %9.64, %12.66, %27.71 and %88.56, respectively. In dose group 100µg/ml, the growth was found to be significant ($p=0,056$). It was also concluded that, mitotic index decrease in percentages of %10.15, %7.32, %2.6 and %0.4 with the increase of Etoposide concentrations. However, mitotic abnormalities were found not to be depended on the increase in concentrations directly. In the Dose group I, some cells which in lack of dense nucleus were observed. In the Dose group II, some chromosome bridges in anaphase and micronucleus were determined. In the Dose group III, some chromosomal stickiness have been detected. No correlation was found between mitotic index and root growth, here in.

In comparison with the previous results of mammalian Topoisomerase II inhibitor studies, it was concluded that, this enzyme is important in development of *Allium cepa* also. It has been emphasized in this study that, using Etoposide as an herbicide is risk-taking. In case of not taking into account of suitable dosage for Etoposide to be used, some toxic effects seen on plants might also be seen on animals and human beings.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince desteğini gördüğüm, bilgisinden faydalandığım danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülay HEKİMBAŞI'na özellikle hoşgörü ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca kendisinden hayata dair örnekler aldığım Sayın Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN'e manevi katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Staj yıllarımdan başlayıp tez çalışmama kadar her konuda bilgi ve yardımını esirgemeyen, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı imkanlarından faydalanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e teşekkürlerimi sunarım. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı çalışanları olarak desteklerini gördüğüm Laborant Füsün ÖNCÜ'ye, Laborant Sibel DOĞAN'a ve Laborant Selahattin ÜNAL'a teşekkür ederim.

Fotoğraf çekimi için yardımcı olan Biyolog Ayşegül BAYRAK'a, değerli katkılarından dolayı Biyolog Evren KANBUROĞLU'na, Teknisyen Özlem ASKER'e ve tez metninin basımı sırasında emeği geçen Figen DUMLU'ya teşekkür ederim.

Çocukluğumdan beri elimi uzattığımda tutacaklarını bildiğim biricik aileme; sabrından, maddi-manevi desteğinden, fedakarlığından, sevgisinden dolayı hayat arkadaşım Emre YILDIRIM'a sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
 1. GİRİŞ	 1
1.1. DNA'nın Yapısı ve Replikasyonu	2
1.2. Hücre Döngüsü ve Mitotik İndeks	7
1.2.1. Hücre Döngüsü	7
1.2.2. Mitotik İndeks	11
1.3. Kemoterapi ve Antineoplastik Ajanlar	11
1.3.1. Antineoplastik Ajanların Hücre Döngüsüne Etki Mekanizması	11
1.3.2. Antineoplastik Ajanların DNA Üzerine Etki Mekanizması	16
1.4. Topoizomerez Enzimleri ve İnhibitörleri	19
1.4.1. DNA Topoizomerez I :	20
1.4.2. DNA Topoizomerez II :	22
1.4.2.1. Topoizomerez II enziminin sınıflandırılması ve Adlandırılması	26
1.4.2.2. Topoizomerez II enziminin çeşitleri	27
1.4.3. Topoizomerez Enzimlerinin İnhibitörleri ve İşleyiş Mekanizması	28
1.5. Etoposid	36
1.5.1. Çalışma Mekanizması	36
 2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	 39

3. MATERYAL VE METOD	45
3.1. Materya	45
3.2. Metod	45
3.2.1. Stok Etoposid Solüsyonunun Hazırlanması ve Çimlendirme	45
3.2.2. Dimetil Sülfoksit (DMSO) Kontrol Grubunun Hazırlanması ve Çimlendirilmesi	47
3.2.3. Distile Su Kontrol Grubunun Hazırlanması ve Çimlendirilmesi	48
3. 2. 4. Preparatların Hazırlanması	48
4. BULGULAR	51
4. 1. Farklı Etoposid Konsantrasyonlarının Kök Büyümesine Etkileri	51
4.2. Farklı Etoposid Konsantrasyonlarının Mitotik indeks Üzerine Etkileri	54
4.3. Farklı Etoposid Konsantrasyonlarının Kromozomlar Üzerine Etkisi ve Mitoz Safhalarındaki Anormallik Oranları	57
4.3.1. I. Doz Grubunda Görülen Anormallikler	58
4.3.2. II. Doz Grubunda Görülen Anormallikler	63
4.3.3. III. Doz Grubunda Görülen Anormallikler	68
4.4.4. IV. Doz Grubunda Görülen Anormallikler	72
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇLAR	81
KAYNAK	83
ÖZGEÇMİŞ	98
EKLER	99

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MI	Mitotik Indeks
VP-16	Etopozid
N	Azot
L-Asp	L-Asparaginaz
SC1 ve SC2	Yapı İskelet Proteinleri
SAR	Scaffold-Associated Regions
NC-IUBMB	Uluslararası Enzim Komisyonu
EC 5, 99, 1, 3	Topoizomeraz II
KDa	Kilo Dalton
CAMP	Camptothecin
ADR	Adriamycin
VM-26	Teniposide
DMSO	Dimetilsülfoksit
EORTC	Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu
µg/ml	Mikrogram/ mililitre
µl	Mikrolitre
mg.	Miligram
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
CHO	Çin Hamster Yumurtası
DC3F	Çin Hamster Akciğer Fibroblast Hücreleri
SCE	Kardeş Kromatid Değişimleri
PBCV	Chlorella virüsü
Rb	Retinoblastoma
GFP	Yeşil Floresans Protein
FAs	Fomitellik Asit
UA	Ursalik Asit
2,4-D	2,4 diklorofenoksiasetikasit
ABA	Absisikasit

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1. DNA Replikasyonunu Başlatan Proteinler	4
1. 2. DNA Replikasyonu Esnasında Oluşan Sarılma Problemi	6
1. 3. Ökaryotlarda DNA Replikasyonu	7
1. 4. (a) Ökaryotik Hücre Döngüsü ; (b) İki Hücre Döngüsü Arasında DNA Miktarındaki Değişim	8
1. 5. Nükleozom ve Metafaz Kromozomunda DNA	10
1. 6 . Kemoterapötik Ajanların Etkilediği Bölgeler	13
1. 7. Antikarsinojenik İlaçlarının Etki Mekanizmasının Hücre Döngüsünün Evreleri İle İlişkisi	15
1.8. DNA Topoizomeraz I Enziminin İşleyiş Mekanizması	21
1.9. DNA Topoizomeraz II Enziminin İşleyiş Mekanizması	24
1.10. DNA Topoizomeraz Enzimlerinin İnhibitörleri	29
1.11. Topoizomeraz I ve II'nin Normal Aktivitelerinin Diagramatik Sunumu, Topoizomeraza Spesifik Ajanların Etkileri ve Topoizomeraz -DNA Kompleksinin İnhibisyonunun Hücresel Sonuçları	35
3.1. Doz Gruplarında Kullanılan Farklı Etoposid Konsantrasyonlarının Hazırlanması	46
4.1. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarının Büyüme Oran Histogramı	53
4.2. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarında Mitotik İndeks Histogramı	55
4.3. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomunda Çözülme (x 100)	59
4.4. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz ve Anafaz Kromozomlarında Çözülme (x 40)	60
4.5. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomlarında Fragmentasyon ve Oluşum Bozuklukları (x 40)	60
4.6. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Nükleusu Olmayan Hücreler (x 10)	61

4.7. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Nükleusun Odalara Ayrılması (x 40)	61
4.8. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Çift Nükleuslu Hücre (x 40)	62
4.9. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Geri Kalma ve Fragmentasyon (x 40)	62
4.10. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Telofaz Başlangıcında Kromozom Köprüsü (x 40)	63
4.11. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Nükleussuz Hücreler (x 40)	64
4.12. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Mikronükleus (x 40)	65
4.13. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Telofazda Fragmentasyon (x 40)	65
4.14. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Multipolar Anafazda Köprü Oluşumları (x 40)	66
4.15. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Kromozom Oluşumunda Kusurlar ve Nükleusun Odalara Ayrılması (x 40)	66
4.16. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomlarında Yapışma (x 40)	67
4.17. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Çift Nükleuslu Hücre ve Nükleusta Şekil Bozuklukları (x 40)	67
4.18. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomlarında Yapışma (x 40)	69
4.19. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Asimetri (x 40)	69
4.20. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Çift Nükleusu Bulunan Hücreler (x 40)	70
4.21. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Çok Kutuplu Uzamış Metafaz Kromozomları (x 100)	70
4.22. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Geri Kalma ve Multipolar Metafaz (x 40)	71
4.23. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Metafazda Kromozom Yapışması ve Kısılması (x 40)	71

4.24. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Kromozom Köprüsü ve Odalara Ayrılmış Çok Sayıda Hücre (x 40)	72
4.25. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomlarında Yapışma ve Kalınlaşma Kusurları (x 100)	73
4.26. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Kromozom Köprüsü ve Nükleusun Odalara Ayrılması (x 40)	74
4.27. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Metafazda Bazı Kromozomların Ekvatora Toplanamaması ve Geri Kalması (x 100)	74
4.28. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Kromozom Köprüsü (x 100)	75
4.29. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Mikronükleus (x 100)	75

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1. DNA Topoizomerez Hedefli Antitümör İlaç Sınıfları ve Yaygın Olarak Kullanılanların Adları	31
1. 2. Topoizomerez İnhibitörlerinin Etki Şekilleri	33
4. 1. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarının Büyüme Oranları	52
4.2. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarının İstatistiksel Karşılaştırılması	53
4. 3. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarında Mitotik İndeks Değerleri	55
4. 4. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarının Mitotik İndeks Değerlerinin Distile Su Kontrol Grubu İle istatistiksel Karşılaştırılması	56
4.5. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Gruplarının Farklı Mitoz Sahalarındaki Anormallik Oranları	58

1. GİRİŞ

Kanser son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan biridir. Çalışmalar bir taraftan kanserin moleküler biyolojisi üzerinde yoğunlaşırken diğer taraftan da kemoterapotiklerle ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Bu hastalık hücre çoğalmasını, büyümesini hızlandıran (onkogenler) ve hücre döngülerini yavaşlatan (tümör supresör) genlerdeki bir dizi bozulmadan kaynaklanır.

Kanserin oluşum mekanizmaları moleküler düzeyde aydınlatılmaya çalışılarak, hücre döngüsünün farklı evrelerinde müdahale şansları denenmektedir. Kanser terapisinde cerrahi ve radyoterapi gibi uygulamaların yanı sıra kemoterapide sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

Kanser kemoterapisinde çeşitli ajanlar kullanılmaktadır (Sumner , 1992). Amaç hücrenin çoğalmasını engellemektir. Çoğalmanın engellenmesi DNA'nın replikasyonu ile birlikte hücre döngüsünün çeşitli kademelerinde yer alan pek çok enzimin görevini inhibe etmekle gerçekleşir. Fakat bu inhibisyon sadece kanser hücrelerini etkilemekle kalmaz normal hücreleri de olumsuz etkiler. Antikarsinojenik ajanların normal hücreleri de etkilemesi o ajanın genotoksitesini göstermektedir. Bu noktada önemli olan antikarsinojenlerin, genotoksik etki derecelerini belirlemek amacı ile insan ve hayvan doku kültürlerinde denenmesidir.

Doku kültürü oldukça pahalı ve hassas çalışma gerektiren bir alandır. Oysa ki bazı antikarsinojen maddelerin *Allium cepa* meristematik dokularında da anormal mitotik gelişmelere neden olduğu bilinmektedir (Dayan *et al.*, 1999; Dayan and Watson, 1999).

Ayrıca bitki ve hayvan hücrelerinin genetiksel gelişiminde bir takım farklar olmasına rağmen ana mekanizma aynıdır. Bu nedenle bitkilere uygulanacak antikarsinojenik maddenin genotoksik etkilerinin memeli hücrelerine paralel sonuçlar vermesi beklenebilir (Bangı *et al.*, 1979).

Antikarsinojen ajanların genotoksik etkilerini belirlemek için bitki bioassay'lerinin kullanılması, ucuz ve kolay olması açısından doku kültüründen daha avantajlıdır.

Tüm bunların yanı sıra yüksek bitkilerde de farklı sebeplerden kaynaklanan tümörler meydana gelmektedir. Böylece hem hayvan hem de bitki hücrelerinde ortak nokta olan, kromozom materyalini teşkil eden DNA molekülünün yapısı, replikasyonu...gibi işlevler; bu tür olaylarda görev alan enzimler; bu enzimlere etki eden antikarsinojen, antiviral, herbisit (yabancı ot öldürücü) nitelikteki kimyasal maddeler önem kazanmakta ve hassasiyetle incelenmesi gerekmektedir.

1.1.DNA'nın Yapısı ve Replikasyonu

DNA, 5'→3' fosfodiester bağları ile bağlanmış iki polinükleotid zincirinden meydana gelmiş olup, sarmal yapıdadır (Watson and Crick, 1953; Crick *et al.*, 1979).

DNA molekülünün, benzerini yaparak çoğalmasına replikasyon denir. Bu noktada Watson ve Crick (1953) modelinin en büyük önemi komplementerlik ilkesiyle kalıtsal bilginin eşleme sırasında eksiksiz replikasyon mekanizmasına, fiziksel ve kimyasal verilere dayanarak bir açıklama getirmesidir. DNA zincirlerinin karşılıklı bazlarının komplementerliği ilkesinin replikasyon süresince uygulanması sonucu, baz sıralarının (ve dolayısıyla kalıtsal bilginin) doğru bir şekilde yeni DNA zincirlerine aktarılması sağlanır. Ayrıca DNA'nın replikasyonu kalıtsal bilginin, hücre

bölünmesi (mitoz) sonunda, eksiksiz olarak ve eşit paylarda yeni kuşaklara aktarılmasını mümkün kılar.

Watson ve Crick (1953) modeline göre DNA molekülü için başlıca iki replikasyon mekanizması söz konusudur:

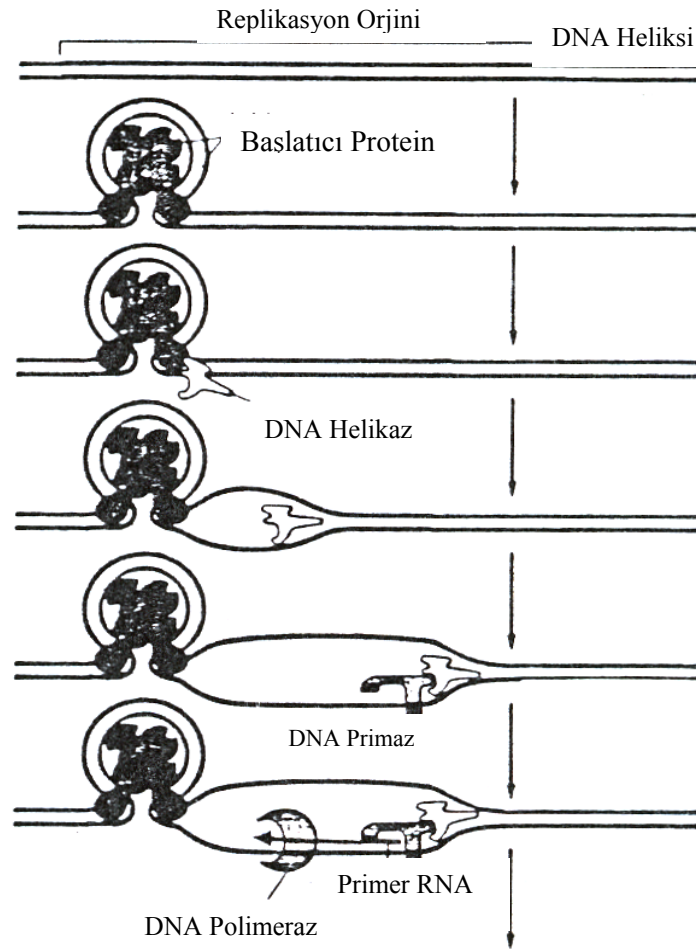
1. Koruyucu (konservatif) mekanizma; ana DNA molekülünün bütünlüğünü koruması koşuluyla onun eşi ikinci bir DNA molekülü oluşur.
2. Yarı koruyucu (semikonservatif) mekanizma; replikasyon sırasında DNA molekülünün iki zinciri birbirinden ayrılarak her bir zincir üzerinde ana tamamlayıcı olan (komplementer) yeni zincir oluşur.

DNA Replikasyonu pek çok proteinin birlikte çalışmasını gerektirir. Bunlar;

1. Nükleozid trifosfat polimerizasyonunu katalize etmek için “DNA primase” ve “DNA polimeraz”,
2. Kopya edilebilmesi için DNA heliksinin açılmasına yardım eden “DNA helikaz” ve “single-strand binding proteinler”ler ,
3. Kesikli sentez edilmiş geciken-zincir DNA fragmentlerinin aralarını kapatmak için RNA primerlerini yıkan bir enzim ve “DNA ligaz”,
4. Karışıklık problemlerini ve helikal sarılmaları serbest bırakmak için “**DNA Topoizomeraz**”lar,
5. Bir replikasyon orjiniinde spesifik DNA sequenslerine bağlanan ve bu bölgede bir replikasyon çatalının oluşmasını katalize eden “başlatıcı proteinler” dir.

İlk olarak DNA’da replikasyon çatalının başladığı yerde bir “orjin” noktası bulunmaktadır. Sentezin başlayacağı bu orjin “spesifik” hücre proteinleri tarafından tanınmakta ve replikasyon bu noktadan başlamaktadır. Replikasyon çatalında DNA sentezinin başlaması için DNA çift sarmalın açılması gerekir. “Helikaz” enzimi, DNA çift sarmalında her bir baz çiftinin birbirinden ayrılması için DNA üzerinde ilerler .

Açılan çift ipliğin tekrar birleşmesini engellemek amacıyla “single-strand proteinler” kesikli sentez edilen DNA ipliğine bağlanır. Bu aşamada “DNA Binding” proteinler görev alır. DNA sentezinin başlaması için bir primer RNA gerekmektedir ve bunu sentezlemek için “DNA primaz” helikaz enziminin arkasına yerleşir. “DNA polimeraz” enziminin de eklenmesiyle replikasyon için gerekli enzim kompleksi tamamlanmış olur (Şekil 1.1.).



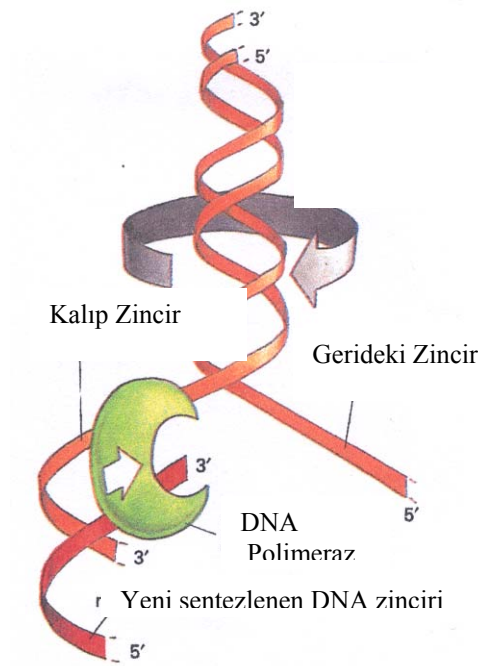
Şekil 1. 1. DNA Replikasyonunu Başlatan Proteinler (Alberts, 1994).

DNA replikasyonunda önemli bir problem DNA'nın helikal yapısından kaynaklanan sarılma problemidir (şekil 1.2.). DNA'nın yapısındaki iki polinükleotid zinciri birbirlerinin ve ortak bir eksenin etrafında sarılarak sağa

doğru dönen bir heliks meydana getirirler. Fakat tabiatta bulunan DNA moleküllerinin bir çoğu bu yapıdan farklı olarak halkasal şekildedirler. Serbest 3' veya 5' uçları yoktur. Bakteri, mitokondri, kloroplast ve bazı virüslerdeki DNA'lar böyle halkasal moleküllere örnektir. Ökaryotlardaki doğrusal (lineer) DNA ise yoğunlaşma (kondansasyon) sırasında meydana gelen birbirleri üzerine katlanmalardan (helezonlaşmalarından) dolayı halkasal bir hal alırlar. İşte bu halkasal DNA molekülleri doğrusal DNA'dan farklı olarak süper dönüm yaparlar. Süper dönüm oluşması DNA molekülünün birbiri üzerinden geçen bir çok ilmekler vermesi demektir.

Çift zincirli halkasal DNA kendi eksenine göre açılacak şekilde çevrilirse negatif süper dönüm, burulacak şekilde çevrilirse pozitif süper dönüm meydana gelir. Negatif süper dönüm oluşmasına doğal DNA'da rastlanır. Bunlarda süper dönüm sağa doğru döner. Pozitif süper dönümlere doğada rastlanmaz, bunlar sola doğru dönerler. Süper dönüm oluşması çok büyük DNA'ların kendilerini çok küçük hacimlerde paketlemelerini sağlar. 3' veya 5' uçları açıkta kalırsa doğrusal DNA molekülleri süper dönüm yapamaz.

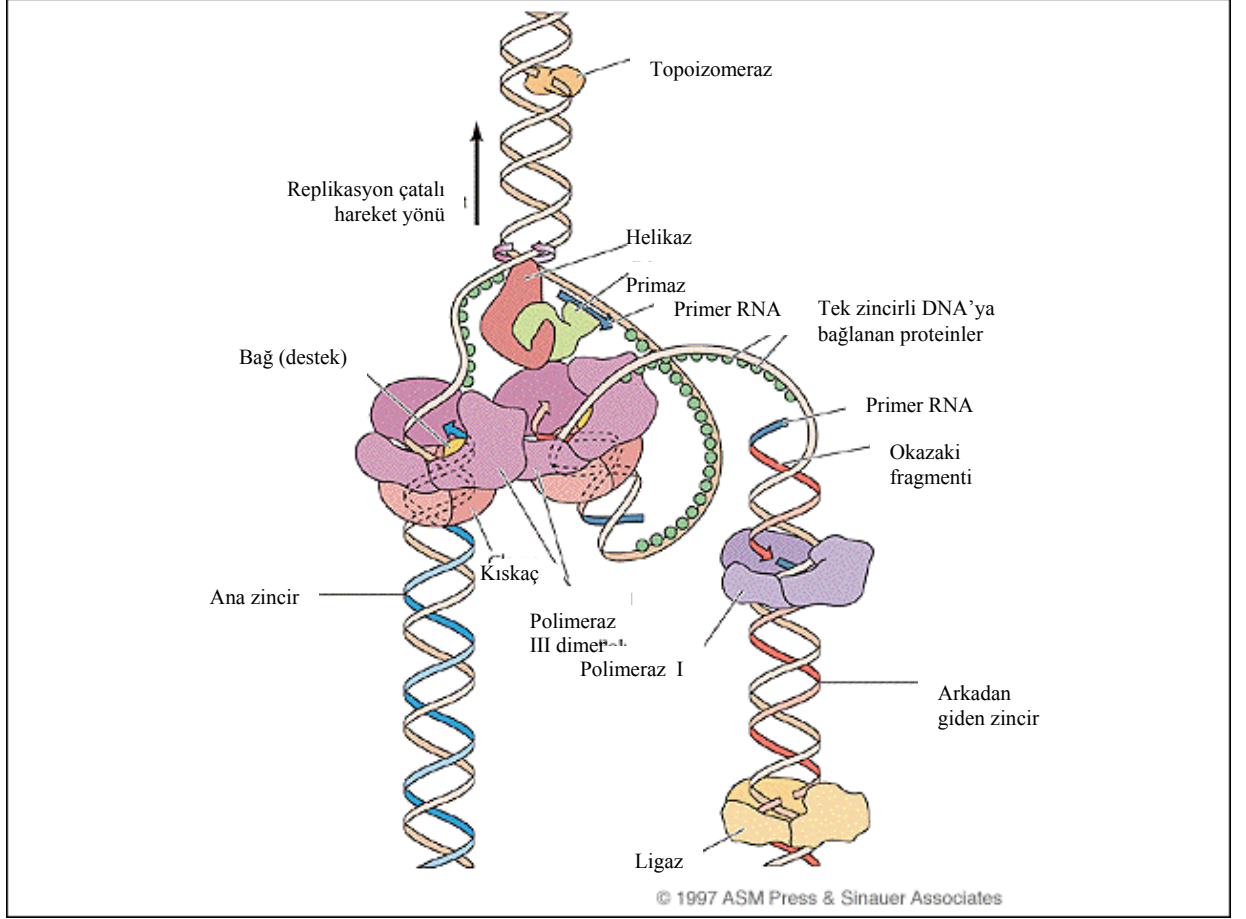
Süper dönüm yapmış DNA'nın replikasyon çatalında her 10 baz çifti, DNA sarmalının komple bir dönüşüne denk gelir. Bu nedenle bir replikasyon çatalının hareket etmesi için hızla rotasyon olması gerekir. Böylece süper dönüm yapısına sahip bir DNA molekülünde bazı mekanik problemlerin ortaya çıkacağı düşünülebilir. Öncelikli olarak negatif süper dönümlerin giderilmesi için DNA'daki lokal replikasyon bölgesinde bulunan zincirler aralanmalıdır. Böyle bir durum replikasyon kadar transkripsiyon içinde heliksin açılmasını, olay sırasında görev alacak enzimlerin işlemlerini kolaylaştırır. Fakat uzun kromozom kolları için bu, çok fazla enerji harcanması demektir (Stryer, 1994).



Şekil 1. 2. DNA Replikasyonu Esnasında Oluşan Sarılma Problemi (Alberts,1994).

DNA üzerindeki zincirleri aralamak, kırıklar oluşturmak ile kromatin ipliğinin açılması ve replikasyonun sağlanması için alternatif yolda “Topoizomeraz” enzimleri görev yapmaktadırlar (Wang, 1985; Wang, 1996) (Şekil 1. 3.).

Eukaryotik hücre DNA’ları kromatin iplikçikleri boyunca nükleozom adı verilen yapılarda özel organizasyona sahip oldukları için DNA sentezinin binlerce orijin noktasından aynı anda başladığı ve bu sentezin iki yöne doğru devam ettiği bilinmektedir.

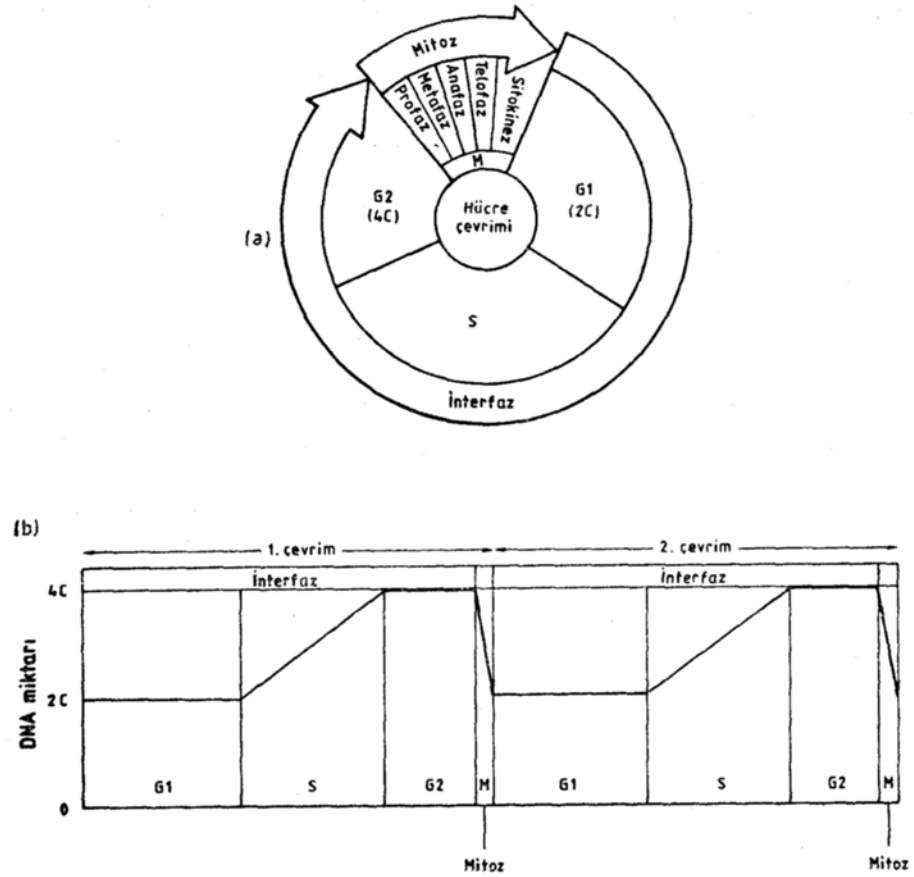


Şekil 1. 3. Ökaryotlarda DNA Replikasyonu (Cooper, 1997)

1.2. Hücre Döngüsü ve Mitotik İndeks

1.2.1. Hücre Döngüsü

Her hücrenin yaşam süresinde bölünme olmayan uzun bir interfaz evresi ile bir bölünme evresi (mitoz bölünme) vardır (şekil 1. 4.). Buna hücre döngüsü, hücre periyodu da denilmektedir. Hücre döngüsü her hücre tipinde farklı sürede ve farklı şekildedir. Bu döngü içinde değişik olayların yer aldığı farklı evreleri mevcuttur.



Şekil 1. 4. (a) Ökaryotik Hücre Döngüsü ; (b) İki Hücre Döngüsü Arasında DNA Miktarındaki Değişim (Temizkan,1999).

G1 evresi : Senteze hazırlık dönemidir. Mitoz sonucu oluşan oğul hücrelerde, daha sonraki bölünmeye hazırlık olması için, yeni DNA zincirinin yapı taşlarının sentezi, RNA sentezi ve diğer işlemler ile ilgili enzimlerin yapıldığı, DNA replikasyonuna hazırlık dönemidir. Süresi kanser hücrelerinin çoğalma hızına göre değişir.

S evresi : DNA'nın sentez ve replikasyon dönemidir. Hücre metabolizması en aktif dönemindedir. RNA sentezi devam eder, protein sentezi ise maksimum seviyededir. Hücre bu dönemde antimetabolik ilaçlara çok duyarlıdır.

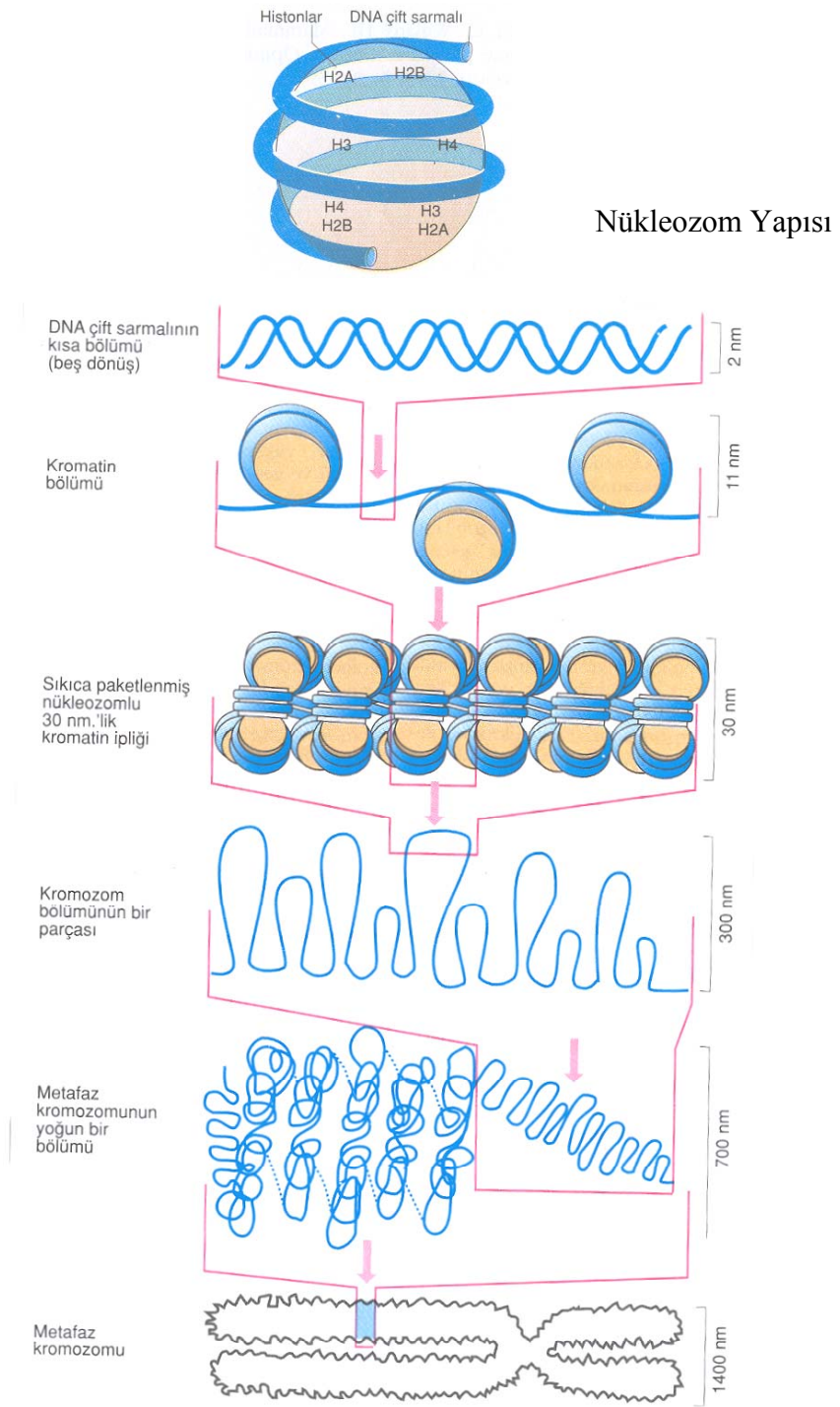
G2 evresi : Mitoza hazırlık dönemidir. DNA sentezi durur. Fakat mitotik iplikçiklerin oluşması için özel m-RNA'ların ve bunlara uyan proteinlerin sentezi devam eder. Bu dönemde tamir olayları önemlidir, metabolik aktiviteler azalmış durumdadır ve dönem sonunda mitoz başlar.

M evresi : G2'yi takiben mitozun meydana geldiği dönemdir. Mitozda profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhaları gerçekleşir.

Organizmanın tüm hücreleri aynı zamanda mitotik aktivite göstermezler. Bir kısmı, uzun ya da kısa bir süre dinlenmede kalmaktadır. Bu dinlenme evresi G₀ olarak tanımlanır. G₀ evresinde olan , yani bölünme potansiyeline sahip fakat bir süre için bölünmeyen hücreler, tümör kitlesinin hücre havuzunu oluşturabilirler.

G1 evresindeki diploid (2C) kromozom sayısı DNA sentezinden sonra iki katına (4C) çıkmaktadır. İnterfazda DNA'sı iki katına çıkmış olan kromozomlar uzunluğuna olarak iki kromatide ayrılır ve bunlardan her biri yavru hücrelere giderler.

Dikkat edilmesi gereken nokta hücre bölünmesi başladığında kromatin iplikçikleri ilmekler yaparak yapılarını yoğunlaştırır ve kromozomlar meydana gelir (şekil 1. 5.). Örneğin bir metafaz kromozomundaki DNA başlangıçtaki boyuna göre yaklaşık 5000 kat kısalmış durumdadır. Yapılan çalışmalarda böyle bir organizasyon için histon ve histon olmayan proteinlerin büyük rolünün olduğunu fakat bunlar yok edilse dahi çıplak DNA'nın metafaz kromozomlarının iç kısmını oluşturan protein yapıdaki bir iskelete tutunmuş durumda kaldığı gözlenmiştir. İskelet proteinleri toplam kromatin proteinlerinin %1'ini kapsar. Bunlar arasında en iyi tanınmış olanlarından biri **Topoizomeraz**lardır (Cook, 1995).



Şekil 1. 5. Nükleozom ve Metafaz Kromozomunda DNA (Passarge, 1995)

Ayrıca hücre döngüsü her canlıda farklı olduğu gibi aynı canlının hücrelerinde sıcaklığa bağlı olarak da değişebilmektedir (Grant, 1982). Örneğin *Allium cepa* için bu değerler birkaç araştırmacı tarafından 19°C'de 20,5 saat (Nutti and Arcara, 1967), 20°C'de 18,8 saat (Lopez and Gimenez, 1966) ve 21°C'de 23 saat (Matagne, 1968) olarak belirlenmiştir.

1.2.2. Mitotik İndeks

Mitotik İndeks (MI), mitotik aktiviteyi yani hücrelerin bölünme oranını ifade eder. Mitotik indeks değişik şekillerde hesaplanmakta ise de genellikle 100 hücreye düşen mitoz sayısı olarak kabul edilmiştir.

Bazı hastalıklar, enfeksiyonlar, kemoterapide kullanılan antineoplastik ajanlar (Topoizomeraz inhibitörleri) ve doğum kontrol hapları mitotik indeksin düşmesine yol açar.

1.3. Kemoterapi ve Antineoplastik Ajanlar

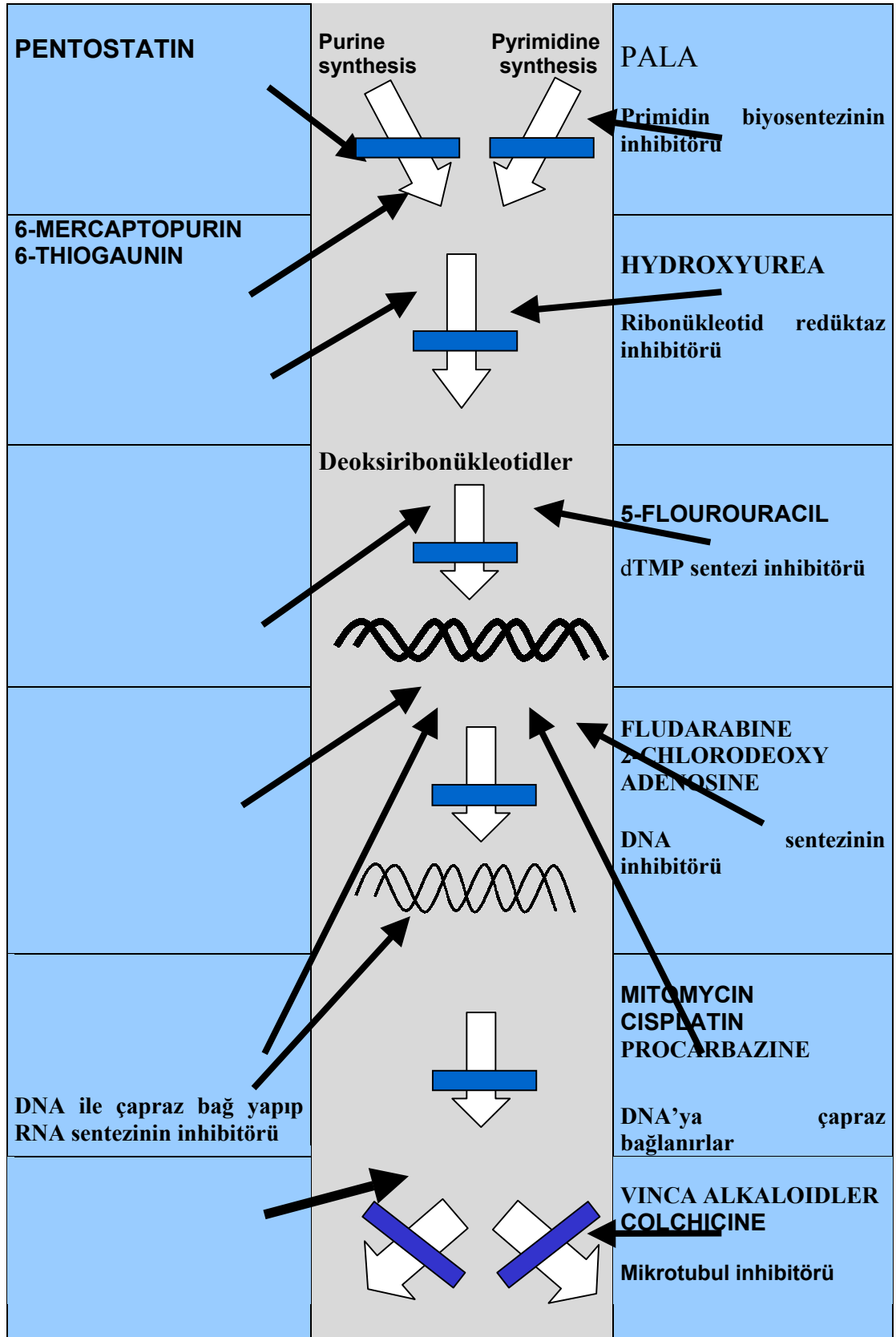
1.3.1. Antineoplastik Ajanların Hücre Döngüsüne Etki Mekanizması

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize öldürücü bir hastalıktır. Bugün tıpta bilinen 80'i aşkın antineoplastik ajandan 50 kadarı kemoterapi alanında kullanılmaktadır. 1940'larda antimetabolitler, 1950'lerde kortikosteroidler, busulfan, cycluphoshamide ve takiben diğer antikanser ilaçlar bulunup kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda antikanser ilaçlarının etki mekanizmasının bilinmesi ve kanser hücre kinetiğinin öğrenilmesi kemoterapötik ajanların daha bilinçli bir tarzda kullanılmasını sağlamıştır.

Antineoplastik ilaçlar patolojik bir şekilde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi hızlı bir şekilde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok edebilirler. Ayrıca bu ilaçların mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri de vardır. Bu nedenle antineoplastik kemoterapinin ana ilkesi, normal hücrelere zarar vermeksizin tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya onları yok etmektir. Kanserli bir hücreyle normal bir hücreyi birbirinden ayıran spesifik bir karakter olmamasına karşın, genetik, metabolik, kinetik ve membran farklılıkları ayırt edilebilmektedir. Antikanser ilaçların hedefi olan selektif bir şekilde tümör hücresini öldüren antikanser ilacı bulunamamıştır. Normal hücreye en az düzeyde etki yapan ilaç, kanser kemoterapisinde ideal ilaçtır. Kullanılan ilaçların hedefi daha çok DNA sentezi veya fonksiyonlarıdır. En büyük antitümör etkilerini hücre döngüsü içinde DNA sentezine giden hücreleri inhibe etmek suretiyle yaparlar (Del Bino, 1990).

Çoğalma durumundaki tümör hücreleri üzerinde antikanser ilaçların çoğunun etki yerleri bilinmektedir, buna göre sınıflandırılmaları da şu şekildedir;

1. Nükleik asit biyosentezinin inhibisyonu
2. Nükleik asit yapısının bozulması
3. Protein sentezinin inhibisyonu
4. Mitozun inhibisyonu
5. Hormonal çevrenin değişmesi (şekil 1. 6.)



Şekil 1. 6 : Kemoterapötik ajanların etkilediği bölgeler (Goodman and

Gilman, 1994).

Kemoterapide kullanılan ilaçlar hücre döngüsü fazlarından birinde veya birkaçında etkili olmaktadır. Buna bağlı olarak da bu ajanlar üç büyük grupta toplanırlar (şekil 1. 7.).

1. Hücre döngüsüne özgül etkisi olan ajanlar:

Hücre döngüsüne spesifik etkisi olan bazı ilaçlar toksik etkilerini döngünün herhangi bir evresindeki hücreler üzerinde gösterirler. Fakat G0 gibi dinlenme periyodunda olan hücreler üzerinde bir etkileri yoktur. Normal ve kanserli hücreler aynı derecede etkilenirler. Karmustin ve Mekloreタミン bu gruba giren ilaçlardır.

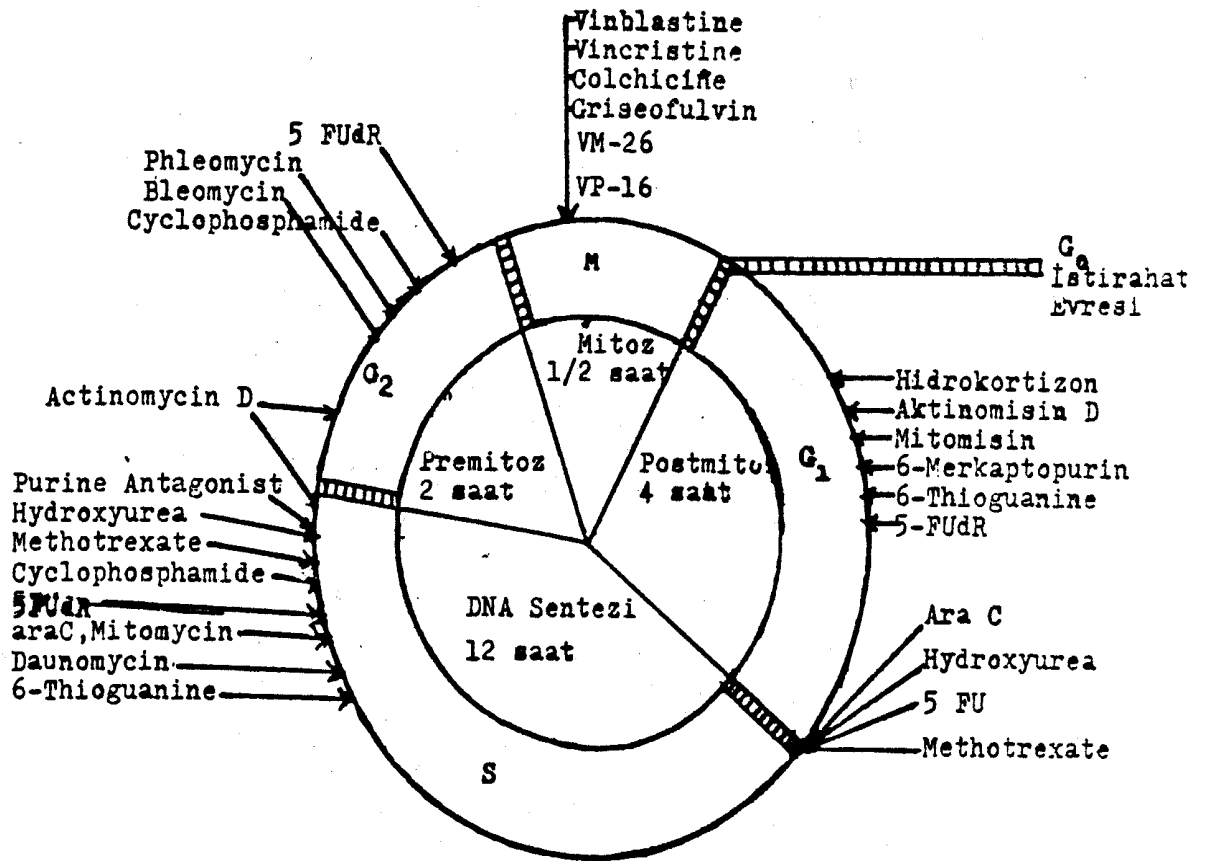
2. Hücre bölünme fazına özgül etkisi olan ajanlar:

Faz bağımlı ya da evreye özgü antikarsinojenik ilaçlar ise sadece o fazda bulunan hücreye etkilidir. Örneğin; antimetabolitler S evresinde, mitoz zehirlerinden Vinkristin M evresinde ve **Etopozid (VP-16)** S sonu ve G2 evresindeki hücrelere etkilidirler.

3. Hücre döngüsüne özgül etkisi olmayan ajanlar:

Hücre döngüsüne spesifik olmayanlar ise hem çoğalan hem de dinlenme halindeki hücrelerin tümüne toksik etkide bulunurlar. Mitomycin, Chlorombusil bu gruba giren Antineoplastiklerdendir.

Bazı ilaçlar da (Metotreksat, 5-Fluorourasil, Merkaptopürin) maksimal sitotoksik etkilerini S evresindeki hücrelerde gösterirken aynı zamanda hücrenin S evresine girmesine de engel olurlar. Böylece sitotoksik etkilerini azaltırlar. Bu antikarsinojenik ilaçlar S evresinde DNA sentezini inhibe ederler, fakat G1 ve G2 evrelerinde de RNA sentezini inhibe ettiklerinden, bu evrelerden S evresine geçişi geciktirerek kendi sitotoksik etkilerini sınırlarlar. Bu tip ilaçlara S evresine özgü ancak kendini kısıtlayan ilaçlar adı verilir.



Şekil 1. 7. Antikarsinojenik ilaçlarının Etki Mekanizmasının Hücre Döngüsünün Evreleri İle İlişkisi (Sipahioğlu, 1981)

1.3.2. Antineoplastik Ajanların DNA Üzerine Etki Mekanizması

A. Alkilleyiciler:

Alkilleyiciler DNA çift zincirinde birden fazla noktaya kovalent bağla bağlanmak suretiyle DNA molekülünü alkilerler. Bu bağlanma, bir purin bazı olan guaninin 7 sayılı azot atomu üzerinden olur. Guanininin 7N'den alkilenmesi asiditeyi arttırır. Molekülde oluşan söz konusu gelişme, onun Sitozin yerine Timin ile baz çifti yapmasını teşvik eder. Oluşan “anormal baz çifti” genetik kodun yanlış okunmasına yani replikasyon ve transkripsiyon sırasında Guanin’in Adeninmiş gibi okunmasına neden olur. Bu olay yeni DNA zincirinde ve mRNA moleküllerinde önemli bozukluklara yol açar. En önemlisi ilaç iki ayrı zincir arasında köprü yapar, (çapraz bağlanma “intercalation”) bu durumda DNA’nın replikasyonu mümkün olmaz.

B. Bitki Alkaloidleri:

Bu maddeler hücre bölünmesini mikrotubul oluşumunu inhibe ederek mitozda durdurur ve hücrenin ölümüne yol açarlar. Vincristine, Vinblastin gibi Vinca alkaloidleri bu gruba dahildir.

C. Antibiyotikler:

Bunlar genellikle Streptomyces grubu mantarlardan elde edilmişlerdir. DNA molekülünün bazlar arasına girerek replikasyona engel olmak suretiyle tümör hücreler üzerinde etkili olduğu gibi (Actinomycine-D) DNA’ya bağlanarak mRNA yapımını engelleyerek de etki gösterirler (Daunorubicine, Doxorubicin, Mithramycin).

D. Antimetabolitler:

Bu grup ilaçlar etkilerini DNA sentezini etkileyerek gösterdiklerinden, aktiviteleri hücre döngüsünün S evresindedir. Methotrexate pirimidin ve pürin sentezini durdurur. 6-Mercaptopürin ve 6-Thioguanine pürin sentezini, 5-Fluorourasil pirimidin sentezini inhibe eder. Cytosine arabinoside, gerek sitidilik asidin indirgenmesini, gerekse DNA-polimeraz enzimini inhibe ettiğinden hücre ölümüne sebep olur.

E. Enzimler:

En sık kullanılan L-Asparaginaz (L-Asp)'dır. Asparagin essential bir aminoasittir. Tümör hücreleri L-asparagin kullanamaz. Bu nedenle enzim, Asparagini Aspartik aside hidroliz ederek Asparagin sentezi yapamayan hücreleri , ekstrasellüler asparagin depolarını ortadan kaldırarak öldürür. Böylece protein sentezi bozulur. RNA ve DNA'nın sentezleri engellenmiş olur. L-asparaginaz hücre döngüsünün postmitotik evresi (G1)'ne etki yaparak zararlı olur.

F. Hormonlar :

Bazı tümör hücrelerinin hormonal mikro çevresini bozarak bunların çoğalmasını engellerler. Bu gruba giren ilaçlardan bazıları Tamoxifen, Mafoxidin, Prednisol'dur.

G. Mitoz İnhibitörleri:

Faza spesifik olan bu ilaçların hücre öldürücü etkisi, bunların mikrotubuler proteinlere bağlanarak, DNA bağımlı enzimleri inhibe edip, sentezlerini durdurmalarıyla gerçekleşir. Bunlara örnek: **Etoposid**, Teniposide, Vinblastine, Vindesine.

H. Nitrosoüre Grubu:

Bu ilaçların etkisi DNA ve RNA'nın alkillenmesi, amino asitler ve proteinlerin karbomil transferasyonu şeklindedir. Böylece DNA yenilenmesi imkansız hale gelir. Bunlara örnek: Bischloroethyl, Nitrosourea, Streptozotocin.

I. Çeşitli Sentetik Ajanlar:

Bunlar çeşitli etkilere sahip maddelerdir. DNA'yı inhibe ederek pürin ve protein ile RNA sentezini inhibe ederek hücre ölümüne sebep olurlar. Bunlara örnek: Dibromomannitol, Hydroxyurea, Mitotane, Hexamethyl-melanine.

1.4. Topoizomeraz Enzimleri ve İnhibitörleri

1960'lı yıllardan önce DNA'nın yapısının sadece doğrusal olduğu düşünülürken çift zincirli halkasal genetik materyalin de doğada var olduğu keşfedildi (Crick *et al.*, 1979) . Bu keşif DNA'nın yapısal (topolojik) problemlerinin farkına varılmasında öncülük etti. Yapısal problemler başlangıçta sadece halkasal materyaller için söz konusu olsa da DNA'nın boyu uzun olduğu için yapısındaki helezonlaşmalardan dolayı artık düzlemsel (lineer) genomda da etkili olduğu bilinmektedir.

Bakterilerdeki DNA'nın yapısal problemi halkasal olması , ökaryotlardaki DNA'nın yapısal problemi de oluşturduğu büyük ilmeklerin bir arada tutulmasıyla helikal yapıya benzemeleridir. Bu da DNA'nın üçüncül (tersiyer) yapısındaki süper dönümlerle meydana gelmiş kıvrımlarıdır (sarılma problemi). Süper dönümler, çift zincirli uzun DNA molekülünün kendi eksenini etrafında bükülmesiyle olur. Her bükülüşte bir süper dönüm kıvrımı meydana gelir.

Negatif süper dönümler çift sarmaldaki zincirlerin çözümlerini (dekondensasyonunu) sağlar, böylece zincirlerin ayrılmasına yardım eder. Pozitif süper dönümler ise çift sarmaldaki zincirlerin birbirlerine yaklaşım yoğunlaşmalarını (kondensasyonunu) sağlar ve daha sıkı bir sarılma meydana gelir.

Hücrede replikasyon yapılacağı zaman yoğunlaşmış DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması, replikasyon çatalının önündeki çift sarmalın aşırı sarılı durumda olması gibi yapısal problemlere biyolojik çözüm ilk olarak 1971'de James Wang'ın *Escherichia coli*'de çok bükümlü superhelical DNA'yı daha az bükümlü forma dönüştürebilen bir enzimi saflaştırmasıyla ortaya çıktı

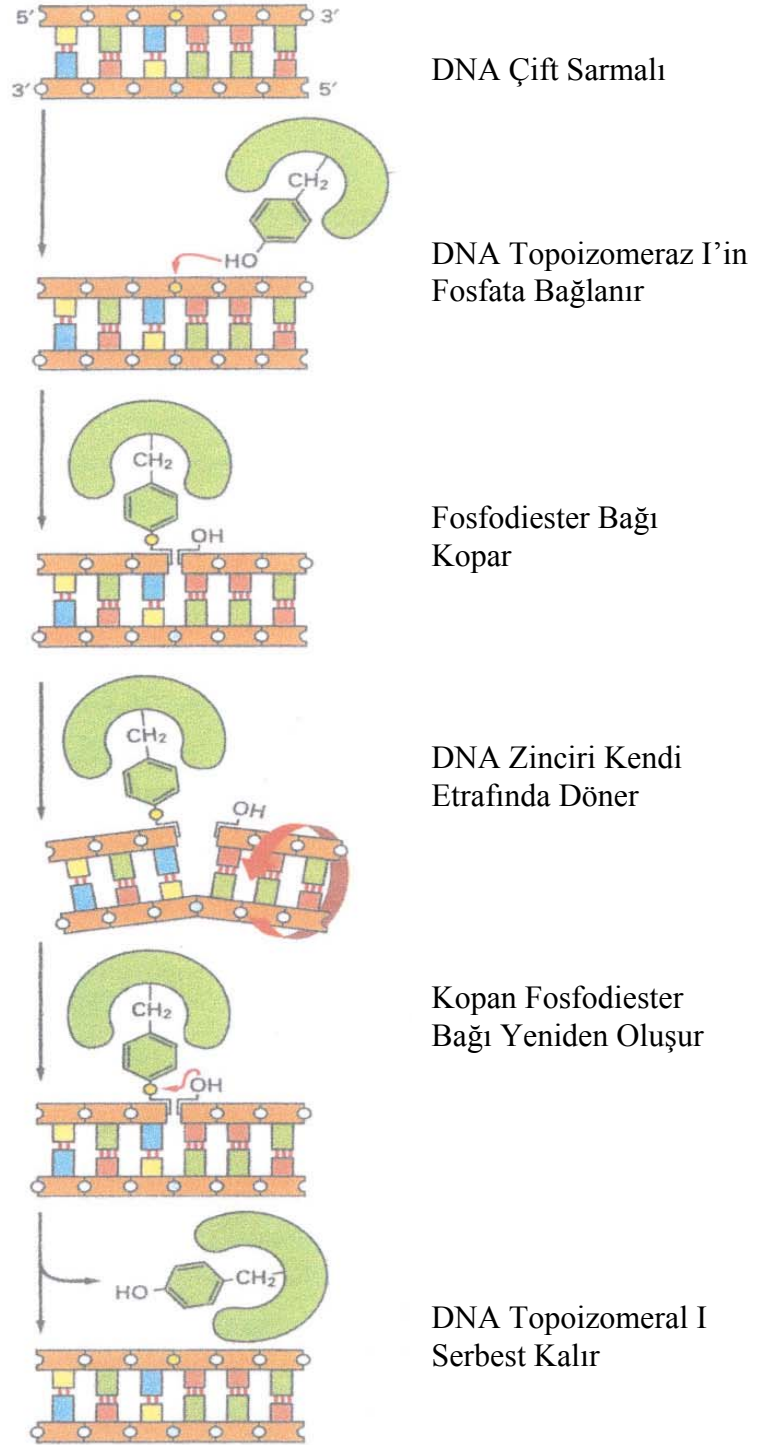
(Wang, 1971). Wang' ın yapmış olduğu bu çalışma Topoizomeraz aktivitesinin bilinen ilk ifadesidir.

DNA molekülünün yapısal izomerlerinden birini diğere dönüştüren, üçüncül (tersiyer) yapıdaki konformasyonu düzenleyen çekirdeğe özgü enzimlere Topoizomerazlar denir (Gellert, 1981; Sequires, 1991; Berger *et al.*, 1998; Kornberg, 1992). Genetik sözlüğüne göre, daha önceleri, “gevşeten ” (DNA relaxing) , “çeviren - döndüren ” (swivelase), “çentik açıp kapatan ” (nick-closing), “karışıklığı çözen ” (untangle) ve “burgu açan” (untwisting) enzim olarak adlandırılmaların yerine artık “Topoizomeraz” terimi kullanılmaktadır (King and Stans, 1990) . Topoizomerazlar için , Osheroff (1998) “diğer hiçbir sınıf enzim, genetik materyalin günlük yaşamında bu kadar çok çeşitli ve geniş sorumluluk taşımaz” diye belirtmektedir.

Topoizomerazlar 2 gruba ayrılmaktadır. Topoizomeraz I, DNA'nın fosfodiester bağlarında geçici tek iplik kırıkları; Topoizomeraz II ise fosfodiester bağlarında geçici çift iplik kırıkları oluşturur (Şekil 1.8. ve 1.9.). Bu enzimler ökaryotlarda DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda rol oynar (Wang, 1985 ; Wang, 1996) .

1.4.1. DNA Topoizomeraz I :

Çift heliksi oluşturan sarmallardan birini tersinir olarak koparırlar. Hem nükleaz (zincir koparma) hem de ligaz (zincir bağlama) aktiviteleri vardır. Topoizomeraz I DNA'nın yarılmış fosfodiester uçlarını biraraya getiren reversibl bir nükleaz gibi hareket eder. DNA zincirinde fosfodiester bağının yarılmasını da gerçekleştirir. DNA'nın fosfatına Topoizomerazın bağlanmasıyla yarılan fosfodiester bağının enerjisini elinde tuttuğu için yarılma reaksiyonu (cleavage reaction) geriye dönüşümlüdür. Çentiğin kapanması hızlı olur ve ek bir ATP harcanmasını gerektirmez (Şekil 1.8.).



Şekil 1. 8. DNA Topoizomerez I Enziminin İşleyiş Mekanizması

(Alberts, 1994)

Topoizomeraz I, geçici tek iplik kırığına (= çentiğe, yarığına) neden olur. Bunu yaparken ATP'ye bağımlı değildir. Birbirine bağlı olarak çentiğin bulunduğu yerde her iki ipliğin serbestçe rotasyonuna izin verir, bir fırdöndü noktası gibi çentiğin karşısındaki fosfodiester bağı kullanılır. DNA heliksinin geriliminden kurtulması için birikmiş olan süper dönümler rotasyon ile açılır. Böylece DNA replikasyonu çatalın biraz önünde yalnız kısa bir heliks parçasının rotasyonu ile oluşabilir. DNA transkripsiyonu esnasında karşılaşılan benzer problemler de bu yolla çözülür (Potmesil, 1988 ; Shin, 1990 ; Zucker, 1991) .

Tip I Topoizomerazlar *E.coli*'de sadece negatif süper dönümleri açarken (Berger et al., 1998) ökaryotlarda hem negatif hem pozitif süper dönümleri açarlar (Wang, 1996).

1.4.2. DNA Topoizomeraz II :

DNA'nın replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon gibi işlevlerinin doğru gerçekleşmesi hayatın devamlılığı açısından önem arz etmektedir. DNA'nın bu işlevlerinde görev alan birçok enzim olmasına rağmen önemli rolü olanlardan biri de Topoizomeraz II enzimidir. Kısaca Topoizomeraz II, hücrenin çoğalması için gereklidir (Uemura and Yanagida, 1984; Holm *et al.*, 1985).

Bu enzimler DNA çift heliksine sıkıca bağlanır ve her iki sarmalda geçici olarak çift iplik kırıklarını oluştururlar. Topoizomeraz II, Topoizomeraz I'den farklı olarak ayrıca ATP'ye ihtiyaç duyar (Wang, 1985; Potmesil, 1988; Shin, 1990; Preston , 1990; Vizan , 1991; Zucker, 1991).

DNA Topoizomeraz II enzimlerini iki çift sarmalın birbiri üzerine denk geldiği yerdeki kromozom bölgeleri aktive eder. Böyle bir çaprazlaşmış bölgeye Topoizomeraz II bağlandığında;

- DNA'da bir geçiş oluşturmak için çift sarmal geçici olarak kırılır,
- Bu kırıktan diğerk çift sarmal geçer,
- Kırık tekrar kapanır ve Topoizomeraz II DNA'dan ayrılır.

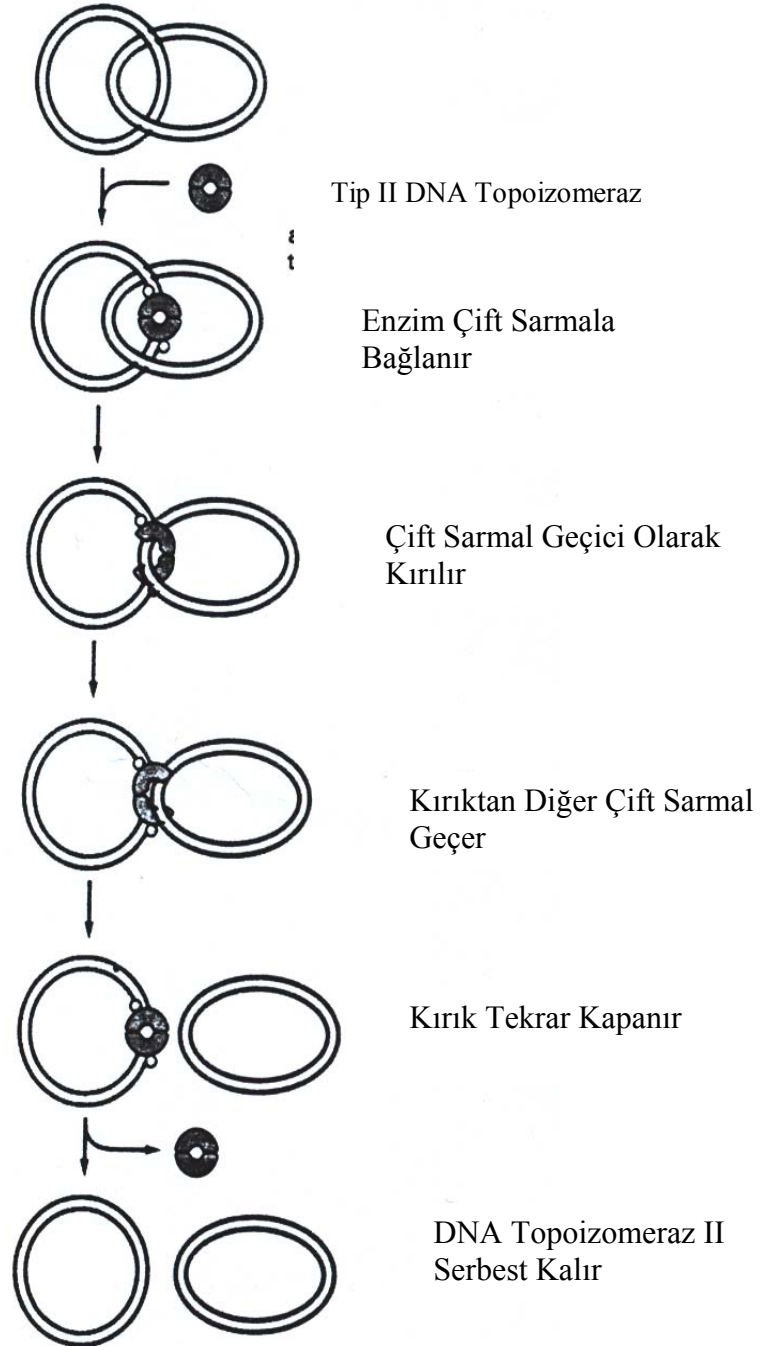
Bu yol ile bağlanmış iki DNA halkasının ayrılması Topoizomeraz II etkisiyle gerçekleşmiş olur (Wang *et al.*, 1992; Wang and Roca, 1994; Wang, 1996) (şekil 1. 9.) .

Ayrıca Topoizomeraz II, DNA replikasyonu esnasında sarmalların i içe girerek karışıklık oluşturabileceği yapısal problemleri engeller. Mutant maya hücrelerinde normal Topoizomeraz II'nin yerine 37° C'de inaktive olmuş hali kullanıldığında, Mutant maya hücreleri kromozomlarının mitozda hala birbirine sarılmış olarak kaldığı ve ayrılmadığı görülmüştür (Albert, 1994). Bu çalışmaya bağlı olarak denilebilir ki; karmaşık bir düğümü açmak nasıl imkansızsa, Topoizomeraz II enzimi olmadan karışmış kromozomları ayırmak da o kadar imkansızdır.

DNA Topoizomeraz II, özellikle mitotik kromozom yoğunlaşması ve ayrımı için gereklidir. Topoizomeraz II DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatidlerin DNA zincirleri arasındaki adeta düğüm haline gelmiş DNA sarmalında ki yoğunlaşmaların çoğu, kardeş kromatidleri bir arada tutanlar hariç, mitoz bölünmeden önce çözülmelidir. Yoksa kromozomlar bireyselleşemez ve sonra da doğru olarak ayrılamaz (Wang, 1985).

Kromozomların ana hücreden yavru hücrelere doğru iletilebilmesi için DNA'nın replikasyonunun tam ve düzgün olması gerekmektedir. Kromozom ayrımı sadece replikasyon sonucu oluşmuş kardeş kromatidler arasındaki DNA i bağlarının kopmasından etkilenir. Çift zincirli DNA moleküllerini çözme (dekondanse) yeteneği ile replikasyonu yapılmış kromozomların ayrılmasını katalizleyen enzim olan Topoizomeraz II, iyi korunmuş homodimerik, çekirdek proteinidir. Hem mayozda, hem de mitozda

kromozomların ayrılması için gereklidir (Cozzarelli, 1990; Wang *et al.*, 1990)



Şekil 1. 9. DNA Topoizomeraz II Enziminin İşleyiş Mekanizması
(Alberts, 1994)

Biyolojik önemi olan birçok fonksiyondan sorumlu olan DNA Topoizomeraz II enzimi DNA'nın hücre döngüsü boyunca geçirdiği yapısal değişikliklerin kontrolünden de sorumludur (Markovits, 1987). Erken mitozda kromozomların yoğunlaşması (Hsiang, 1988), geç mitozda kromatidlerin ayrılması (Holm et al., 1989), G1 evresinde çözülme (Musk, 1990), S evresi süresince replikasyon (Koshl, 1996), G2 evresini takiben çözülme ve gen ekspresyonuna özgü bölgelerin çözülmesinde görev alır (Gangloff et al., 1999).

Ökaryotik kromozomların kromatin ipliğinin bölgesel iplikler halinde organize olduğu ve bunların da kromozom yapılanmasını gerçekleştiren bir seri çapraz bağ proteini tarafından birarada tutulduğu düşünülmektedir. Metafaz kromozomlarının yapısal bütünlüğünü sağlayan bu yapı iskelet proteinleri SC1 ve SC2 adı verilen yüksek molekül ağırlıklı iki proteindir (Lewis and Laemmli, 1982) . Bunlardan SC1 Topoizomeraz II olarak tanımlanmıştır. (Earnshaw et al., 1985; Gasser et al., 1986)

Scaffold-associated regions (SAR) adı verilen DNA elementleri AT'den zengin bölgelerdir (Paulson, 1977). Topoizomeraz II bu bölgelere özellikle bağlanmaktadır. SAR bölgeleri kromozom yoğunlaşması için gereklidir (Earnshaw et al., 1985) .

Topoizomeraz I, Topoizomeraz II'nin aksine hücre döngüsüne bağlı bir enzim değildir. Hücre gelişiminin farklı evrelerinde değişikliğe yol açmaz, bu nedenle antineoplastik ilaçların geliştirilmesinde Topoizomeraz II'den daha fazla hedef olarak kullanılırlar (Shinha, 1995).

Lösemi hastalarının kan hücrelerinde normale göre daha fazla Topoizomeraz II aktivitesi vardır. Ayrıca Topoizomeraz I ve Topoizomeraz II aktiviteleri birçok tümör dokusuna kıyasla yumurtalık tümör dokusunda daha yüksektir (Dingemans , 1998) .

Topoizomeraz II inhibitörleri kemoterapiden başka uygulama alanlarına da kaymaktadır. Nitekim virüslerin kodladığı en küçük Topoizomeraz II'nin bulunmasıyla (Oleg, 2000) Topoizomeraz II aktivitelerinin alanı ökaryotik virolojiye doğru genişlemiştir. Ökaryotik Topoizomeraz II sınıfı enzimlerinin genel özellikleri bu en küçük üyenin karakterize edilmesiyle ortaya çıkmıştır.

Topoizomeraz II bütün ökaryotlarda varolan bir enzimdir (Holm *et al.*, 1985). Buna bağlı olarak, bitkilerde de Topoizomeraz II enzimleri biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Carballo *et al.*, 1991; Kieber *et al.*, 1992; Moreno and Espina, 1995). Ayrıca Topoizomeraz II genleri bazı *Pisum* ve *Arabidopsis* bitki türlerinden izole edilmiş (Reddy *et al.*, 1999; Xie and Lam, 1994) ve bunlar hücrelerin çoğalabilmeleriyle (proliferasyon) ilişkilendirilmişlerdir.

1.4.2.1. Topoizomeraz II enziminin sınıflandırılması ve adlandırılması

Çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış 2000 dolayında enzim bulunmaktadır. Bilinen enzim sayısı her geçen gün hızla arttığından dolayı özel isimlerin yeterli olamayacağı anlaşılmıştır. 1956 yılında kurulan Uluslararası Enzim Komisyonu (**NC-IUBMB**, International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzyme-Catalysed Reactions) toplanarak her birisi çeşitli gruplara sahip enzim işlevlerini 6 ana grupta toplayan bu sınıflama sistemini meydana getirmiştir. Böylece enzimlerin katalize ettikleri tepkimeyi tanımlayan, formal ad ve bireysel sınıflandırma numaraları verilmiştir.

Topoizomerazlar bu sınıflandırma da İzomerazlar (Optik ve geometrik izomerlerin birbirlerine dönüşme reaksiyonlarını katalize eden enzimler) grubuna girerler.

DNA Topoizomeraz II enziminin adı ilk olarak Gellert (1981) tarafından yayınlanmıştır. Ardından 1984 tarihinde Uluslararası Enzim Komisyonu tarafından **EC 5, 99, 1, 3** sistematik adıyla kabul edilmiştir.

Buradan EC harfleri : Enzim komisyonunu ifade eder. Numaralandırmada yer alan ilk sayı (5) enzim sınıfını (6 sınıftan 5.si olan izomerazları), ikinci sayı (99) alt sınıfını, üçüncü sayı (1) alıcı grubu-akseptörü, dördüncü sayı (3) enzime ait seri numarasını gösterir.

1.4.2.2. Topoizomeraz II enziminin çeşitleri

Maya ve Drosophila tek tip Topoizomeraz II'ye sahipken memeli hücrelerinde iki ayrı Topoizomeraz II izoformu mevcuttur. Bunlar Topoizomeraz II α ve Topoizomeraz II β 'dir (Drake *et al.*, 1987). Ağırlıkları sırayla 170 kDa ve 180 kDa'dur (Chung *et al.*, 1989) .

Hücre döngüsü sırasında Topoizomeraz II α ve Topoizomeraz II β farklı regüle edilirler ve farklı fonksiyonları olduğu düşünülmektedir (Austin and Marsh, 1998). Topoizomeraz II α 'nın seviyesi hücre döngüsünün S ve G2 evrelerinde belirgin olarak artar, mitozdan sonra azalır (Heck *et al.*, 1988; Prosperi *et al.*, 1994). Bu nedenle kromozom yoğunlaşması ve birbirlerine bağlı kardeş kromozomların ayrımı için gerekli olduğu, ayrıca hücrenin çoğalmasında özel bir işaretleyici olduğu kabul edilmektedir (Heck and Earnshaw, 1986; Wang, 1996). Aksine, Topoizomeraz II β 'nin seviyeleri ise hücre döngüsünde az dalgalanır ama bunlar da hücre döngüsüne bağımlıdır. Topoizomeraz II β , antikarsinogen ilaçların hedefi olmakla

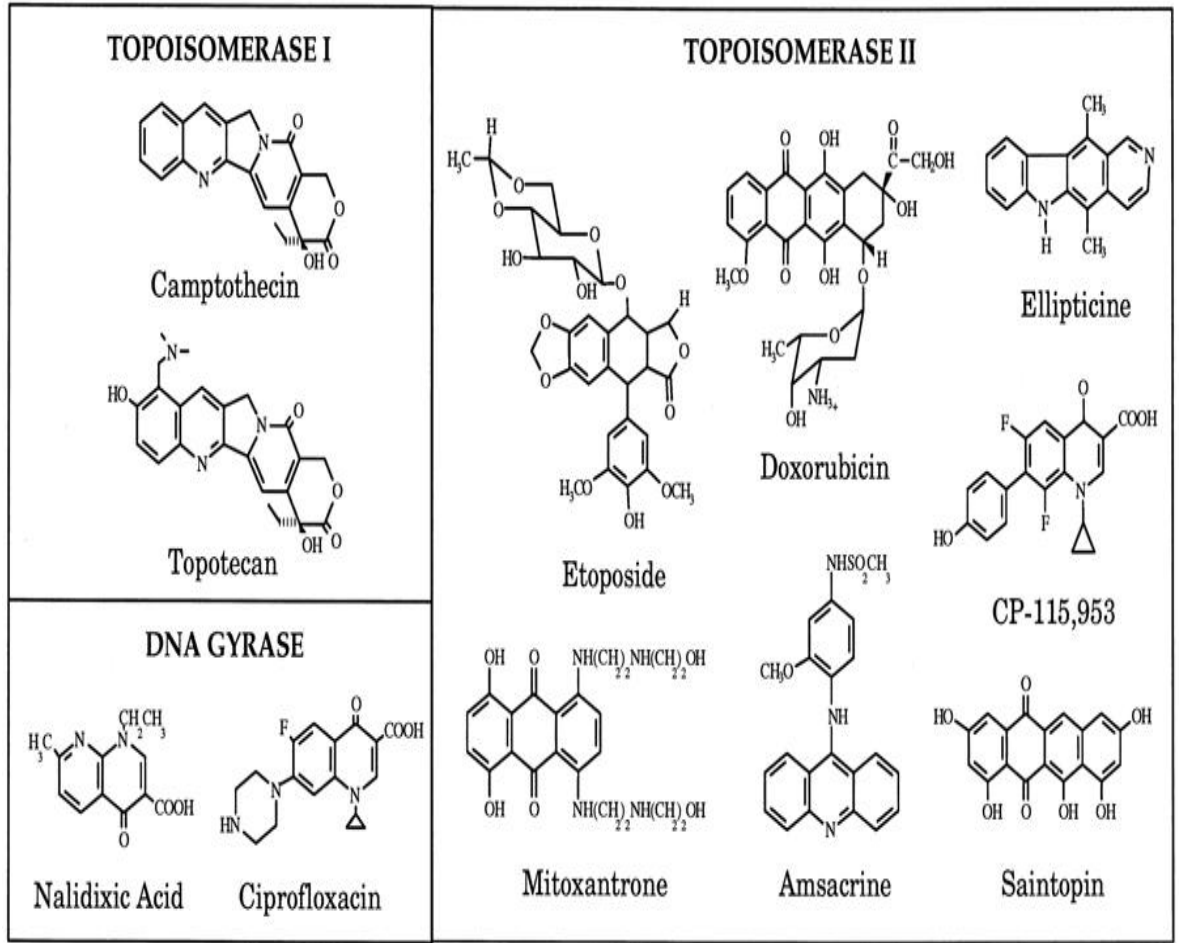
beraber (Errington, 1999) hücrel fonksiyonları henüz tam anlamıyla bilinmemektedir (Prosperi *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1997) .

Tümör hücrelerinde Topoizomeraz II α ve Topoizomeraz II β arasındaki ilişki incelendiğinde, bu hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ne kadar çok ise Topoizomeraz II α 'nın seviyesinin de o kadar yüksek olduğu görülmüştür. Kemoterapiden önceki ve sonraki örnekler kıyaslanmış ve azalmış Topoizomeraz II α seviyelerine rastlanmıştır. Topoizomeraz II β da ise böyle bir orantı belirlenmemiştir (Dingemans, 1998; Perrin *et al.*, 1998) .

Prokaryotlarda (*E.coli*'de) negatif süper dönümleri DNA'ya tanıtan, Topoizomeraz II sınıfından bir enzim de **DNA Giraz** enzimidir, 1976'da Gellert tarafından bulunmuştur. Bu enzim DNA'ya dakikada yaklaşık 100 süper dönüm tanıtabilir. Giraz, bağlandığı DNA bölgesinde öncelikle pozitif süper dönüm yaparak negatif süper dönüm oluşumunu teşvik eder (Cozzarelli, 1990). Bu işlem için ATP'nin hidroliziyle açığa çıkan enerjiyi kullanır. ATP olmadığı zaman da sadece negatif süper dönümleri açabilir. *E. coli*'de DNA Giraz iki tip alt ünitelerden oluşan bir tetramerdir. Alt ünitelerden herbiri antibiyotikler için bir hedeftir.

1.4.3. Topoizomeraz Enzimlerinin İnhibitörleri ve İşleyiş Mekanizması

Topoizomerazlar çok sayıda ve klinik açıdan yüksek değerde sitotoksik ilaçlar için önemli bir hedef olarak keşfedilince, 1980'lerde alana tamamen yeni bir boyut eklendi. Bu ilaçlar en etkili, en kapsamlı ve eldesi en kolay olan kinolonlardan; tümör tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikarsinojen ilaçlarından biri olan Etoposide kadar uzanmaktadır (Osheroff , 1998) (şekil 1.10.).



Şekil 1.10. DNA Topoizomeraz Enzimlerinin İnhibitörleri (Brutlag, 2000)

Kemoterapide kullanılan antitümör ilaçlarının büyük bir kısmı etkilerini Topoizomeraz I veya II enzimini inhibe ederek gösterirler (Markovits, 1987; Bae, 1991; Lemoine *et al.*, 1994). Topoizomeraz I inhibitörleri DNA sentezini çabucak ama tam olmayacak şekilde bloke ederler. Bu yüzden Topoizomeraz I inhibitörleri çok sayıda DNA kırıklarına yol açan tipik olarak DNA'ya hasar veren ajanlardan değildir. Çünkü hücrede bir onarım cevabını indüklemeyebilir. Bu “enzim aracılı DNA kırıkları” inhibitör olduğu sürece stabil bir halde kalır, inhibitör çekildiğinde ise kırıklar çabucak bağlanmaktadır. Camptothecin (CAMP) Topoizomeraz I'in inhibitörüdür (Kaufmann, 1989; Del Bino, 1990; Poot, 1992; Pommier, 1998).

Topoizomeraz II inhibitörleri DNA çift sarmalında bazlar arasına enine yerleşerek, çapraz bağ oluşturmak suretiyle etkili olurlar. Bu tür inhibitörlerin DNA üzerinde ki nükleotid sıra seçimi ile ilgili çok az şey bilinmektedir. Ayrıca Topoizomeraz II inhibitörleri “Topoizomeraz II-DNA komplekslerini” stabilize hale getirerek de Topoizomeraz II enzimini bloke edebilirler (Hsiang, 1988; Markovits, 1989; Drake, 1991).

DNA Topoizomeraz II inhibitörleri insan lenfositleri ile muamele edildiğinde şu etkiler görülmüştür :

- 1- Mitoza girişin inhibisyonu (interfazda kalma)
- 2- Kromozom kırılma ve yeniden düzenlenmesi
- 3- Kromozom yoğunlaşması inhibisyonu
- 4- Kromozom ayrılması inhibisyonu (Zucker, 1991; Sumner, 1992).

Bunların yanı sıra kardeş kromatid değişimi oranında artışa ve yüksek dozlarda hücre ölümüne (apoptozise) neden olur (Hsiang, 1988; Pommier and Zwelling, 1983; Kaufmann, 1989; Downes, 1991; Nersessian, 1991) .

Topoizomeraz inhibitörleri düşük konsantrasyonlarda etkisini yalnızca anafazda gösterir. Bölünme ve yarıma anormallikleri de gözlenebilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda ise çekirdek ve hücre hiçbir zaman bölünmeye teşebbüs etmez. Zaman zaman çekirdekli ve çekirdeksiz yavru hücreler meydana gelebilir (Downes, 1991).

Topoizomeraz II inhibitörleri özellikle kromozomların R-bandlı bölgelerini etkiler. Revers-ters bandlama, C-bandlamanın tersidir ve ökromatik bölgeler bandlanır. Bu bölgeler aktif genlerin bulunduğu AT’ce (Adenin ve Timin) zengin bölgelerdir. R bandlı bölgelerde Topoizomeraz

II'nin aşırı etkin olması bu bölgede fazla transkripsiyonun olması ile açıklanabilir (Maraschin, 1990) .

Rekombinasyonda rol alan Topoizomeraz II inhibitörleri delesyonlara ve translokasyonlara da neden olmaktadır (Bae, 1991).

Tablo 1' de genel Topoizomeraz inhibitörleri sunulmuştur.

Tablo 1.1. DNA Topoizomeraz Hedefli Antitümör İlaç Sınıfları ve Yaygın Olarak Kullanılanların Adları (Lemoine and Neoptolemos., 1994)

Hedef Kullanılanları	İlaç Sınıfı	Yaygın Olarak
Topoizomeraz I	Camptothecins	Camptothecin Topotecan
Topoizomeraz II	Anthracyclines	Doxorubicin Daunorubicin
	Ellipticines	Ellipticinium acetate
	Anthracenediones	Mitoxantrone Bisantrone
	Actinomycins	Actinomycin D
	Epipodophyllotoxins	Etoposide (VP-16) Teniposide

Adriamycin (ADR), etopozid (VP-16), teniposide (VM-26), m-AMSA, ellipticine Topoizomeraz II inhibitörlerindendir.

Tüm inhibitörler ciddi kromozom hasarına sebep olmaktadır. Bunlar kromatid kırıkları, DNA dizini sırasının değişmesi, halkalar, diplokromozomlar, anafaz ve metafazda ayrılmama gibi kromozom hasarlarıdır (Sumner, 1998). Genel olarak İnhibitörlerin meydana getirdiği hasarlı kromozom oranı;

- Hücre döngüsündeki Topoizomeraz enzim seviyelerindeki değişmelere,
- Uygulanan inhibitörün yetenek ve miktarına,
- Zararın çeşidine ve tamir olup olmamasına bağlı olarak değişir (Backer, 1990).

Topoizomeraz inhibitörlerini, özel hedef ve devamlılık mekanizmasına göre “zehir etkiler”, “rakip etkiler” ve “karma etkiler” olmak üzere üç gruba ayırabiliriz (tablo 1.2.).

Topoizomeraz zehirleri kovalent DNA Topoizomeraz reaksiyonu aracılarını stabilize eden ilaçlardır. Enzimin geri dönüşümünü engeller ve iplik geçit reaksiyonunu inhibe eder. İlacın stabilize ettiği kovalent bağlı kompleks sitotoksik bir lezyon oluşturur. Topoizomeraz rakipleri mekanizmayı sola doğru değiştirme yeteneğine sahip ilaçlardır (tablo 1.2.). Kovalent bağlı DNA Topoizomeraz, reaksiyonun aracılarının oluşumunu engeller ve iplik geçit reaksiyonunu (yarılabilir kompleksi) inhibe eder (Shin, 1990).

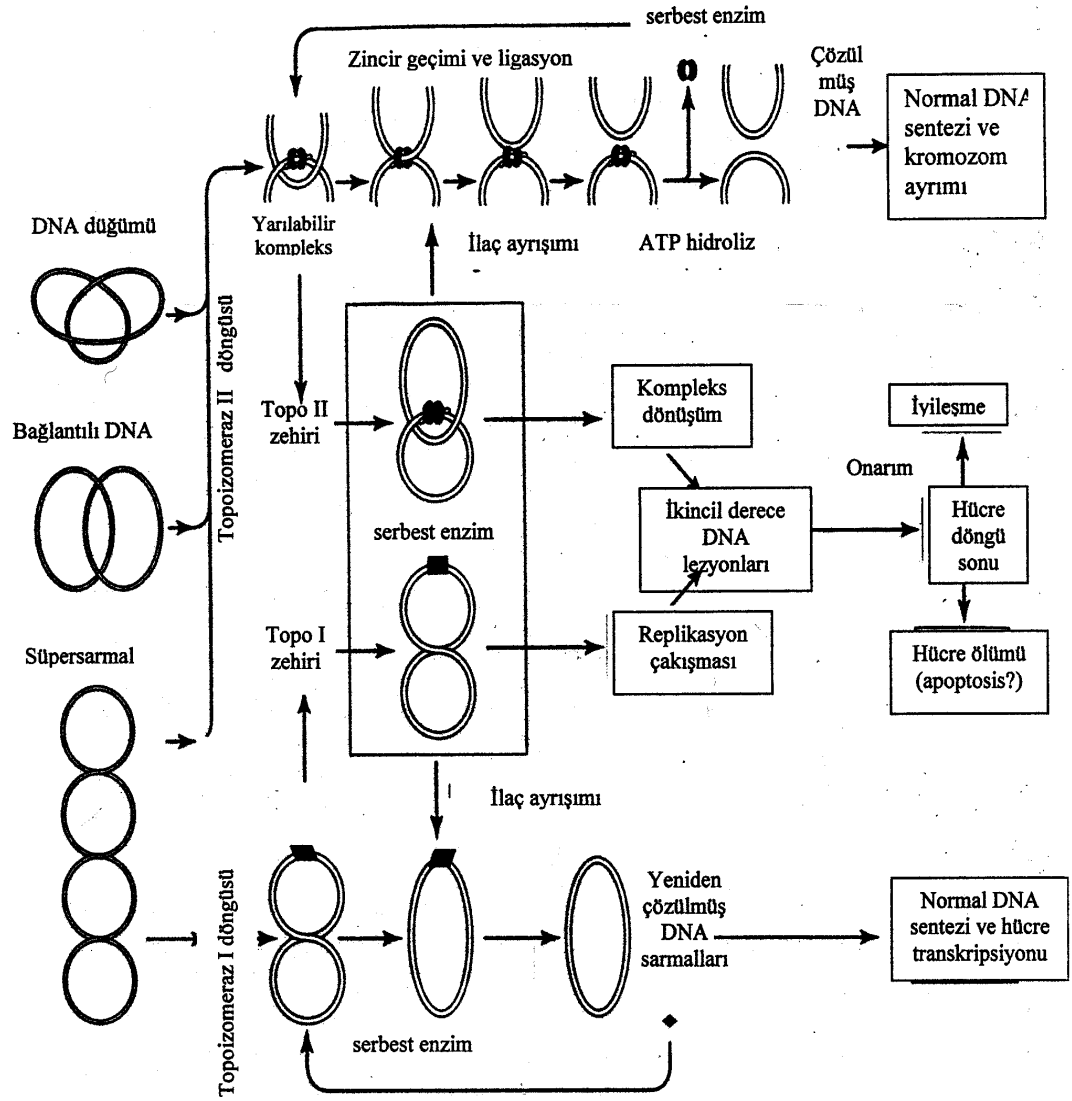
Kullanılan bazı antikarsinogenik ilaçların etkileri her iki fonksiyonu da (karma) gösterebilir. Bazen Topoizomeraz işleyişini zehir olarak inhibe eder.

hasarını takiben hücre ölümü veya hücrenin ilaç dayanıklılığı göstermesi şeklinde sonuçlanabilir. Hücrenin göstermiş olduğu ilaç dayanıklılığına karşı, Topoizomeraz geninde meydana getirilecek bir mutasyonla değiştirilmiş enzim aktivitesi yapılabilir. Bu nedenle, hücreler Topoizomeraz II inhibitörlerine karşı aşırı duyarlı hale gelebilir.

Genelde Topoizomeraz II'ye hücre bölünmesi sırasında ihtiyaç olduğundan, kontrolsüzce bölünen kanser hücreleri normal bölünen hücrelere göre Topoizomeraz II'yi hedef alan ilaçlara karşı daha duyarlıdır.

Temelde bu tip ilaçların yaptığı şey normal enzimi DNA'ya hasar veren bir ajana dönüştürmektir. Bu yüzden ne kadar çok enzim varsa, ilaç o kadar etkili olur. Bu normal olmayan farmakolojik bir mekanizmadır. Genelde ilaçlar enzimleri belli oranda engeller, fakat Topoizomeraz hedefli ilaçlar çoğunlukla enzimi zehire çevirmektedir (Liu, 1989; Chen and Liu, 1994; Burden *et al.*, 1996; Osheroff, 1998) (şekil 1.11.).

Topoizomeraz inhibitörleri DMSO (Dimetilsülfoksit) gibi dipolar ve çok güçlü çözücülerle birlikte kullanılabilir. Böylece hücrenin ilaca karşı geçirgenliğinin artabileceği ve bu şekilde DNA sentez inhibisyonunu sağlayan dozun etkinliğinin de artabileceği düşünülmüştür (Pommier and Zwelling, 1983).



Şekil 1. 11. Topoizomeraz I ve Topoizomeraz II'nin Normal Aktivitelerinin Diagramatik Sunumu, Topoizomeraza Özgü Ajanların Etkileri ve Topoizomeraz -DNA Kompleksi İnhibisyonunun Hücresel Sonuçları (Smith *et al.*, 1994).

1.5. ETOPOSİD

Etoposid (VP-16), *Berberidaceae* genusundan *Podophyllum peltatum* (Mayıs Elması) bitkisinin yarı sentetik ürünü olup bir alkaloid olan epipodofilotoksin ilaç sınıfındandır (Wozniak, 1983). Molekül formülü $C_{29}H_{32}O_{13}$ olup, ariltetralin yapısına sahip bir bileşiktir. Fakat bütün ariltetralinler 3,4,5 trimetoksifenil halkası taşıırken Etoposid 4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil halkası taşımaktadır. (Olivia *et al.*, 2002; Perez *et al.* , 1997)

Bu bileşiğin jenerik adı Etoposid olmakla beraber VP-16 , EPEG, demethyl-epipodophyllotoxin gibi isimler de kullanılmaktadır.

Yarı sentetik bitkisel bir ürün olan Etoposidin ticari değeri oldukça yüksektir. 1980’de Amerikan tüketicileri bitkisel kaynaklı ilaçlara 8 milyar dolar ödemişlerdir (Manuel, 1985). Etoposid, 1985’de Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (**EORTC**, European organization for research and treatment of Cancer) tarafından onaylanmıştır.

1.5.1. Çalışma Mekanizması :

Topoizomeraz II inhibitörü olarak çalışan küçük bir ilaç grubuna dahil olan Etoposid Topoizomeraz II’nin işlevini yine Topoizomeraz II’ye bağlanarak (noninterkalating) engeller. Topoizomeraz II, hücre bölünmesi sırasında DNA’nın meydana getirdiği süper dönümleri çözmek için, DNA’da geçici çift zincir kırıkları yaparak DNA zincirlerinin birbiri içinden geçmesini sağlar. İşlemden sonra kırığı onarmak için kesik uçları tekrar birleştirir. Bu

noktada, Etoposid Topoizomeraz II'yi yapacağı tamir adımını tamamlamaktan alıkoyar. Etoposid DNA -Topoizomeraz II enzim kompleksine nonintercalating bağlanarak geçici kırılğan formun stabil-kalıcı kırılmalara dönüşmesini sağlar. Böylece Etoposid Topoizomeraz II'yi DNA'ya hasar veren ajana çevirmiş olur. Yani bir anlamda Etoposid topoizomeraz II'yi zehirler. (Lemoine and Neoptolemos, 1994; Osheroff , 1998)

Etoposid hücre döngüsünün evrelerine özgü olan kemoterapi ilacıdır. Hücre döngüsünün geç S ve G2 evresinde olan hücrelerde baskın aktivite gösterir. Özellikle etkisini Topoizomeraz II'yi inhibe edip DNA'ya verdiği hasarla apoptosise neden olarak da gösterebilir. Apoptosisin indüksiyon mekanizması tam olarak açıklanabilmiş değildir (Burden *et al.*, 1996; Beck *et al.*, 2001).

Etoposid kemoterapotik ilaç olarak kullanımında doza bağlı olarak ağız, farinks ve mukoza bozukluklarına (stomatit ve ülser) neden olmaktadır. Ayrıca cilt üzerinde kostik (yakıcı, dağlayıcı) reaksiyonlar oluşturmakla beraber anafilaktik şok gibi alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir .

Ayrıca Etoposid birçok organda yaptığı toksik etkiden dolayı araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda Etoposidin karsinojen ve teratojen (gelişim bozukluğuna neden olan madde) olduğu bilinmektedir.

Antikarsinojenlerin normal hücrelerdeki genotoksik etki derecelerini araştırmada insanlar üzerine çalışmalar sınırlı olduğundan, hayvanlar üzerine çalışmada bir yoğunlaşma söz konusu olup, bitkilerde ise çok azdır. Ayrıca, canlı sistemleri üzerine genotoksik ajanların sitogenetik etkilerinin araştırmaları doku kültüründe de yapılabilmektedir. Fakat oldukça pahalı bir yöntemdir.

Antikarsinojenleri bitkilere uygulama çalışmaları son yıllarda yaygınlaşmaya başladığından, literatürde konuyla ilgili bilgiler azdır. Bu alan doku kültürüne kıyasla oldukça ucuzdur ve sterilizasyon gerektirmez. Her iki alanda da sitogenetik etkiler araştırıldığından hücresel bazda paralel sonuçlar vermesi beklenir.

Allium cepa elde edilmesi kolay ve çok iyi çimlenmesinden dolayı kimyasal mutajen test sistemlerinde, sitogenetik çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır ve tipik bir bitki biyo-assay'i organizmasıdır (Grant, 1994) . Bitkisel materyal olarak *Allium cepa* sayıca az, morfolojik olarak da büyük kromozomlara sahiptir. Bütün bir yıl boyunca köklenerek bolca mitotik hücre elde edilebilmesinden dolayı birçok deneyde tercih nedeni olduğu gibi, bu çalışmada da tercih edildi. Ayrıca bazı antikarsinojen maddelerin *Allium cepa* meristematik dokularında da anormal mitotik gelişmelere sebep olduğu bilinmektedir (Dayan *et al.*, 1999; Dayan and Watson, 1999; Albian *et al.*, 2002).

Bitki meristematik dokularında Topoizomeraz inhibitörü olarak kullanılan ve karsinojenik olan Etoposid maddesinin, bir bitki biyo-assay organizması olan *Allium cepa* üzerinde denenmesi, etkilerinin memelilerdeki çalışmalarla kıyaslanması, bu etkilerin benzer ve farklı yönleri olup olmadığının gözlenmesi ve hangi doz gruplarının etkili olabileceğinin tesbiti bu araştırmanın amacını oluşturmaktadır. Topoizomeraz II inhibitörlerinden biri olan Etoposid ile *Allium cepa* meristematik dokuları muamele edilerek kök gelişim morfolojisi, ışık mikroskopunda mitoz anormallikleri ve mitotik indeks incelendi. Etoposid'in farklı konsantrasyonlarının uygulandığı doz gruplarındaki tohumlardan elde edilen ölçümler, kontrol grubundan elde edilenlerle karşılaştırıldı.

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Duncan et al. (1993) Topoizomeraz II enziminin fonksiyonunu anlamak için Topoizomeraz II mutantlı hücreleri izole etmişlerdir. Isıya duyarlı olan Topoizomeraz II mutantlar elde edildiğinde kromozom yoğunlaşması ve anafazda kromatid ayrımı mayalar tarafından yapıldığını gözlemişlerdir. Gelişmiş ökaryotlarda Topoizomeraz II'nin fonksiyonlarında belirgin bir kanıtı gidilememiştir. Çünkü Topoizomeraz II mutantları henüz izole edilememiştir.

Ökaryotlardaki Topoizomeraz II'nin fonksiyonunu anlamak için ("DNA-Topoizomeraz II" kompleksine bağlanan) Epipodophylltoxinler ; Etoposid (VP-16) , tenipozit (VM-26) ve (DNA 'ya çapraz bağlanan) m-AMSA gibi Topoizomeraz II inhibitörleri kullanılmıştır. Böylece memeli hücrelerinde G2 evresinde gecikme gözlenmiştir. Bu da, Topoizomeraz II'nin G2 evresinde rol aldığını göstermektedir. Ayrıca Topoizomeraz II'nin inhibe edilmesiyle, memeli hücrelerinde, anafaz kromatid ayrımını DNA zincir kırıklarından bağımsız önlediği gözlenmiştir. Özellikle Etoposidin bazı memeli hücrelerindeki (HeLa ve PHK2) mitotik ayrımı engellediği gösterilmiştir (Downes, 1991). Bu veriler Topoizomeraz II'nin S evresinde önemli olduğunu belirtse bile mayadaki mutant Topoizomeraz II'nin böyle bir ayrımı engellemediği ifade edilmiştir (Duncan et al., 1993).

Hücre kültüründe Topoizomeraz II inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda; CHO (Çin Hamster Yumurtası) hücreleri farklı ortamlara alınıp, farklı inhibitörlerle 2 saat işleme tabii tutulmuştur. Tüm inhibitörlerin ciddi kromozom hasarına sebep olduğu belirlenmiştir. Bu hasarlar; kromatid kırıkları, dizinin sırasının değişmesi, halkalar, diplokromozomlar, kromozomlarda kutuplara çekilememe, multipolar kutuplaşma, anafaz ve metafazda ayrılmama gibi kromozom hasarlarıdır. Çalışmalarda metafazlı hücrelerin %30'unun Etoposid ile, % 11'inin Mitoxantron ile ve % 4,7'sinin Amsakrin ile durakladığı gözlenmiştir. Özellikle Topoizomeraz II inhibitörleri,

metafaz anafaz geçişinde kromozom ayrılmasını etkilediği ortaya koyulmuştur (Sumner, 1998).

CHO hücreleriyle yapılan çalışmalardan bazıları da ; DNA tamirinde Topoizomerazların olası rolü ile ilgilidir. Cortes (2002), araştırmalarında CHO mutantlı EM9 ve CHO iyonize radyasyona duyarlı AA8 hücrelerinin senkronize kültürleri kullanılarak X-ışını tedavisinden sonra DNA tamirinde Topoizomerazların olası rolünü incelemiştir. Çalışmalar sırasında senkron kültürler tercih edilmiştir. Çünkü asenkron kültürde proliferasyon oranı ve hücre döngü aşamasına bağlı olarak farklı Topoizomeraz aktiviteleri bulunabilmektedir (Duguet, 1983). AA8 hücrelerinde X-ışını tedavisinden sonra Topoizomeraz I ve Topoizomeraz II aktivitelerinin arttığı, EM9 hücrelerinde ise böyle bir cevap oluşmadığı tesbit edilmiştir.

Cortes ve Pastor (2002), EM9 ve AA8 hücreleriyle yaptıkları başka bir çalışmada Topoizomeraz II inhibitörü olan ICRF-193'ü bu hücre soylarına uygulamışlardır. Sonuç olarak hem EM9, hem de AA8 hücrelerinde tamir hatası sonucu kromozom ayrılması meydana gelmeden hücrelerin ikinci replikasyona girmesiyle endoreduplikasyon gerçekleştiğini ve dört paralel kromatid içeren diplokromozomlu hücreler gözlemlenmiştir.

Pommier (1998) Çin Hamsteri akciğer fibroblast (DC3F) hücrelerini Topoisomeraz inhibitörlerinden Camptothecin (CAMP), Etoposid (VP-16) ve Amsakrin ile muamele ettiği çalışmada, sonuç olarak kromozom sayılarında artış gördüğünü rapor etmiştir. Bu sayısal anormalliklerin kromozom segregasyonu sırasında Topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonu nedeniyle meydana geldiği yorumu yapılmıştır. Downes (1991) ise yaptığı çalışmada topoisomerase II inhibitörlerinin memeli hücrelerinde kromozom segregasyonunu inhibe ettiğini ve yüksek konsantrasyonlarda da anafazda ayrılmaları önlediğini rapor etmiştir.

Katoh (1990) topoisomerez II inhibitörlerinden olan ve antibiyotikler sınıfına giren Adriamycin'i fare invivo deneylerinde uyguladığında, kromatid tipi delesyon ve kardeş kromatid değişimlerinin (SCE) meydana geldiğini rapor etmiştir. Bu çalışmayı destekleyen bir başka çalışma da fare spermeleri üzerine yapılmış ve delesyon gibi yapısal anormalliklere rastlanmıştır (Meistrich, 1990).

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Baybek (1995) tarafından 15 sağlıklı insanın invitro lenfosit kültürüne 0,1 µg/ml ve 0,25 µg/ml Adriamycin uygulanmış olup, incelemeler sonucunda mitotik indekste kontrole nazaran belirgin bir azalma, kromozom bantlamalarında tüm doz gruplarında kromozom aberasyonları ve kardeş kromatid değişimi yönünden anlamlı sonuçlar bulunduğu bildirilmiştir.

Ökaryotlarda Topoizomerez II enzimleri üzerine pek çok çalışma olmasına rağmen şimdiye kadar ökaryot organizmaya enfekte olan virüse ait Topoizomerez tanımlanmamıştır. Oleg (2000) tarafından virüslerin replikasyonu sırasında virüsler tarafından kodlanmış ilk Topoizomerez II karakterize edilmiştir. Chlorella virüsü (PBCV-1) deniz yosununa bulaşmasıyla Topoizomerez II'ye benzer 120 kDa ağırlığında bir proteini kodladığı bulunmuştur. Tipik Topoizomerez II enzimleri, ATP'ye bağımlı olarak DNA moleküllerinin yapısındaki çözümleri gerçekleştirirler. Aynı şekilde PBCV-1 virüsüne ait Topoizomerez II enzimi de, kendi DNA'sının çözümlerini ATP bağımlı olarak gerçekleştirmektedirler. PBCV-1 virüsünün enzimi diğer ökaryotik Topoizomerez enzimlerinden daha küçük olmasına rağmen tipik Topoizomerez II'lerin işlevlerinin hepsini yapabilmektedir. Kısaca bulunan bu rekombinant enzim, tanımlanmış en küçük Topoizomerez II'dir (Oleg , 2000).

Dingemans (1998), tümör ve Topoizomeraz II α ve Topoizomeraz II β arasındaki ilişkiyi incelendiğinde, tümörlü hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ne kadar çok ise Topoizomeraz II α 'nın seviyesinin de o kadar yüksek olduğunu göstermiştir.

Kemoterapiden önceki ve sonraki örnekler bir çalışmada kıyaslanmış ve azalmış Topoizomeraz II α seviyelerine rastlanmıştır. Topoizomeraz II β da ise böyle bir orantı belirlenmemiştir (Perrin, 1998) .

Başka bir çalışmada da (Errington, 1999), akut lenfoblastik lösemi hücre sıralarındaki Topoizomeraz II β ve inhibitör olarak kullanılan, sitotoksik etkisi olan Doxorubicin ile Etoposid arasında doğrudan bir korelasyon görülmüştür. Fakat buna rağmen, Topoizomeraz II α ile böyle bir korelasyon gösterilememiştir. Sonuç olarak Topoizomeraz II inhibitörleri ile Topoizomeraz II'nin α ve β izoformları arasında ilaç duyarlılıkları henüz anlaşılamamıştır, neoplastik dokulardaki Topoizomeraz II α ve Topoizomeraz II β seviyeleri tümör tiplerine göre değişebilir.

Özellikle prostat kanseri için kullanılan Etoposidin testis ve akciğer karsinomalarında, lenfositik olmayan lösemilerde, Hodgkin's olmayan lenfomalarda yararlı olduğu rapor edilmiştir. Etoposid nadir olarak hastalarda ölümcül olan ikinci derecede kanser meydana getirmiştir. Lösemili hastaların %5'inde, Etoposidin ikinci lösemilere yol açabilecek kromozomal hasarlara neden olduğu tespit edilmiştir (Manuel , 1985).

Beck et al. (2001) çalışmalarında hücre döngüsünü düzenleyici bir protein olan Retinoblastoma (Rb) ile Topoizomeraz II α 'nın etkileşimi ve sonuçları üzerine araştırma yapmışlardır. İmmunfloresan yöntemi kullanarak, Hela hücrelerinde yapılan bu deneyde Topoizomeraz II α enziminin proteini yeşil floresans protein (GFP) ile, Retinoblastoma ise spesifik antikorlarla belirlenmiştir. Böylece Topoizomeraz II α ve

Retinoblastoma yapılarının nükleusa birlikte yerleştiği gösterilmiştir. Topoizomeraz II α ve Retinoblastoma arasındaki etkileşimin hücresel dağılımlarının apoptosise neden olan Topoizomeraz II inhibitörleri tarafından değiştirildiği belirlenmiştir. Sonuç olarak protein-protein etkileşimlerinde hücre devri sinyallerinde önemli olduğu, dolayısıyla bu tür etkileşimler inhibe edildiklerinde önemli antikarsinogen oluşumlar bulunmuştur.

Topoizomeraz inhibitörlerinin kemoterapi ilaçlarından başka uygulama alanları da vardır:

Etoposidin antikarsinogen olarak kullanılmasının yanısıra Pfeifer et al. (1992) doku kültüründe Etoposidi HIV-1 virüsüne (AIDS'e neden olarak bulunan ilk virüs) uygulamışlardır. Böylece Etoposidin HIV-1'in potansiyel inhibitörü olduğunu bulmuşlardır. Etoposidin HIV-1'e karşı inhibisyonu anti-Topoizomeraz II aktivitesinden farklı olup, ilacın direkt virüs DNA'sına bağlandığını ifade etmişlerdir. Buna karşın diğer Topoizomeraz II inhibitörlerinin HIV-1 DNA'sını inhibe etmediklerini fark etmişlerdir.

Mizushina et al. (2002) enzim inhibitörü olarak iki yeni Terpenoid çeşidi olan Fomitellik asit (FAs) ve Ursalik asit (UA)'in etkilerini araştırmışlardır. Bunlardan FAs'ın memeli DNA polimeraz enzim inhibitörü olduğu, UA'nın ise insan Topoizomeraz I ve II'nin inhibitörü olduğu bilinmektedir. İlginç olan, DNA polimeraz inhibitörünün (FAs) DNA Topoizomeraz I ve II için potansiyel inhibitör olması ve aynı zamanda DNA Topoizomeraz I ve II inhibitörünün de (UA) DNA polimeraz için inhibitör olmasıdır. Çalışma her iki enzim arasında bazı yapısal benzerlikler olabileceğini düşündürmektedir.

Topoizomeraz II'nin bakteriyel formunu hedef alan antibiyotikler üzerine çalışmaların yanısıra Topoizomeraz II'nin insanlarda ve mikrobiyal canlılarda bulunan formunu hedef alan antibiyotik, antifungal ve antiparazit ajanlar da tasarlanmaya başlanmıştır (Bedows, 1982; Russel and

Fenemore, 1986). Yapılan son çalışmalar arasında ise bir Topoizomeraz II engelleyicisi olan Etoposidin herbisit (yabancı ot öldürücü) aktivitesinin denenmesi de mevcuttur (Roca *et al.*, 1996; Olivia *et al.*, 2002).

Bitkilerde yapılan bir çalışmada Fukata *et al.* (1991) *Brassica oleracea* (karnabahar) yapraklarından, kolon kromatografi yöntemi de kullanılarak ATP-bağımsız DNA Topoizomeraz izole etmişlerdir. Karnabahar Topoizomerazı ve ıspanak Topoizomerazının negatif süper dönümleri olduğu gibi pozitif süper dönümleri de çözdüğü anlaşılmıştır. Bu özelliklerinden dolayı karnabahar kloroplastında bulunan Topoizomeraz enzimini bu araştırmacılar ökaryotik DNA Topoizomeraz I sınıfına dahil etmişlerdir.

Carballo *et al.* (1991) yaptığı çalışmada olgunlaşmamış *Zea mays* (mısır) embriyolarının çekirdek ekstratlarını 2,4 diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve bir hormon olan Absisikasit (ABA) ile muamele etmişlerdir. Böylece 2,4-D ve ABA'nın Topoizomeraz I ve Topoizomeraz II üzerine etkileri araştırdıklarında 2,4-D ile işleme sokulmuş embriyolarda kontrol grubuna göre Topoizomeraz II aktivitesinin % 200 arttığını gözlemişlerdir. Fakat ABA ile muamele edilmiş embriyolarda sadece eser miktarda Topoizomeraz II aktivitesinin varlığı tesbit edilmiş ve ABA, Topoizomeraz I aktivitesinde ise % 25 sapma rapor edilmiştir.

Allium cepa meristematik hücrelerinin Topoizomeraz II inhibitörü olan ICRF-193 ile muamele edilmesi anafazda kardeş kromatidler arasında köprüler meydana gelmesiyle sonuçlanmıştır (Albian *et al.*, 2002). Bu nedenle kardeş kromatidlerin ayrılması için metafazdan anafaza geçişte yoğunlaşma sonucu meydana gelen karışıklığın DNA Topoizomeraz II tarafından çözülmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Nitekim metafazdan anafaza geçişte özel olarak üretilmiş olan çok çekirdekli hücreler ICRF-193'e maruz bırakıldığında anafazda geri kalma gözlemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada araştırma materyali olarak seçilen *Allium cepa* (2n=16) tohumları Kocaeli ili, Gebze ilçesinde faaliyet gösteren Tohum Sertifikasyon Müdürlüğü'nden temin edildi.

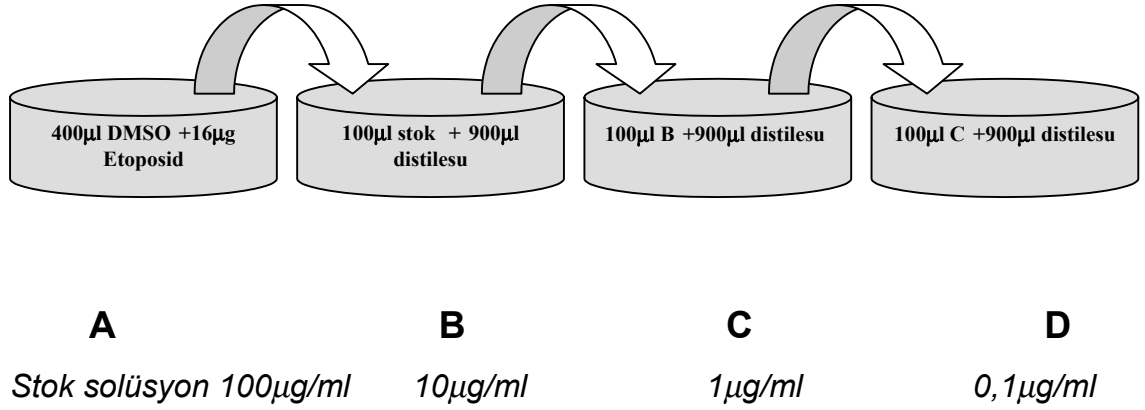
3.2. Metod

Gökmen (1987)'in kullandığı *Allium cepa*'da kromozom gözlemleri ile ilgili metod bu çalışmaya uyarlandı. Sitolojik boya olarak Aseto-orsein kullanıldı.

Topoizomeraz inhibitörü olarak etoposid konsantrasyonları hazırlandı. Etoposidin 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml ve 100µg/ml konsantrasyonları **I. II. III. ve IV. doz grupları** olarak belirlendi. Doz gruplarının hazırlanmasında kullanılan, etoposid çözücüsü olan DMSO (Dimetilsülfoksit) ayrı bir grup olarak belirlendi.

3. 2. 1. Stok Etoposid Solüsyonunun Hazırlanması ve Çimlendirme

1. Bu çalışmada kullanılan 4 farklı etoposid konsantrasyonunun hazırlanma aşamasında öncelikle 16 mg. toz etopozid 400µl DMSO (Dimetilsülfoksit) içinde çözüldü. Böylece A kabındaki stok solüsyonun son konsantrasyonu 100µg/ml oldu (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Doz gruplarında kullanılan farklı etoposid konsantrasyonlarının hazırlanması

2. A kabından 100 µl stok solüsyon alınarak B kabına koyulup üzerine 900µl distile su ilave edildi.
3. B kabından 100 µl alınarak C kabına koyulup üzerine 900 µl distile su ilave edildi.
4. C kabından 100 µl alınarak D kabına koyulup üzerine 900 µl distile su ilave edildi.
5. Her bir kabın içinden 100 µl solüsyon alınarak 40ml. distile su ile karıştırıldı.
6. Son konsantrasyonları; 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml ve 100µg/ml olan bu karışımlarla 4 adet petrinin içindeki pamuklar nemlendirildi.
7. Pamukların arasına, oda sıcaklığında, ışıklı ortamda, 7 gün boyunca distile suda çimlendirilen *Allium cepa* tohumları aktarıldı.

8. Etoposid konsantrasyonlarının uygulama süresi olarak *Allium cepa*'nın bir hücre döngüsünün süresi (yaklaşık 24 saat) esas alındı (Matagne, 1968).
9. Kök uçları 1-1,5cm. boyunda kesilerek α -monobromonaftalene alındı. +4°C'de 16 saat işleme tabi tutuldu. Carnoy çözeltisine aktarılan kökler preparatların hazırlanması amacıyla kullanıldı.
10. Etoposidin farklı konsantrasyonlarının kök büyümesine etkisini gözlemek amacıyla, petride bırakılan tohumların 6 gün daha çimlenmesi sağlandı. Köklerin boyları ölçülerek grafik çizildi.

3. 2. 2. Dimetil Sülfoksit (DMSO) Kontrol Grubunun Hazırlanması ve Çimlendirilmesi

1. Dipolar ve çok güçlü bir çözücü olan DMSO (Dimetilsülfoksit), bu çalışmada etoposidin çözücüsü olarak kullanıldı. Köklere verilen DMSO'nun miktarında etoposidin 100 μ g/ml konsantrasyonunda bulunan miktar baz alındı.
2. 5. petriye 100 μ l DMSO ve 40ml. distile su karışımı ilave edildi.
3. Distile suda 7 gün boyunca çimlendirilen 30 adet *Allium cepa* tohumu 8. gün, 5. petriye alındı.
4. *Allium cepa* tohumları DMSO ile 24 saat muamele edildi.
5. Kök uçları 1-1,5 cm. boyunda kesilerek α -monobromonaftalene alındı. +4°C'de 16 saat işleme tabi tutuldu. Carnoy çözeltisine aktarılan kökler preparasyon için kullanıldı.

6. DMSO'nun kök büyümesine etkisini gözlemek amacıyla, petride bırakılan tohumların 6 gün daha çimlenmesi sağlandı. Köklerin boyları ölçülerek grafik çizildi.

3. 2. 3. Distile Su Kontrol Grubunun Hazırlanması ve Çimlendirilmesi

1. Distile su kontrol grubunu oluşturmak amacıyla 6. petrideki, 7 gün boyunca çimlenmiş Allium cepa tohumlarına sadece distile su verildi.
2. Petrideki tohumların 24 saat daha çimlenmesi sağlandı
3. Kök uçları 1-1,5cm. boyunda kesilerek α -monobromonaftalene alındı. +4°C'de 16 saat işleme tabi tutuldu. Carnoy çözeltisine aktarılan kökler preparatların hazırlanması amacıyla kullanıldı.
4. Distile su kontrol grubundaki kök büyümesini gözlemek amacıyla, petride kalan tohumların 6 gün daha çimlenmesi sağlandı. Köklerin boyları ölçülerek diğer gruplarla karşılaştırıldı ve grafik çizildi.

3. 2. 4. Preparatların Hazırlanması

1. Tüm gruptaki, fiksasyon için Carnoy çözeltisine aktarılan kökler 24 saat sonra her bir kök 3'er defa olmak üzere %70 alkolden geçirildi.
2. Kökler boya ve preparasyon yapılana kadar depolamak amacıyla %70'lik alkolde +4°C'de saklandı. Bu kök uçları mitotik indeks ve mitozdaki anormalliklerin belirlenmesinde kullanıldı.

3. Boya olarak Aseto-orsein kullanıldı. Bu boya, kromozomları içerdği asetik asitle şişirerek gözlemi kolaylaştırdığından dolayı tercih edildi.
4. Kontrol ve deney gruplarından alınan her bir kök ucu bir saat camının üzerine koyuldu, materyalin üzerini örtecek kadar (9 damla boya+1 damla 1 N HCl) damlatıldı. Saat camı küçük alev üstünden 3-4 kez geçirildi. Böylece hafif ısıtma ile boyama hızlandırıldı. Kök uçlarının koyu menekşe rengine dönüştüğü gözlemlendi.
5. Preparatların yapılmasında ezme preparat yöntemi kullanıldı. Kök uçları saat camından, albuminmayerlenmiş lama alındı. Lam üzerine yine 1 damla aseto-orsein damlatıldı ve 2-3 mm'lik kısım keskin bir jiletle küçük parçalara bölündü.
6. Parçaların üzeri lamelle kapatıldı ve yanlardan taşan boyanın fazlası filtre kağıdı ile alındı.
7. İki kat kurutma kağıdı preparat üzerine yerleştirildi. Lameli oynatmadan, üzerine kurşun kalemin küt tarafıyla vuruldu. Böylece hücrelerin dağılıp yassılaşması sağlandı. Kromozomların aynı düzleme gelmesini sağlamak için kurutma kağıdını oynatmadan lamel üzerine başparmakla birkaç kere kuvvetlice bastırıldı.
8. Preparatlarda ki hava kabarcıkları boya damlatılarak giderildi.
9. Hazırlanan preparatların uzun ömürlü olması için 1 gece buzlukta tutuldu. Ardından lam ve lameller jiletle ayrılıp sırasıyla %30, %50, %70, %90 , %99 alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra sırayla (1:2), (1:1), (2:1) oranlarında ki ksilol:alkol serilerinden geçirilen preparatlar saf ksilole alındı. Lam ve lameller üzerine kanada balsamı damlatılarak kapatıldı.

10. Her bir doz grubu ve kontrol grubu için hazırlanan preparatlar (x10, x40 ve x100) büyütme ile ışık mikroskopunda incelendi.
11. Hücrelerin fotoğrafları Leica Araştırma Fotomikroskopunda çekildi.
12. İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma, Frekans) yanısıra nicel verilerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U test kullanıldı. Nitel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki- Kare testi kullanıldı. Sonuçların anlamlılığı $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Topoizomeraz II inhibitörü olan Etoposidin 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml ve 100µg/ml konsantrasyonları sırasıyla I. II. III. ve IV. Doz grupları olarak belirlendi. Doz gruplarındaki ve DMSO grubundaki bulgular, kontrol grubundaki bulgularla kıyaslandı.

4.1. Farklı Etoposid Konsantrasyonlarının Kök Büyümesine Etkileri

Farklı Etoposid konsantrasyonlarının her doz grubu için yapmış olduğu sitotoksik etkinin derecesini verebilecek parametrelerden biri de kök büyümesidir. Bu sebeple mitotik indeks; Etoposidin tüm doz gruplarında, DMSO kontrol ve distile su kontrol gruplarında hesaplandı.

Distile su kontrol grubundaki köklerin uzunluğu ortalama 3,32 cm olarak bulundu (Tablo 4. 1.). Bu oran % 100 kök uzaması olarak kabul edildi (Şekil 4. 1.).

DMSO kontrol grubundaki köklerin uzunluğu ortalama 3,27 cm olarak bulundu (Tablo 4.1.). Kontrole göre %98,49 kök uzaması ve %1,51 oranında büyümede azalma tespit edildi.

0,1µg/ml Etoposid uygulanan I. Doz grubundaki köklerin uzunluğu ortalama 3,00 cm olarak bulundu (Tablo 4.1.). Kontrole göre %90,36 kök uzaması ve %9,64 oranında büyümede azalma meydana geldi. (Şekil 4.1.).

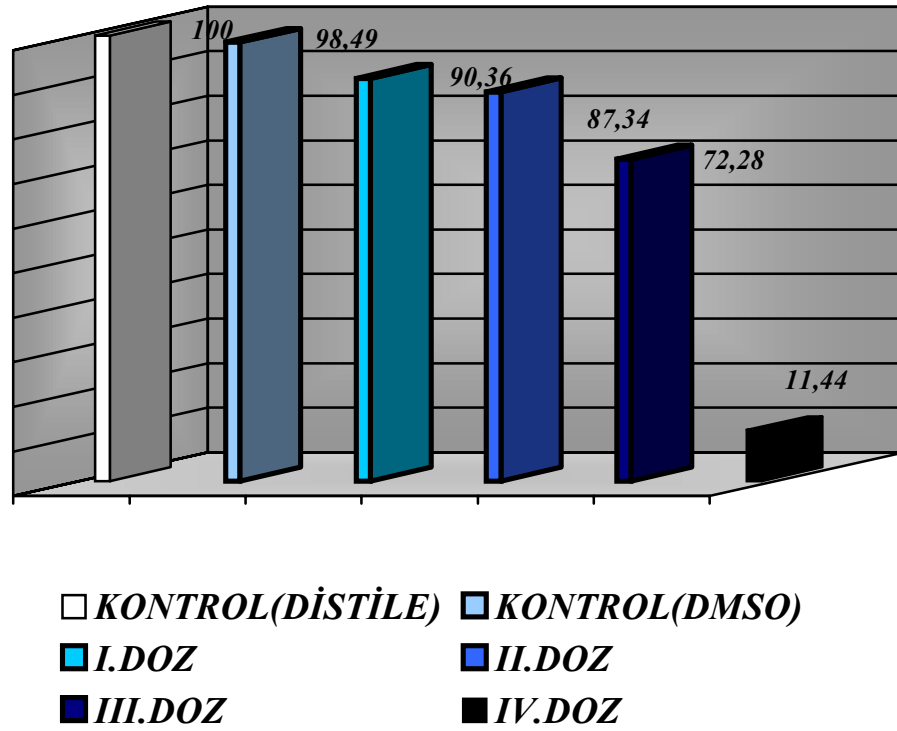
1µg/ml Etoposid uygulanan II. Doz grubundaki köklerin uzunluğu ortalama 2,9 cm olarak bulundu (Tablo 4.1.). Kontrole göre %87,34 kök uzaması ve %12,66 oranında büyümede azalma meydana geldi (Şekil 4.1.)

10µg/ml Etoposid uygulanan III. Doz grubundaki köklerin uzunluğu ortalama 2,4 cm olarak bulundu (Tablo 4.1.). Kontrole göre %72,29 kök uzaması ve %27,71 oranında büyümede azalma meydana geldi (Şekil 4.1.).

100µg/ml Etoposid uygulanan IV. Doz grubundaki köklerin uzunluğu ortalama 0,38 cm olarak bulundu (Tablo 4.1.). Kontrole göre %11.44 kök uzaması ve %88,56 oranında büyümede azalma meydana geldi (Şekil 4. 1.).

Tablo 4. 1. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarının Büyüme Oranları

Uygulanan Dozlar (µg/ml)	Ortalama Uzunluk (cm.)	% Büyüme	% Büyümede Azalma
Kontrol (Distile su)	3.32	100	—
Kontrol (DMSO)	3.27	98.49	1.51
I.Doza Grubu (0.1)	3	90.36	9.64
II.Doza Grubu (1)	2.9	87.34	12.66
III.Doza Grubu (10)	2.4	72.29	27.71
IV.Doza Grubu(100)	0.38	11.44	88.56



Şekil 4. 1. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarının Büyüme Oran Histogramı

Tablo 4. 2. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarının İstatistiksel Karşılaştırılması

Uygulanan Dozlar (µg/ml)	Mann Whitney U Test	p
Kontrol (Distile)- Kontrol (DMSO)	22,00	0,975
Kontrol - I.Doğ Grubu (0.1)	20,00	0,886
Kontrol - II.Doğ Grubu (1)	18,00	0,745
Kontrol - III.Doğ Grubu (10)	15,00	0,685
Kontrol -IV.Doğ Grubu (100)	9,000	0,056

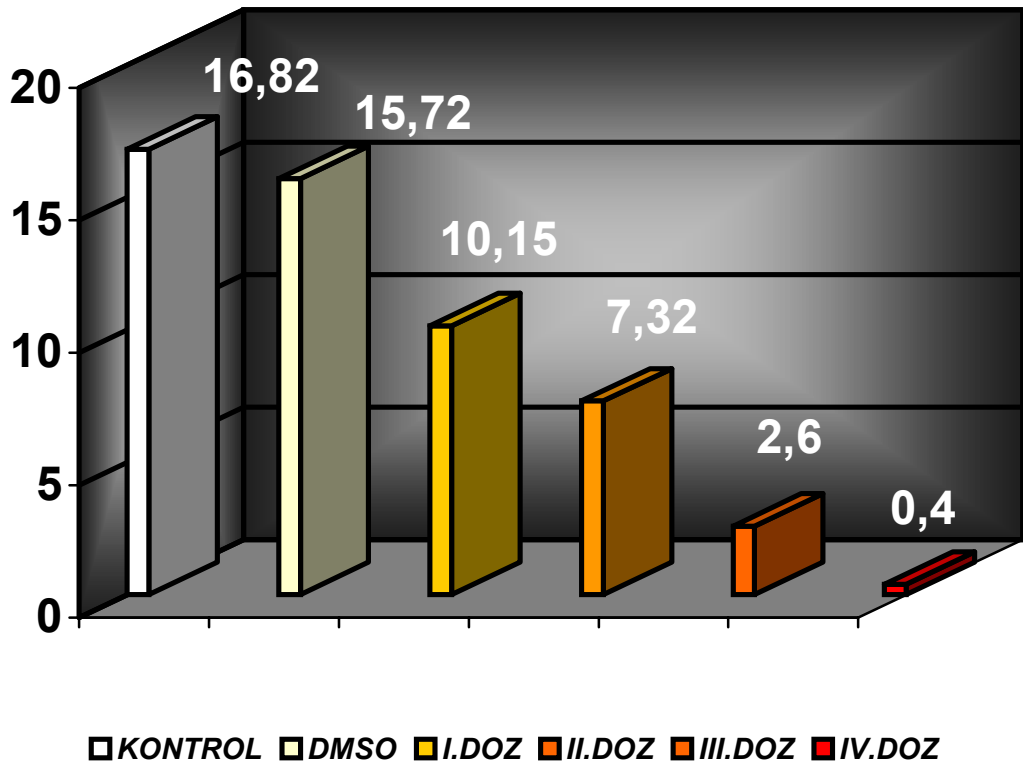
Etoposidin *Allium cepa* üzerinde sitotoksik etkisi olduğu, konsantrasyon artışı ile bu etkinin de artmış olduğu belirlendi. Fakat istatistiksel olarak tablo 4. 2. de görüldüğü gibi kontrol ve DMSO grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p > 0,05$). Kontrol grubu ile I. Doz grubunun büyüme uzunluklarının ortalamaları arasında anlamlı farklılık saptanamadı ($p > 0,05$). Kontrol grubu ile II. Doz grubu ve III. Doz grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$). Sadece kontrol grubu ile IV. Doz grubunun büyüme uzunlukları arasında anlamlı farklılık tespit edildi. ($p < 0,05$).

4. 2. Farklı Etoposid Konsantrasyonlarının Mitotik indeks Üzerine Etkileri

Mitotik indeks üzerine farklı Etoposid konsantrasyonlarının etkisi Tablo 4.3.'de verilmektedir. Mitotik hücrelerin oranını belirlemek için, bölünen hücrelerin sayısı toplam hücrelerin sayısına oranlandı. Deney grupları arasında karşılaştırma yapabilmek amacıyla her gruptan 4000 hücre sayıldı. Kontrol distile su grubundaki 4000 hücrede 673 mitoz belirlendi. Kontrol DMSO grubunda ise 629 mitoz tespit edildi. En düşük Etoposid konsantrasyonunda ($0,1\mu\text{g/ml}$) 406, en yüksek Etoposid konsantrasyonunda ($100\mu\text{g/ml}$) 16 mitoz rastlandı. Kontrol distile su grubuna göre en düşük mitotik indeks IV. doz grubunda olup % 0,4'dür. Kontrol distile su grubuna en yakın değer, mitotik indeksi % 10,15 olan I. doz grubudur. II. ve III. Doz gruplarında da konsantrasyon arttıkça mitotik indeksin azaldığı tespit edildi. Nitekim II. Doz grubunda bölünen hücreler 293 iken, III. Doz grubunda bu sayının 104'e düştüğü belirlendi. Mitotik indeksleri de sırasıyla % 7,32 ve % 2,6 olarak bulundu. Şekil 4.2.'de doz gruplarına ait mitotik indeks histogramı sunulmaktadır.

Tablo 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarında Mitotik İndeks Değerleri.

Uygulanan Dozlar ($\mu\text{g/ml}$)	Sayılan Hücre Sayısı	Bölünen Hücre Sayısı	Mitotik indeks (%)
Kontrol (Distile)	4000	673	16.82
Kontrol (DMSO)	4000	629	15.72
I.Doç Grubu (0.1)	4000	406	10.15
II.Doç Grubu (1)	4000	293	7.32
III. Doç Grubu (10)	4000	104	2.6
IV.Doç Grubu (100)	4000	16	0.4



Şekil 4. 2. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doç Gruplarında Mitotik İndeks Histogramı.

İstatistiksel olarak Etoposid konsantrasyonu ile mitotik indeks arasında ters bir orantının olduğu saptandı. Fakat mitotik indeks ve kök uzaması arasında tam bir ilişki tespit edilemedi. Tablo 4. 4. Kontrol grubu ile DMSO grubu arasındaki bölünen hücre sayısındaki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($p < 0,01$). Kontrol grubu ile I. Doz grubu arasında bölünen hücre sayısına göre ileri düzeyde anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,001$). II. Doz grubunda bölünen hücre sayısında ki düşüş istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulundu ($p < 0,001$). III. Doz grubunda bölünen hücre sayısı daha da azaldığından anlamlılık düzeyinin daha da yükseldiği görüldü ($p < 0,0001$). IV. Doz grubu en düşük bölünme sayısına sahiptir ve kontrole göre en yüksek anlam düzeyinde farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,00001$).

Tablo 4. 4. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarının Mitotik İndeks Değerlerinin Distile Su Kontrol Grubu İle İstatistiksel Karşılaştırılması.

Uygulanan Dozlar ($\mu\text{g/ml}$)	Ki – Kare Değeri	p
Kontrol (Distile)-Kontrol (DMSO)	9,25	0,01**
Kontrol - I.Doğ Grubu (0.1)	76,37	0,001**
Kontrol - II.Doğ Grubu (1)	170,01	0,0001**
Kontrol - III.Doğ Grubu (10)	465,82	0,0000**
Kontrol- IV.Doğ Grubu (100)	685,52	0,0000**

**** $p < 0,001$ ileri düzeyde anlamlı**

4.3. Farklı Etoposid Konsantrasyonlarının Kromozomlar Üzerine Etkisi ve Mitoz Safhalarındaki Anormallik Oranları

Doz Grupları içinde büyümesini sürdüren tohumların hücreleri incelendiğinde odalara ayrılmış nükleus, nükleussuz hücreler, nükleusta morfolojik bozukluklar, iki nükleuslu hücre, kromozomlarda yapışma ve bağlantı, mikronükleus, kromozomlarda çözülme, anafazda kromozom köprüsü, multipolar metafaz ve anafaz , telofaz kromozomlarında yapışma anormallikleri belirlendi.

Tablo 4.5. Etoposidin farklı doz gruplarının mitoz safhalarındaki anormallik oranlarına etkisini göstermektedir. Kontrol distile su grubunun profaz evresinde 378 normal, 7 anormal safhada hücre belirlendi. Profaz evresine ait anormallik oranı %1.81'dir. Metafaz safhasında normal 143 hücre görülürken, 3 hücrede anormallik tespit edildi. Metafaz safhasına ait anormallik oranı % 2.05'tir. Anafaz evresinde ise 67 normal, 5 anormal hücre görüldü. Anafazda anormallik oranı % 6.94'tür. Telofazda anormallik belirlenmemiş olup normal hücrelerin sayısı 60 olarak bulundu. Telofaz evresinde anormallik oranı % 0'dır.

Kontrol DMSO'nun Profaz evresinde 357 normal, 13 anormal hücre belirlendi. Bu evredeki anormallik oranı % 3.51 olarak hesaplandı. Metafaz evresinde ise 140 normal safhada, 3 anormal safhada hücre sayıldı. Metafazda anormallik yüzdesi % 2.09 olarak tespit edildi. Anafaz evresinde bulunan 56 hücre normal, 10 hücre ise anormal safhada olup, anormallik oranı % 15.15 bulundu. Telofaz evresinde 48 normal, 2 anormal safhada hücre görüldü. Bu doz grubu için telofaz evresindeki anormallik oranı % 4 olarak tespit edildi.

Tablo 4. 5. Farklı Konsantrasyonlarda Etoposid Uygulanmış Doz Gruplarının Farklı Mitoz Sahalarındaki Anormallik Oranları (N: Normal, A: Anormal, % : Anormallik Yüzdesi)

Gruplar	Uygulanan Dozlar ($\mu\text{g/ml}$)	Profaz			Metafaz			Anafaz			Telofaz		
		N	A	%	N	A	%	N	A	%	N	A	%
Kontrol	–	378	7	1.81	143	3	2.05	67	5	6.94	60	–	0
I.Doç	0.1	138	116	45.66	52	16	23.52	39	18	31.57	25	2	7.40
II.Doç	1	130	43	24.85	35	19	35.18	26	23	46.93	9	5	35.71
III.Doç	10	41	10	19.60	16	14	46.66	12	5	29.41	5	1	16.66
IV.Doç	100	5	2	28.57	3	1	25	–	3	100	2	–	0

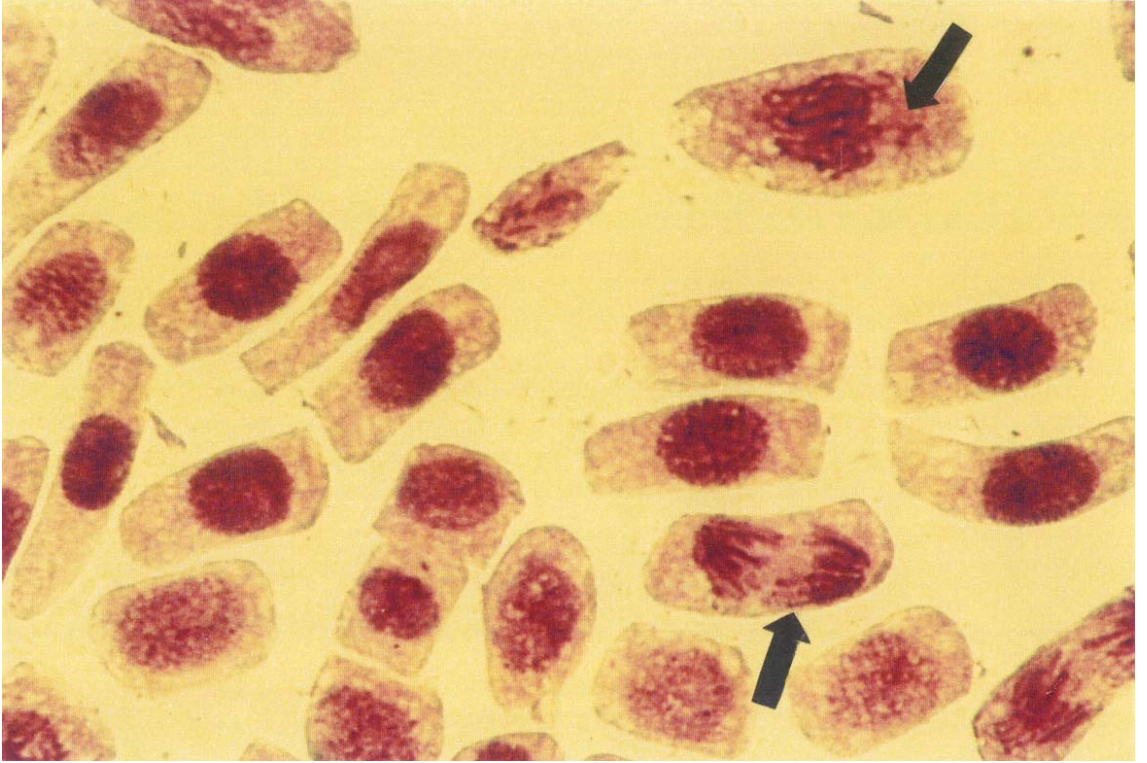
4.3.1. I. Doç Grubunda Görülen Anormallikler

0,1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda hazırlanan I. Doç grubunda bulunan meristematik *Allium cepa* dokularında ; metafaz kromozomunda çözülme (Şekil.4.3.), metafazda incelmış kromozom (Şekil.4.4.), metafaz kromozomlarında fragmentasyon ve oluşum bozuklukları (Şekil.4.5.), nükleussuz hücreler (Şekil.4.6.), nükleusun odalara ayrılması (Şekil.4.7.), çift nükleuslu hücre (Şekil.4.8.), anafazda geri kalma ve fragmentasyon (Şekil.4.9.), telofazda kromozom köprüsü (Şekil.4.10.) belirlendi. I. Doç grubunda görülen en yaygın anormalliğin nükleusu olmayan hücreler olduğu tespit edildi.

Etoposidin en düşük konsantrasyonu olan 0,1µg/ml'de profaz evresinde 138 normal, 116 anormal hücre saptandı. Anormallik oranı %45.66 olarak hesaplandı. Metafaz evresinde normal hücrelerin sayısı 52, anormal hücrelerin sayısında 16 olarak tespit edildi. Metafazda anormallik oranı 23.52'dir. Anafaz evresinde 39 normal safhada , 18 anormal safhada hücre bulunmuş olup, anormallik oranı 31.57'dir. Telofaz evresinde ise normal hücre sayısı 25, anormal hücre sayısı 2'dir. Telofazda anormallik oranı % 7.40 olarak hesaplandı.



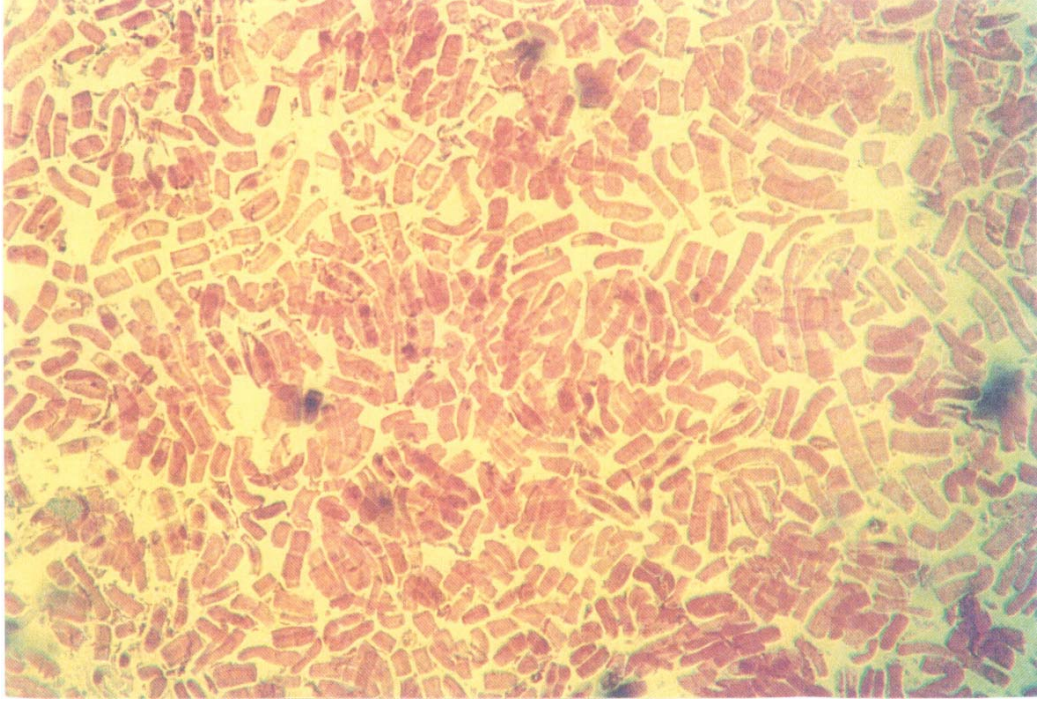
Şekil.4.3. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomunda Çözülme (x 100)



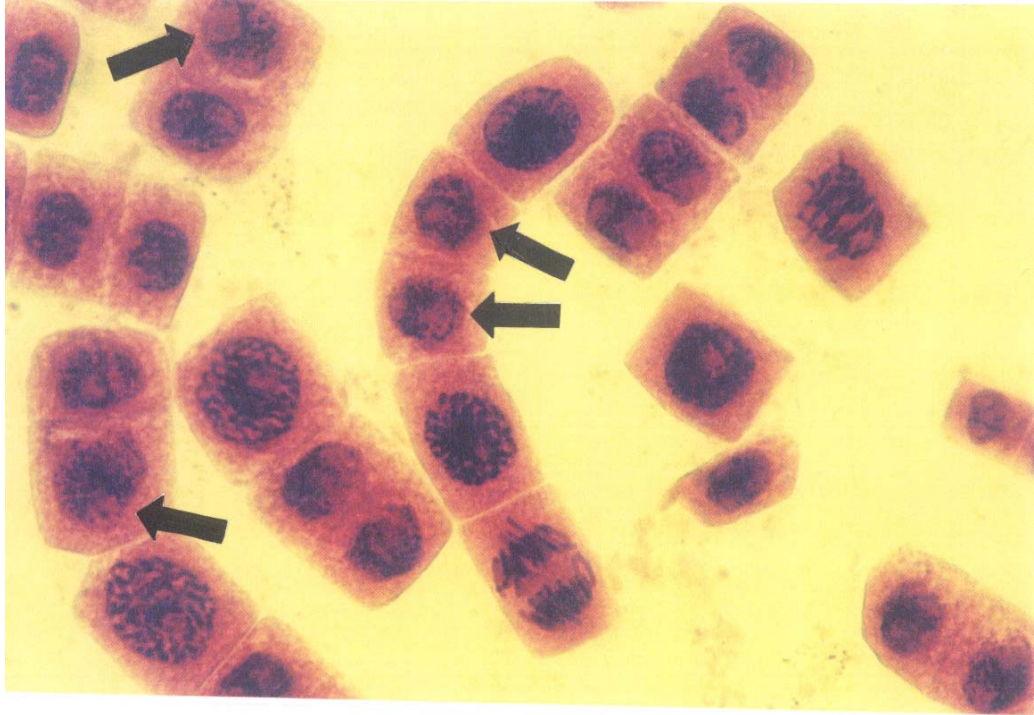
Şekil.4.4. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz ve Anafaz Kromozomlarında Çözülme. (x 40)



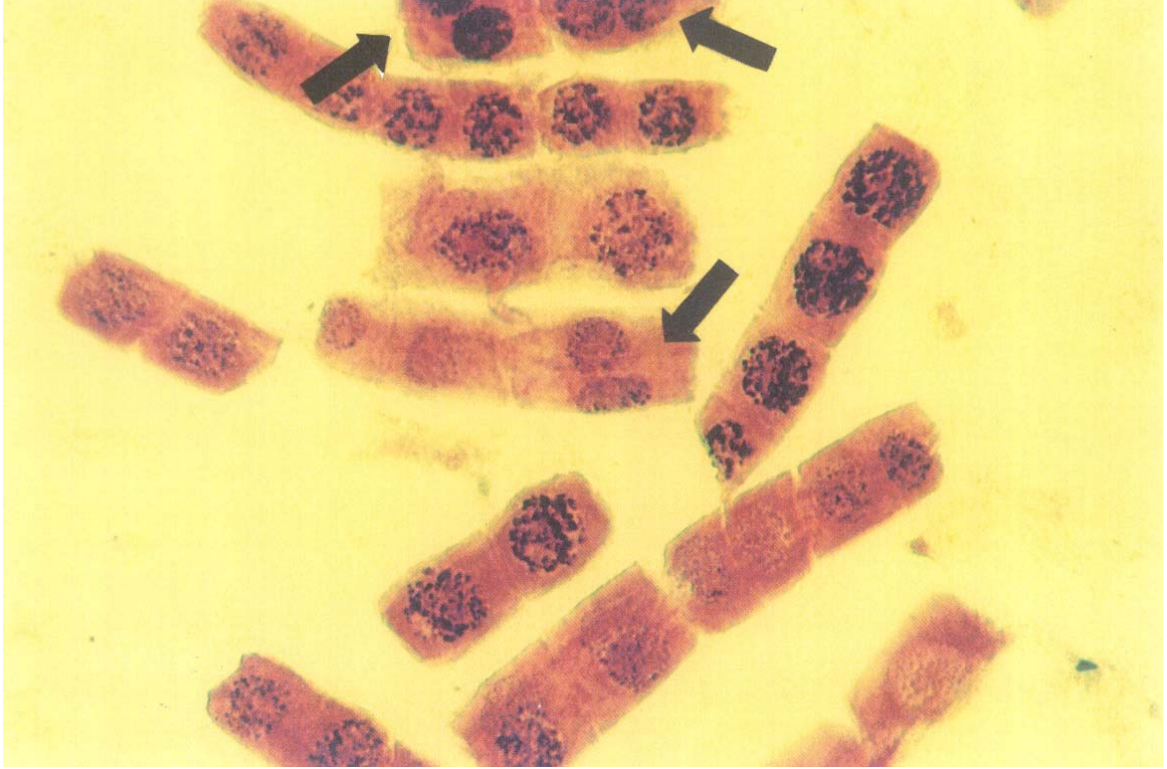
Şekil.4.5. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomlarında Fragmentasyon ve Oluşum Bozuklukları (x 40)



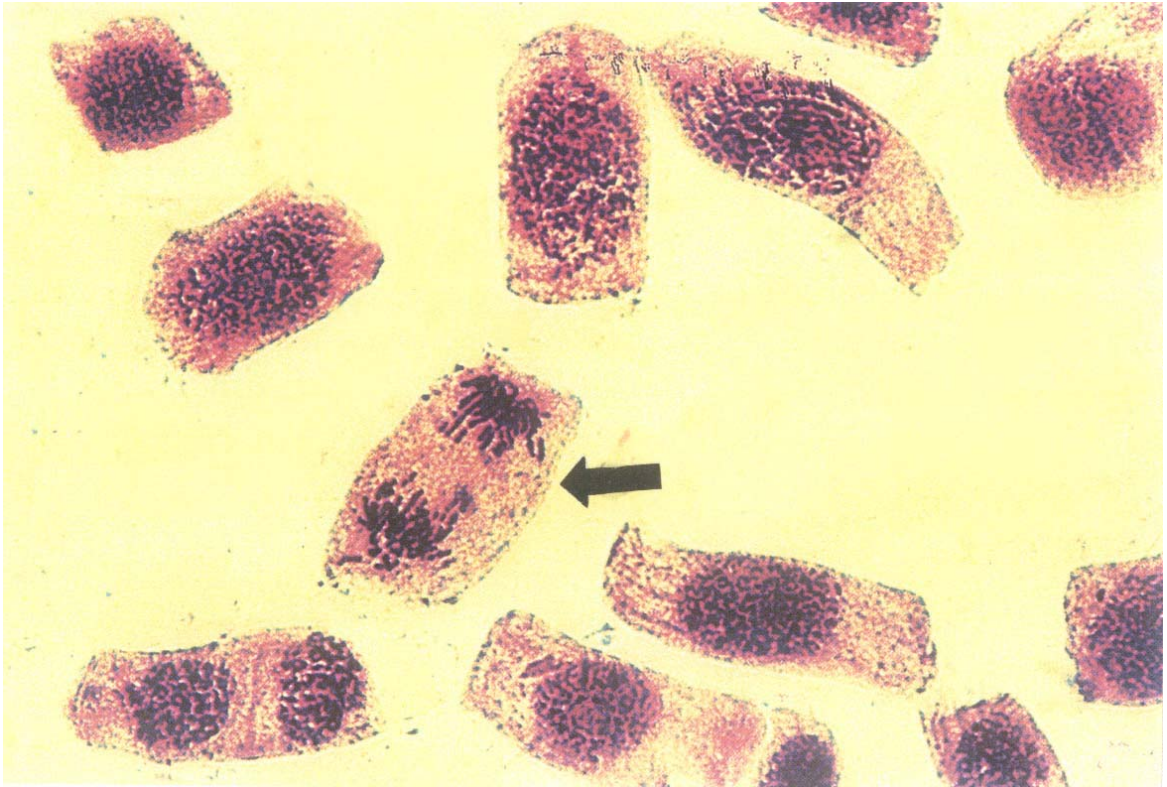
Şekil.4.6. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Nükleusu Olmayan Hücreler (x 10)



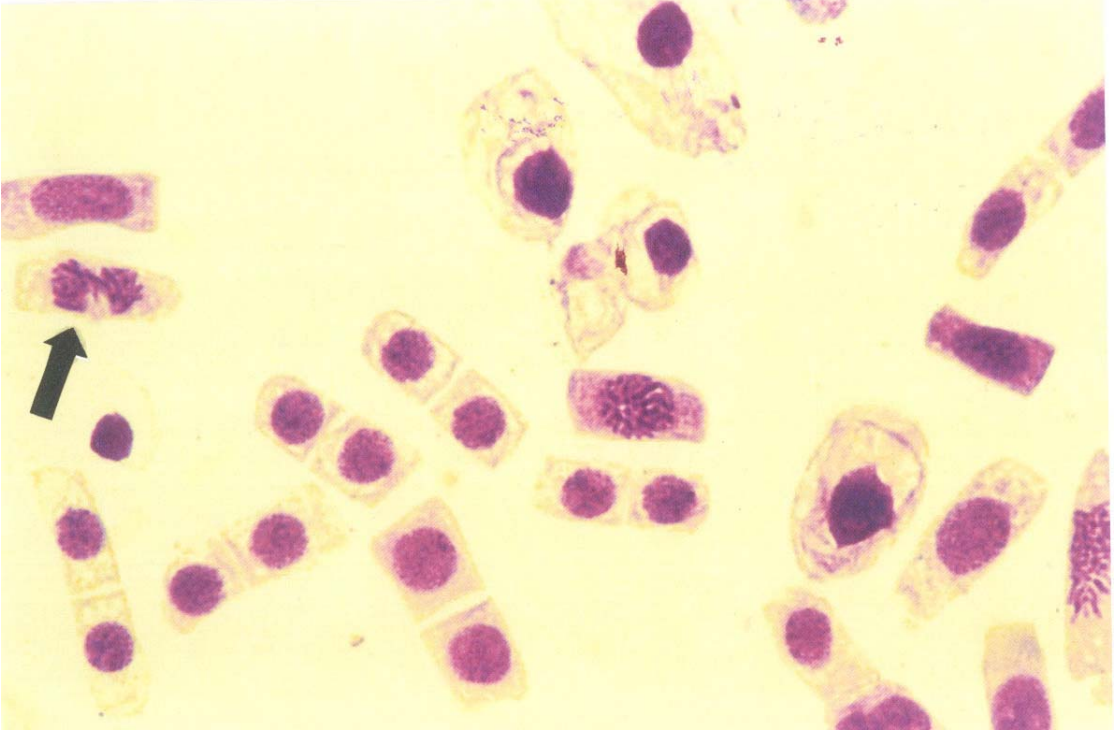
Şekil.4.7. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Nükleusun Odalara Ayrılması (x 40)



Şekil.4.8. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Çift Nükleuslu Hücre



Şekil.4.9. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Geri Kalma ve Fragmentasyon (x 40)



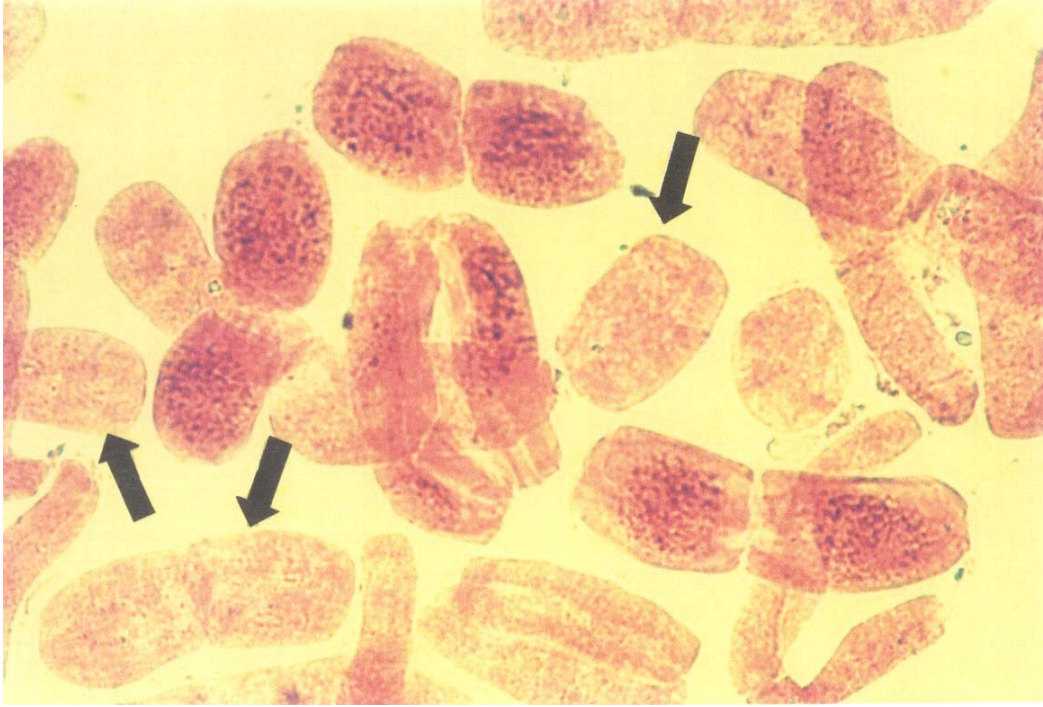
Şekil.4.10. Etoposid'in 0,1µg/ml Konsantrasyonunda Telofaz Başlangıcında Kromozom Köprüsü (x 40)

4.3.2. II. Doz Grubunda Görülen Anormallikler

1µg/ml konsantrasyonda hazırlanan II. Doz grubundaki *Allium cepa* meristematik dokularında; nükleussuz hücreler (Şekil.4.11.), mikronükleus (Şekil.4.12.), telofazda fragmentasyon (Şekil.4.13.), multipolar anafazda köprü oluşumları (Şekil.4.14.), kromozom oluşumunda kusurlar ve nükleusun odalara ayrılması (Şekil.4.15.), metafaz kromozomlarında yapışma (Şekil.4.16.), çift nükleuslu hücre ve nükleusta şekil bozuklukları (Şekil.4.17.) tespit edildi. II.Doç grubunda en sık, anafazda kromozom köprüleri ve mikronükleus oluşumları gözlemlendi.

II. Doç grubunda Etoposid konsantrasyonu 1µg/ml olup, profaz evresinde 130 normal, 43 anormal hücre tespit edildi. Profazda anormallik oran %

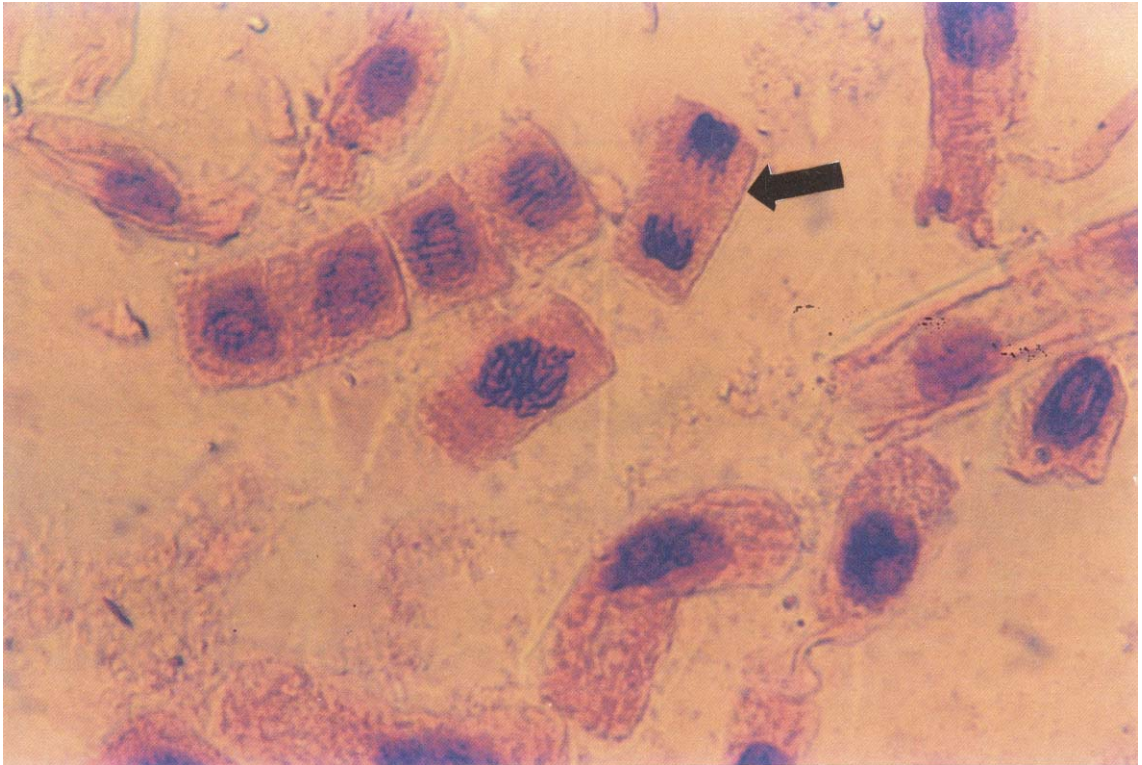
24.85'tir. Metafaz evresindeki normal safhanın görüldüğü hücrelerin sayısı 35 iken anormal safhada görülen hücrelerin sayısı 19'dur. Metafazda anormallik oranı % 35.18 olarak belirlendi. Anafaz evresi için normal hücreler 26, anormal hücreler 23 olarak sayıldı. Bu evredeki anormallik oranı % 46.93'tür. Telofaz evresinde 9 normal safhada, 5 anormal safhada hücre sayıldı. Telofaz evresine ait anormallik oranı % 35.71 olarak belirlendi.



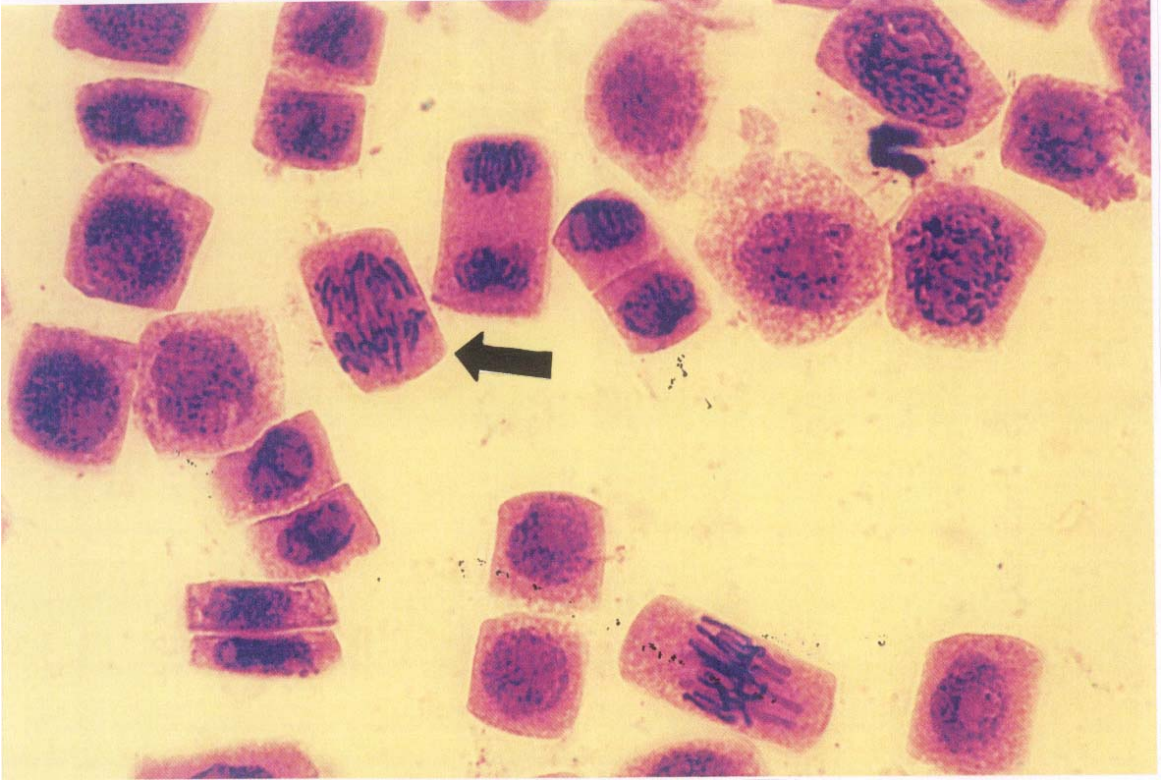
Şekil.4.11. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Nükleussuz Hücreler (x 40)



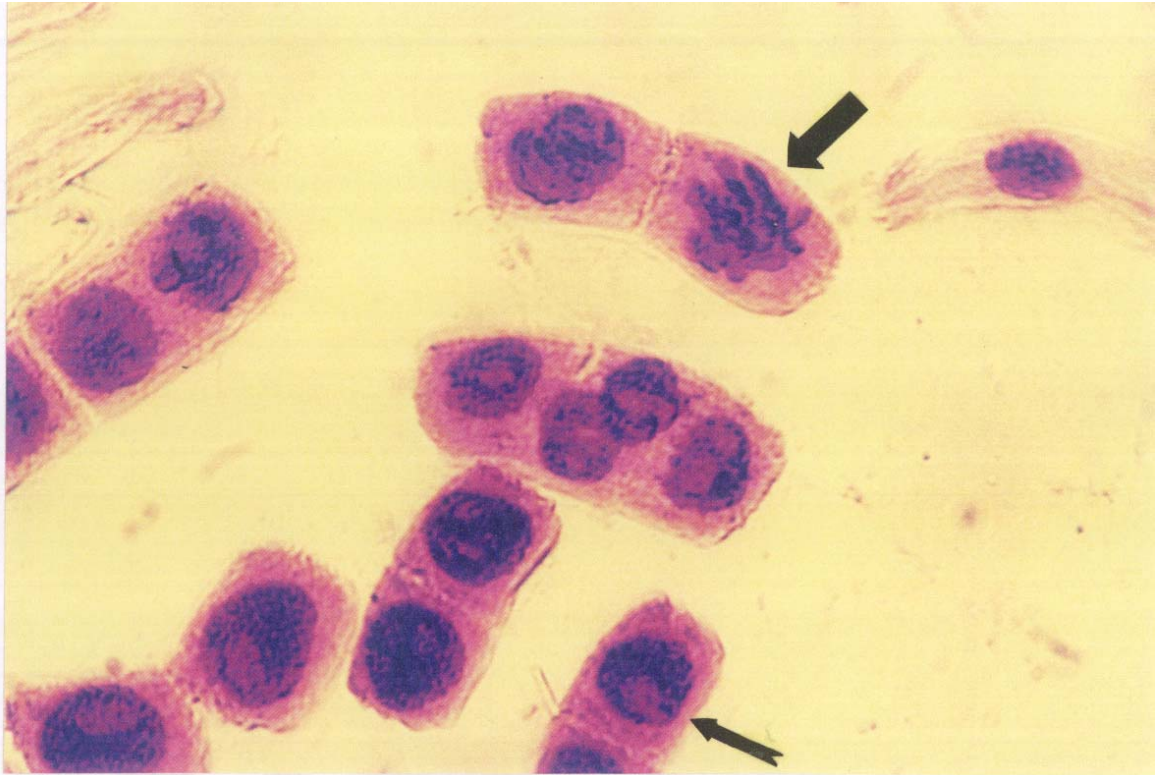
Şekil.4.12. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Mikronükleus (x 40)



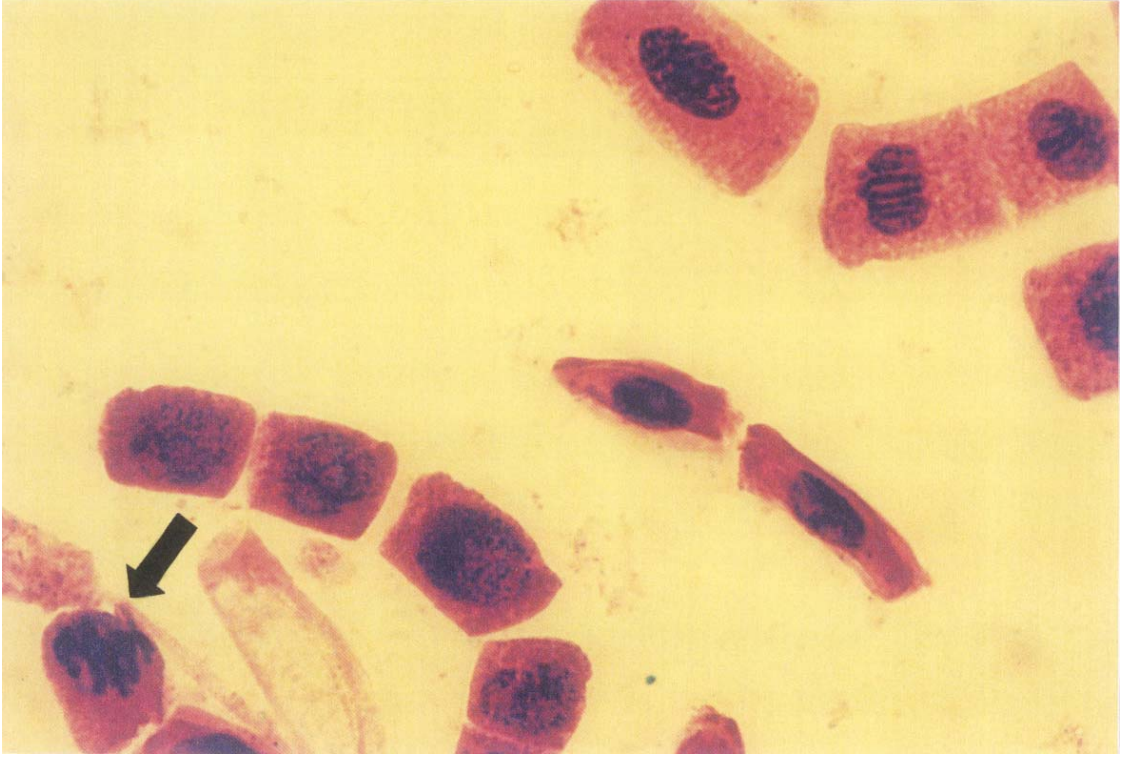
Şekil.4.13. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Telofazda Fragmentasyon (x 40)



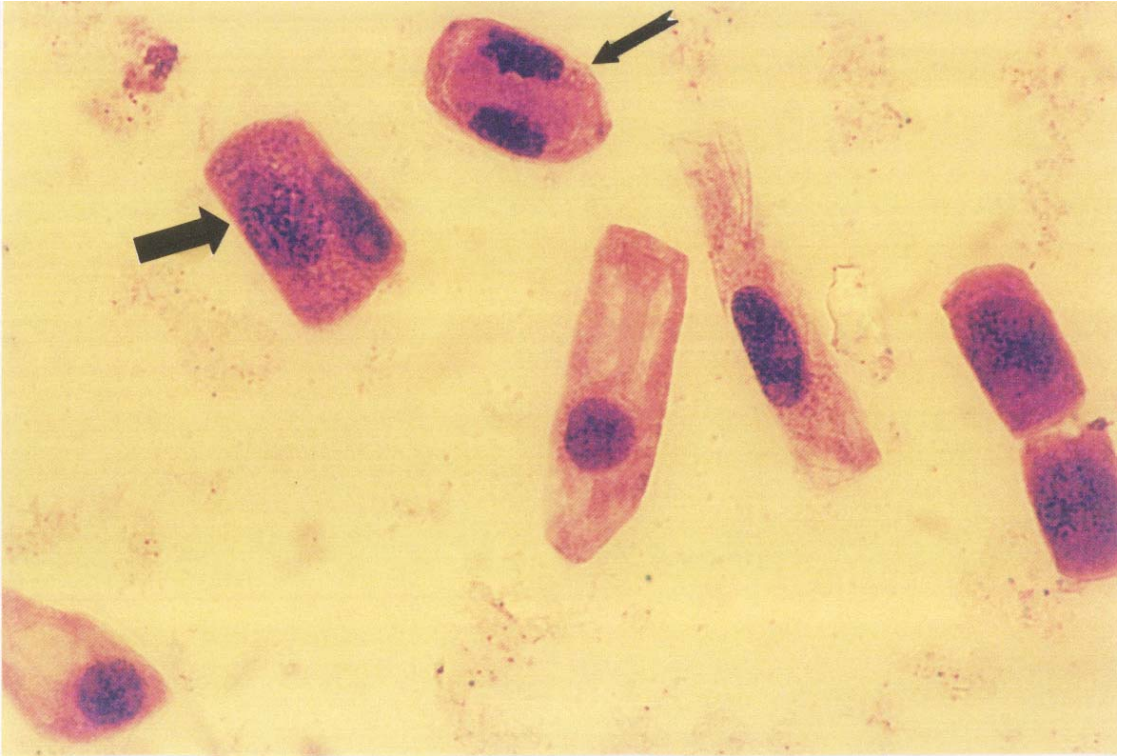
Şekil.4.14. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Multipolar Anafazda Köprü Oluşumları (x 40)



Şekil.4.15. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Kromozom Oluşumunda Kusurlar (Kalın Ok) ve Nükleusun Odalara Ayrılması (İnce Ok) (x 40)



Şekil.4.16. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomlarında Yapışma (x 40)



Şekil.4.17. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Çift Nükleuslu Hücre (Kalın Ok) ve Nükleusta Şekil Bozuklukları (İnce Ok) (x 40)

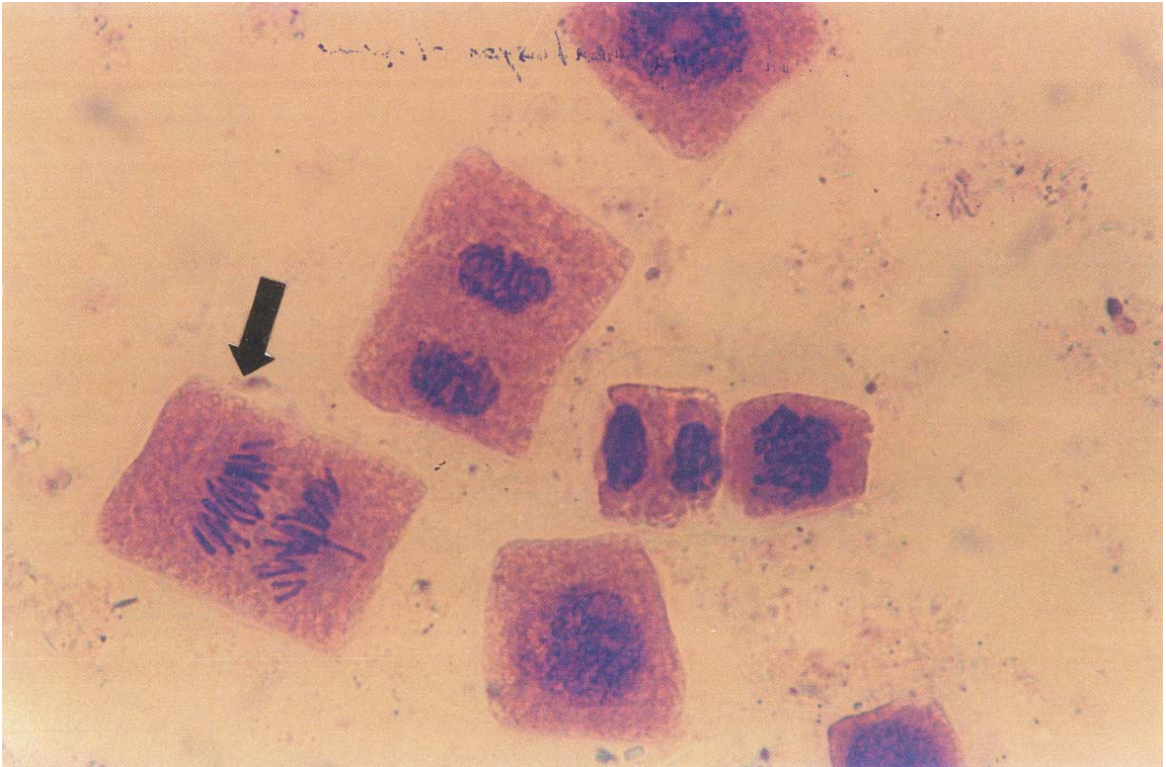
4.3.3. III. Doz Grubunda Görülen Anormallikler

10µg/ml konsantrasyonunda hazırlanan II. Doz grubunda bulunan *Allium cepa*'nın meristematik dokularında; metafaz kromozomlarında yapışma (Şekil.4.18.), anafazda asimetri (Şekil.4.19.), çift nükleusu bulunan hücreler (Şekil.4.20.), çok kutuplu uzamış metafaz kromozomları (Şekil.4.21.), anafazda geri kalma ve multipolar metafaz (Şekil.4.22.), metafazda kromozom yapışması ve kısalması (Şekil.4.23.), anafazda kromozom köprüsü ve odalara ayrılmış çok sayıda hücre (Şekil.4.24.) tespit edildi. III. Doz grubunda en çok kromozomlarda yapışma anormalliği ve çift nükleuslu hücreler görüldü.

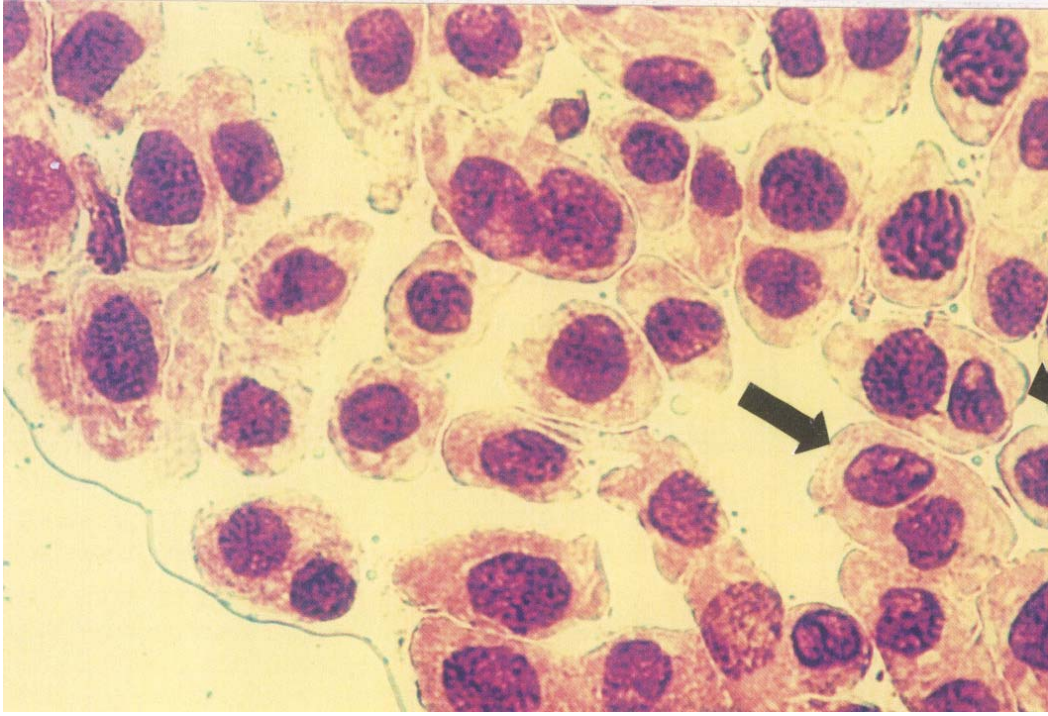
III. Doz grubunda (10µg/ml'de Etoposid konsantrasyonu) profaz evresi 41 normal, 10 anormal hücreye sahiptir. Bu evredeki anormallik oranı % 19.60 olarak hesaplandı. Metafaz evresinde ise 16 normal safhada, 14 anormal safhada hücre sayıldı. Metafazda anormallik yüzdesi % 46.66'dır. Anafaz evresinde bulunan 12 hücre normal, 5 hücre ise anormal safhada olup, anormallik oranı % 29.41'dir. Telofaz evresinde 5 normal, 1 anormal safhada hücre görüldü. Bu doz grubu için telofaz evresindeki anormallik oranı % 16.66 olarak tespit edildi.



Şekil.4.18. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomlarında Yapışma (x 40)



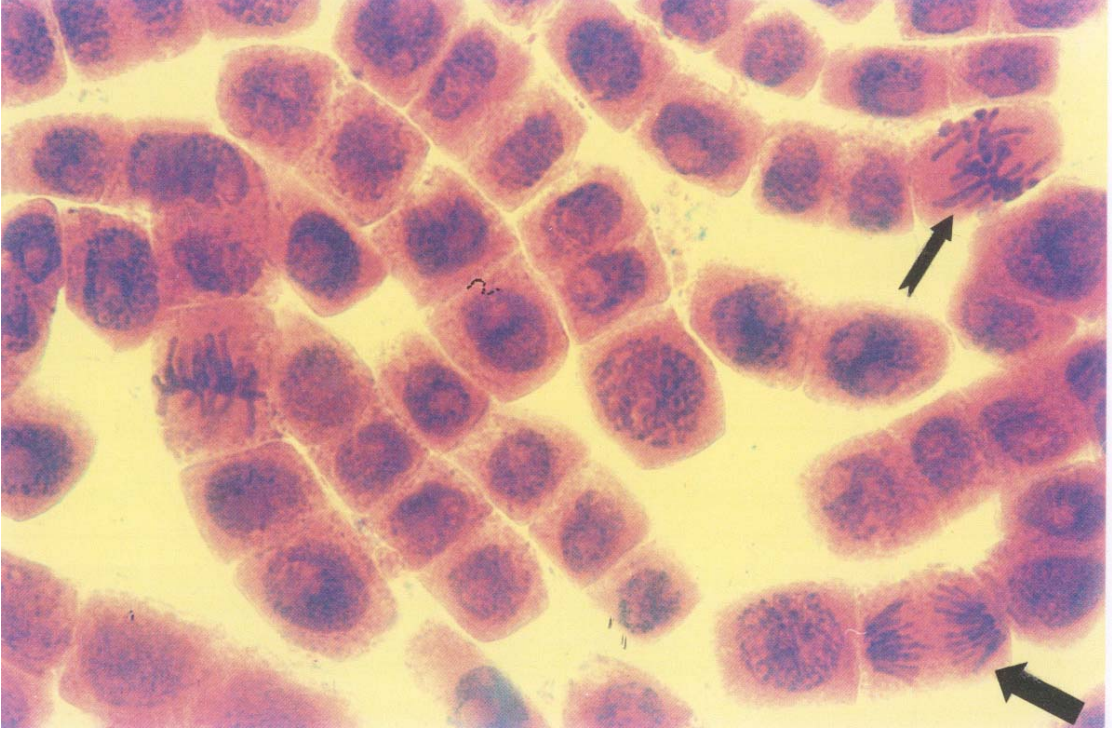
Şekil.4.19. Etoposid'in 1µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Asimetri (x 40)



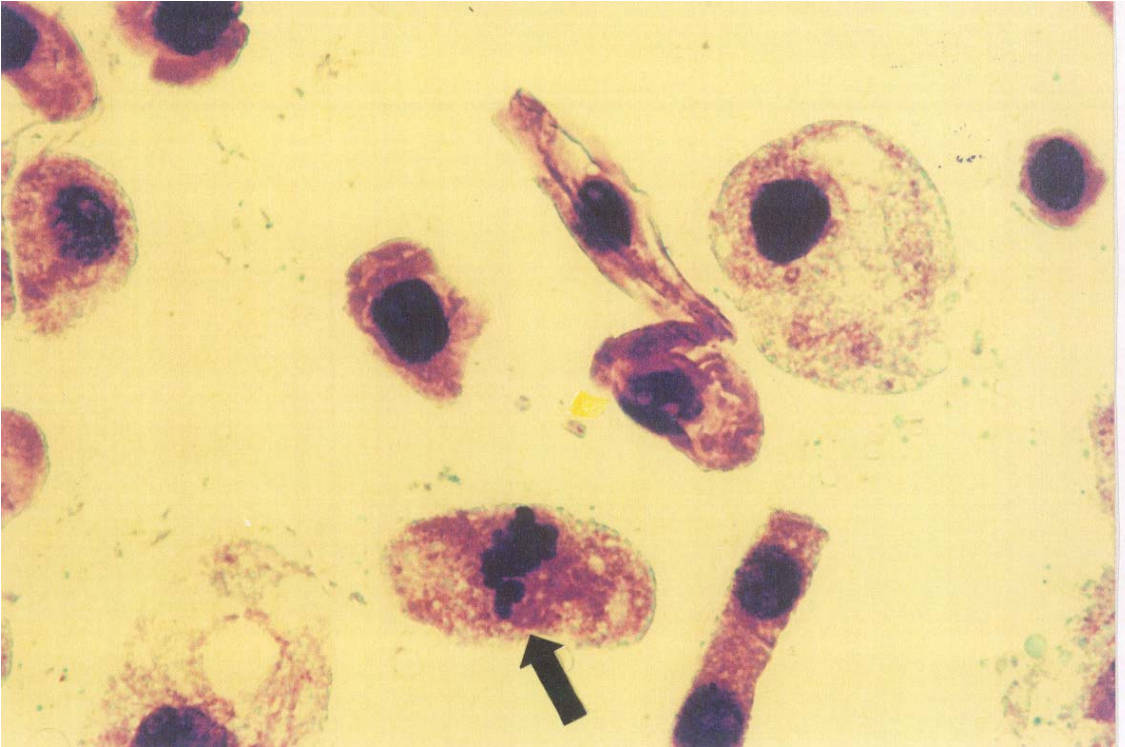
Şekil.4.20. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Çift Nükleusu Bulunan Hücreler (x 40)



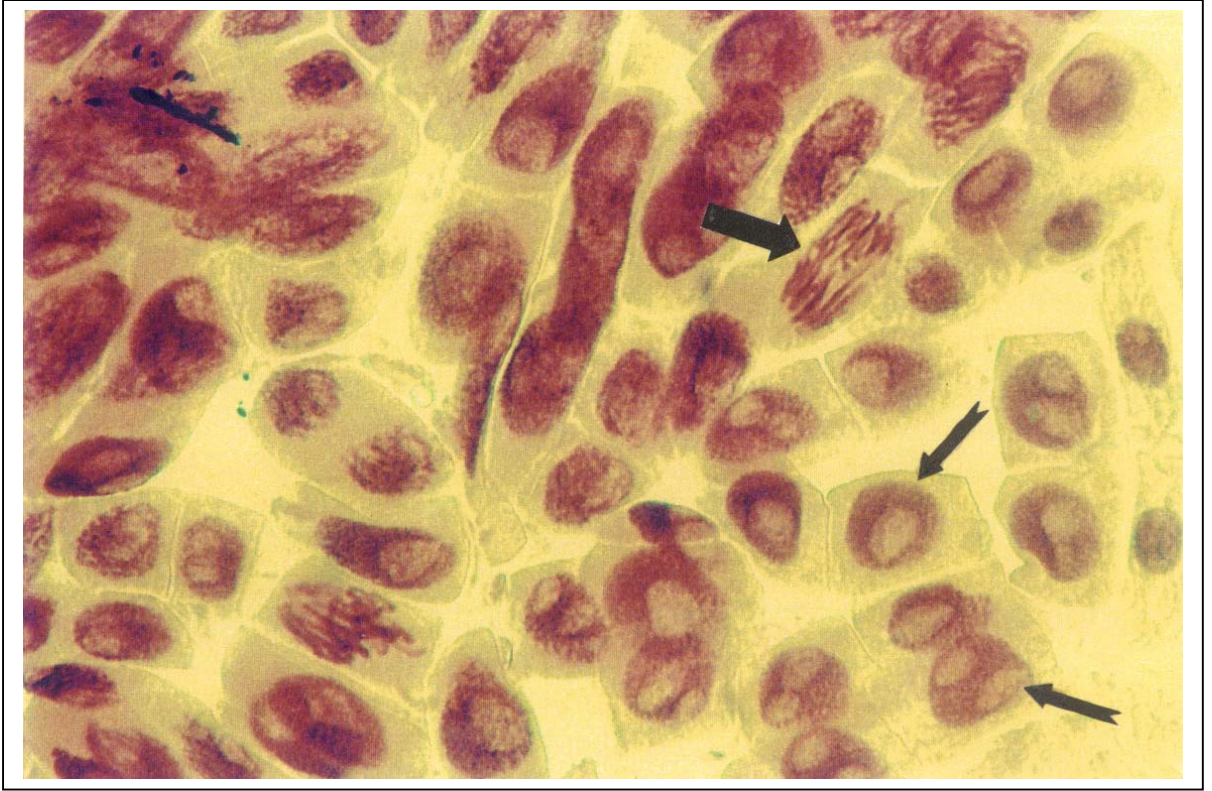
Şekil.4.21. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Çok Kutuplu Uzamış Metafaz Kromozomları (x 100)



Şekil.4.22. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Geri Kalma (Kalın Ok) ve Multipolar Metafaz (İnce Ok) (x 40)



Şekil.4.23. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Metafazda Kromozom Yapışması ve Kısalması (x 40)



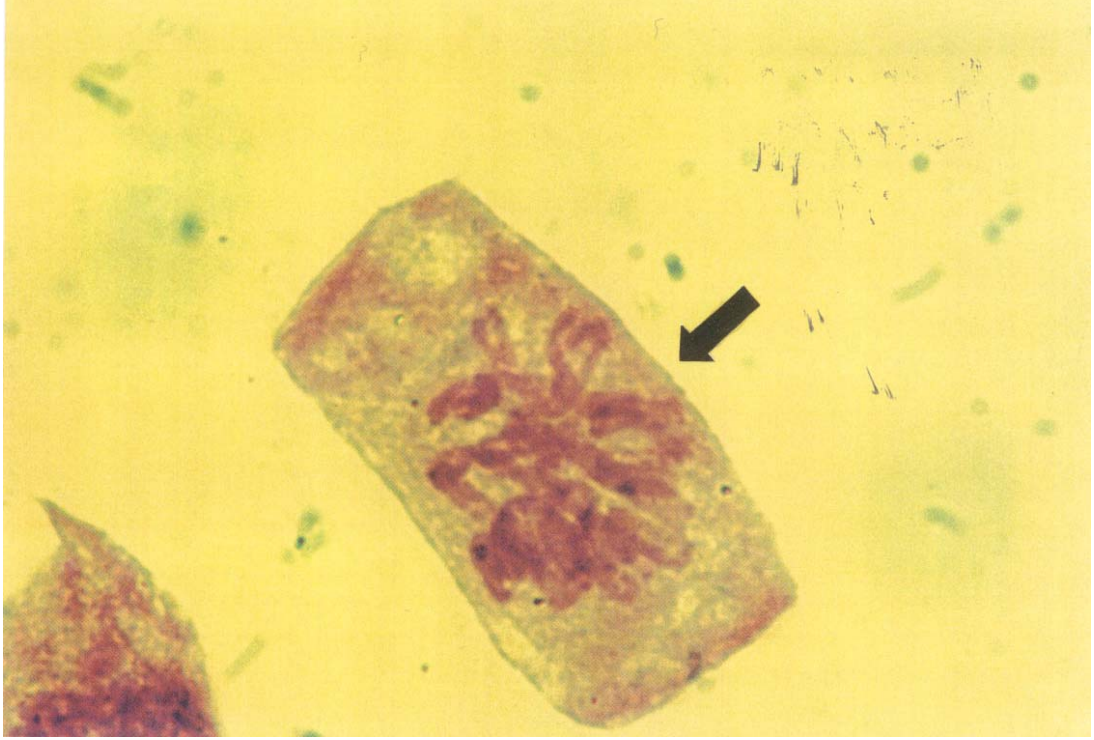
Şekil.4.24. Etoposid'in 10µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Kromozom Köprüsü (Kalın Ok) ve Odalara Ayrılmış Çok Sayıda Hücre (İnce Ok) (x 40)

4.3.4. IV. Doz Grubunda Görülen Anormallikler

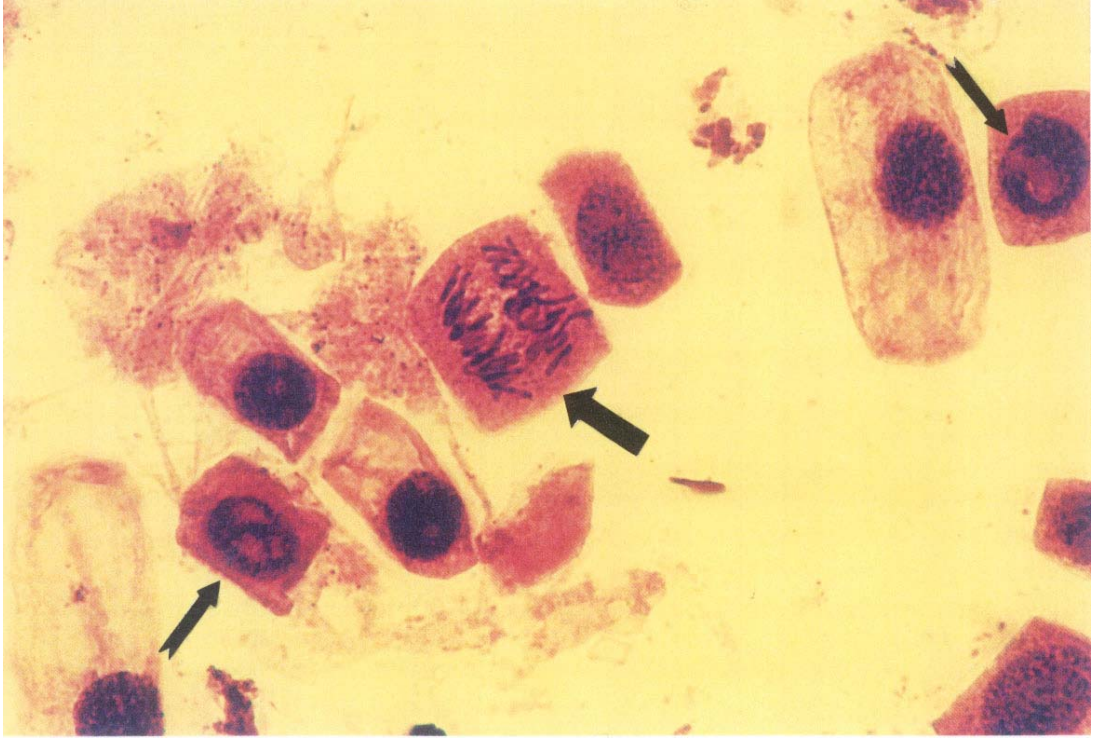
100 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan IV. Doz grubunda incelenen meristematik dokularda; metafaz kromozomlarında yapışma ve kalınlaşma kusurları (Şekil.4.25.), kromozom köprüsü ve nükleusun odalara ayrılması (Şekil.4.26.), metafazda bazı kromozomların ekvatora toplanamaması ve geri kalması (Şekil.4.27.), anafazda köprü oluşumu (Şekil.4.28.), mikronükleus (Şekil.4.29.) belirlendi.

En yüksek konsantrasyon olarak 100µg/ml'de Etoposid bulunduran IV. doz grubunda 5 normal, 2 anormal safhada hücre profaz evresinde görüldü. Bu evrede anormallik yüzdesi % 28.57 olarak saptandı. Metafazda ise, normal

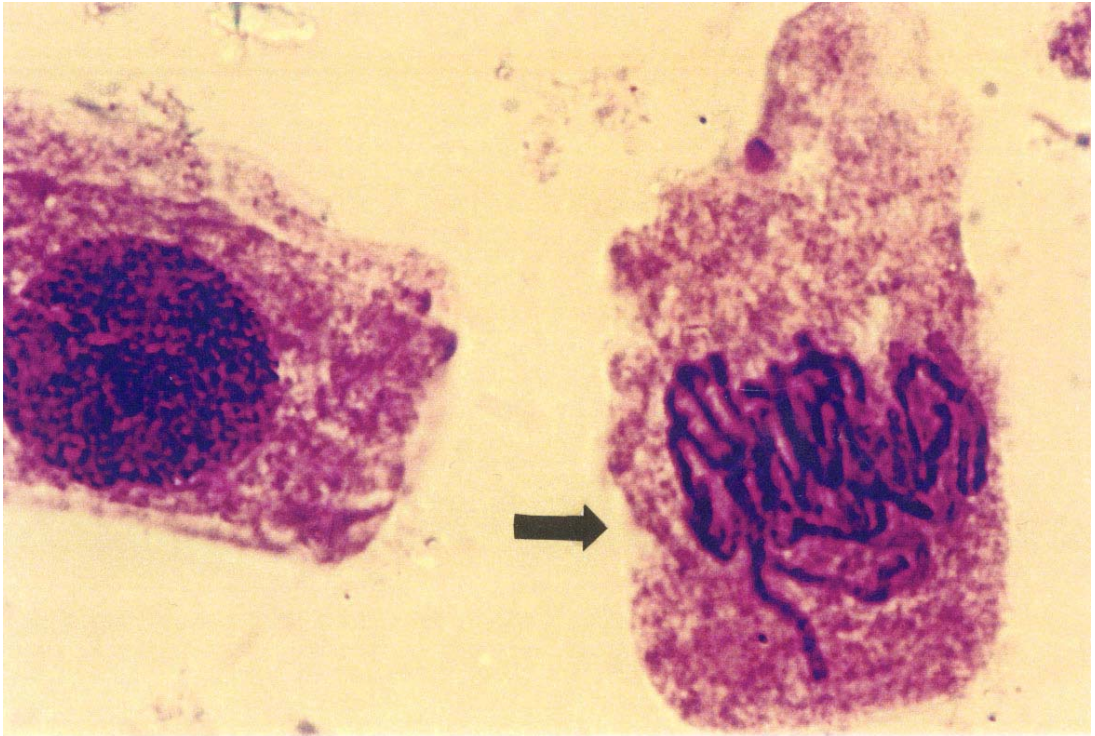
hücrelerin sayısı 3 iken anormal hücrelerin sayısı 1 olarak belirlendi. Metafazda anormallik oranı % 25 bulundu. Anafaz evresinde bu oran % 100'e çıkarken, sadece 3 anormal hücre tespit edildi. Telofaz evresindeki normal hücrelerin sayısı 2 olup, anormal hücre bulunamadı.



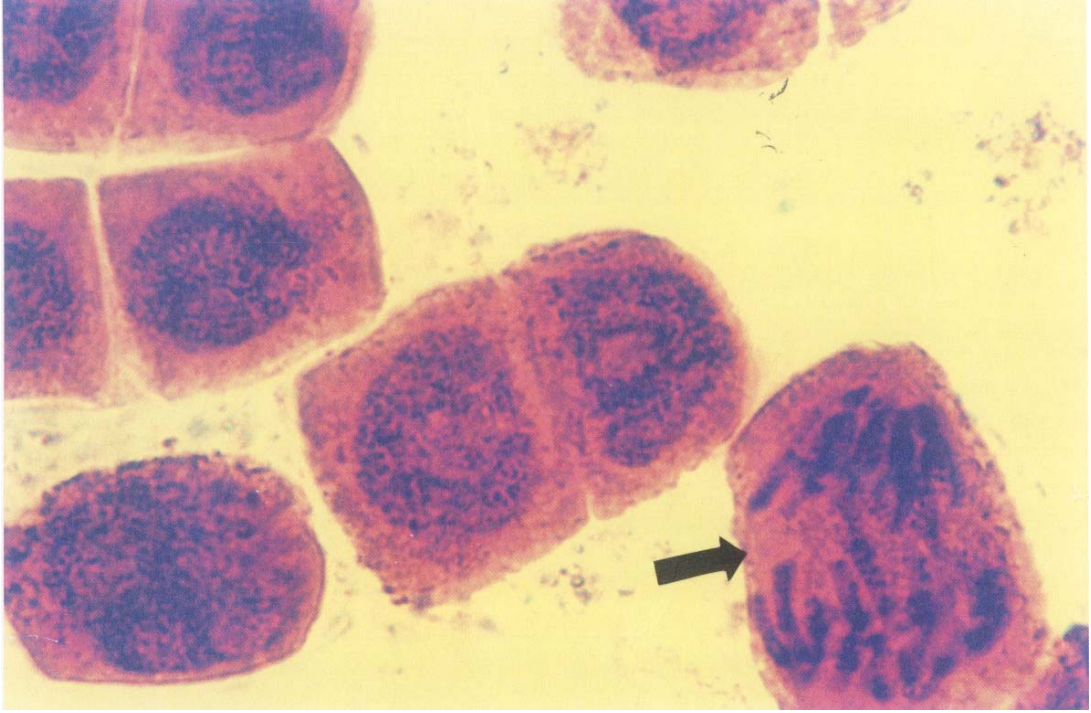
Şekil.4.25. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Metafaz Kromozomlarında Yapışma ve Kalınlaşma Kusurları (x 100)



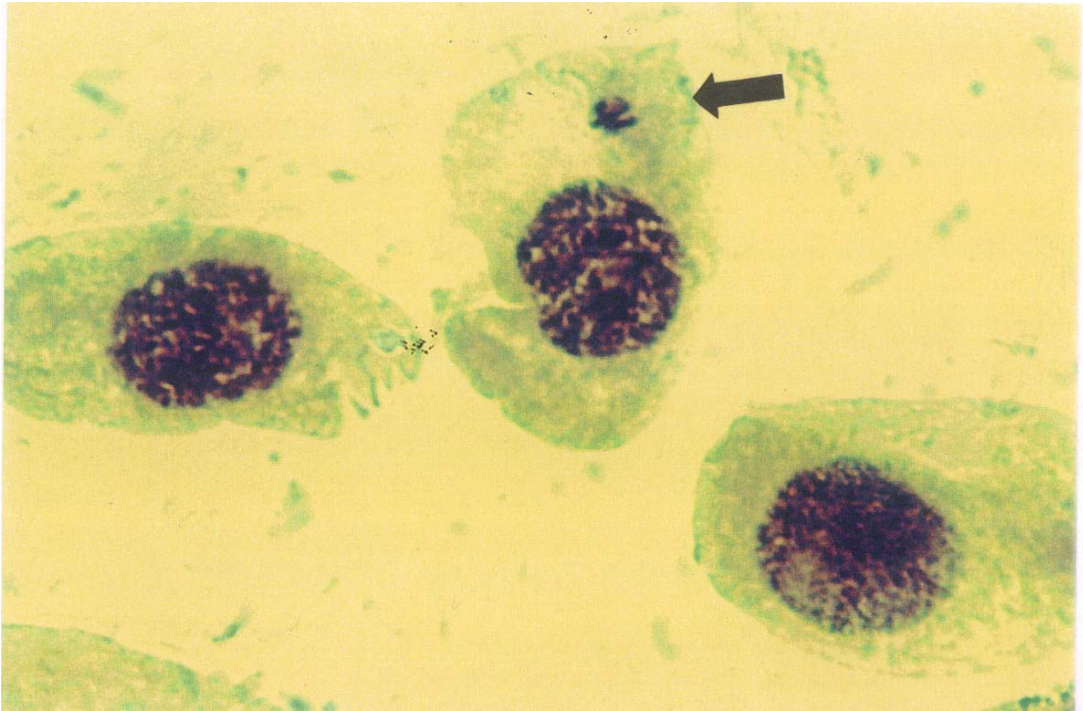
Şekil.4.26. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Kromozom Köprüsü (Kalın Ok) ve Nükleusun Odalara Ayrılması (İnce Ok) (x 40)



Şekil.4.27. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Metafazda Bazı Kromozomların Ekvatora Toplanamaması ve Geri Kalması (x 100)



Şekil.4.28. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Anafazda Kromozom Köprüsü (x 100)



Şekil.4.29. Etoposid'in 100µg/ml Konsantrasyonunda Mikronükleus (x 100)

5. TARTIŞMA

Allium cepa kök meristemleri, fiziksel ve kimyasal ajanların klastojenik etkilerini araştırmada tercih edilen bitki materyalleri arasındadır. İlk olarak 1938 yılında Levan tarafından, kolsişinin etkisini incelemek için kullanılmıştır. *Allium cepa* kök meristemleri test edilen kimyasalların geniş bir listesine sahiptir. Saklanması, işlenmesi kolaydır, ucuzdur. Ayrıca *Allium cepa* meristematik hücreleri mutajenlere karşı duyarlıdır. Makroskobik ve mikroskobik etkiler kolaylıkla gözlemlenebilir. Kromozomları büyük ve sayı bakımından az olduğu için mikroskobik gözlemlerde elverişlilik sağlar. Makroskobik olarak ise, kök büyümesinin engellenmesi önemli parametrelerden biridir. Böylece toksik etkinin ve potansiyel mutajenin mekanizmasıyla ilgili bilgi sağlamaktadır (Ennever and Andreano, 1988) .

Bu çalışmada genellikle insan ve hayvan kültürlerinde antikarsinojenik ilaç olarak kullanılan Etoposid, *Allium cepa*'nın meristematik dokusuna uygulandı. Etoposidin 4 farklı konsantrasyonu (0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml ve 100µg/ml) laboratuvar şartlarında hazırlandı. Memeli hücrelerinde Topoizomeraz II inhibitörü olan Etoposidin *Allium cepa* tohumlarında da etkili olup olmadığı araştırıldı, farklı kullanım alanlarında canlılar için tehdit oluşturup oluşturamayacağı irdelendi.

Kontrol grubu ve Etoposid ile muamele edilen gruplarda mitotik evreler bu çalışmada karşılaştırıldı. Kromatin profazda yavaş yavaş yoğunlaşmaya başladığından, yoğunlaşma anormalliklerinin fark edilebileceği metafaz ve anafaz hücreleri özellikle incelendi. Kontroldeki *Allium cepa* kromozomları kısa, şişmiş ve yoğunlaşmış iken Etoposidle işlem yaptığımız hücrelerdeki nükleuslar daha az yoğun, kromozomların ise daha uzun ve daha ince olduğu gözlemlendi. Topoizomeraz inhibitörlerinin etkileri hayvan hücrelerinde de kromozomların uzun ve nükleusların az yoğun olması şeklinde tanımlanmaktadır (Duncan *et al.*, 1993).

Bu çalışmada, Etoposid konsantrasyonu arttıkça kök büyümesinin azaldığı, özellikle 100µg/ml konsantrasyonda hemen hemen hiç kök büyümesinin olmadığı tespit edildi. Ayrıca yine konsantrasyon arttıkça, adventif (yan) kök gelişiminin inhibe olduğu ve mitotik indeksin düştüğü belirlendi. Böylece Etoposidin *Allium cepa* meristematik hücre çoğalması ile ters orantılı olarak mitoz bölünmeyi baskıladığı bulundu. Benzer sonuçlar, başka bir Topoizomerase inhibitörü olan ICRF-193 ile Xie and Lam (1994), Reddy et al. (1999) tarafından *Pisum* ve *Arabidopsis* bitkileri için rapor edilmiştir. Bu çalışma Etoposidin etkili bir şekilde bitki hücrelerinde de Topoizomerase II'yi engellediğini göstermektedir. Topoizomerase II aktivitesinin yokluğu da mitoz bölünmenin hatalı sonuçlanmasına ya da baskılanmasına neden olmaktadır.

Topoizomerase II inhibitörleri ile CHO, fare ve insan tümör hücreleri çalışmalarında yüksek dozlarda hücre ölümüne yol açtığı, araştırmalarda kullanılan dozlarda ise mitotik indekste azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. (Downes, 1991, Fry, 1991; Sequires, 1991; Bean, 1992). Bu çalışmada da belirgin olarak mitozda azalma bulunmuştur.

Mitozun engellenmesinin DNA sentezi esnasında meydana gelebilecek bir etki nedeniyle olabileceği de belirtilmektedir (Mohandes and Grant,1972). Hücre döngüsünün baskılanmasıyla spesifik proteinler, uygulanan kimyasal maddenin hedefi olmaktadır. Bundan dolayı DNA sentezi yada iğ oluşumunda direkt etkili birçok enzimin baskılanması, antimitotik etki olarak yorumlanmaktadır (Hidalgo et al., 1989). Ayrıca enerji üretim merkezinin fonksiyonunun baskılanmasının ve ATP seviyesinin düşmesinin de mitotik indekste düşüşe neden olabileceği bildirilmektedir (Topaktaş and Rencüzoğulları, 1996) . Bu nedenle Etoposidin mitokondriyal DNA üzerine etkileri de Topoizomerase çalışmalarının farklı bir boyutunu oluşturabilecek niteliktedir.

Downes (1991) yaptığı çalışmada Topoizomeraz inhibitörlerinin düşük konsantrasyonlarda etkilerini sadece anafazda gösterdiğini ve çekirdeksiz hücrelerin görüldüğünü rapor etmiştir. Bu çalışmada da 10µg/ml Etoposid uyguladığımız II. Doz grubu hücrelerinin bazılarında anafazda köprü ve çekirdeksiz hücreler meydana geldiği gözlemlendi. I. Doz grubunda da çekirdeksiz hücreler tespit edildi.

Topoizomeraz II inhibitörlerinden olan ICRF- 193, *Allium cepa* meristematik hücrelerine uygulandığında, anafaz safhasında kardeş kromatidler arasında köprüler meydana geldiği bildirilmiştir (Albian *et al.*, 2002). Bu çalışmada da düşük Etoposid konsantrasyonlarının bulunduğu I. ve II. Doz gruplarında yüksek miktarda anafaz köprüleri meydana geldiği görüldü. Bunun yanısıra kromozom yoğunlaşmasının tam olarak gerçekleştiği ve anafazda kromatid ayrımının başarıyla sonuçlandığı az miktarda hücrede tespit edildi. Benzer bir sonuç olarak, Duncan *et al.* (1993), kromozom yoğunlaşması ve anafazda kromatid ayrımının yapıldığı Topoizomeraz II mutantlı maya hücrelerini rapor etmiştir.

Bu araştırmada görülmüştür ki, 100µg/ml Etoposid konsantrasyonunda bazı hücreleri telofaz aşamasına kadar gelebilmiştir. Oysa ki bu sonuç, “Topoizomeraz II, kromozom ayrılması için gereklidir” diye belirtilen çalışmalara ters düşmektedir (Downes, 1991; Ishida, 1991; Zucker, 1991) . Nitekim Sumner (1998) memelilerde yaptığı çalışmada benzer sonuçlar bulmuştur. Sumner açıklamasında; sadece metafazdan oluşmuş kültürlerle inhibitör uygulandığında dahi, hücrelerde diplo-kromozomların varlığını tespit ettiğini belirtmektedir. Ayrıca, bunların kültürde az sayıda arta kalan interfaz hücrelerinden köken aldığı varsayılsa da “Topoizomeraz II kromozom ayrılması için gereklidir” hipotezinin gözden geçirilmesi gerekliliğini de ifade etmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda kromozomun anafaz ayrılmasında çeşitli kromozomal proteinlerle ilgili kanıtlar da Sumner’ı destekleyecek şekilde artmaktadır (Ghosh and Paweletz, 1992; Bhat *et al.*, 1996; Holloway *et al.*, 1997; Bickel and Wyman, 1997; Michaelis and Ciosk, 1997; Jörgensen

et al., 1998). Bu nedenle Topoizomeraz II'nin kromozomun anafaz ayrılmasında da yer aldığına dair doğrulanması önemlidir. (Sumner, 1998)

Topoizomeraz II ile ilgili literatürde farklı bilgiler mevcuttur. Buna rağmen, Topoizomeraz II enziminin yapı ve fonksiyon ilişkisinde katedilen yol büyüktür. Günümüzde Topoizomerazlarla ilgili çalışmalar henüz aydınlanma aşamasında olduğundan dolayı ileriye yönelik çalışmalar daha net sonuçlar verecektir. Nitekim, virüsler tarafından kodlanmış ilk Topoizomeraz II enzimi karakterize edilmiştir. (Oleg, 2000) Bu nedenle, ileriye yönelik bitki Topoizomeraz çalışmalarının bitkilerde tümöre neden olan virüs Topoizomeraz II inhibisyonu çalışmalarına kayması da beklenmektedir.

Yüksek bitkilerde de farklı sebeplerden kaynaklanan tümörler meydana gelmektedir. Örnek olarak virüslerin oluşturduğu yara tümörleri, genetiksel tümörler, kimyasal madde ya da ışınların oluşturduğu tümörler sayılabilir. Bitki ve hayvan tümörlerinin genetiksel gelişiminde birtakım farklar olmasına rağmen, ana mekanizma aynıdır. Hayvan tümörlerinin bitki tümörlerinden farkı metastasın olmayışıdır (Bangli *et al.*, 1979).

Ayrıca, yapılan yeni çalışmalarda Topoizomeraz II inhibitörlerinin herbisit olarak kullanımı da söz konusudur (Roca *et al.*, 1996). Nitekim, bazı antikarsinojenik ajanların soğan kök uçlarında anormal mitotik konfigürasyonlara neden olduğu da bilinmektedir (Grant, 1994). Bu amaçla yarı sentetik bir ürün olan Etoposidin herbisit aktivite çalışmaları da araştırılmıştır (Olivia *et al.*, 2002) .

Allium cepa üzerine yapılan bu çalışmada, literatürde hayvan ve insan hücre kültürlerinden elde edilen sonuçların benzerliğine dayanarak diyebiliriz ki Etoposidin *Allium cepa* üzerine yapmış olduğu hasarlar memelilerdeki genotoksisteyi de aynı yönde etkileyebilir. Etoposid gibi DNA replikasyonunu etkileyen bileşikler memelilerde de mitoz girişini baskılar.

Böyle bileşikleri herbisit olarak geliştirmek zararlıdır. Nitekim, toksik maddelerin bitkilerde birikmesi besin zinciri yoluyla diğer canlılara da geçmesi demektir. Etoposid bu yolla da memeliler de toksikolojik problemlere neden olabilir. Hatta Etoposidin mutajenik ve karsinojenik etkileri de bilindiğinden dolayı herbisit olarak kullanımı zararlı olabilecektir. Kullanılan Etoposid konsantrasyonu burada dikkatle seçilmelidir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada Topoizomeraz II inhibitörü ve antikarsinojen bir madde olan Etoposidin farklı konsantrasyonları laboratuvar ortamında hazırlanarak *Allium cepa* tohumlarına çimlenmelerinden itibaren uygulandı. Meristematik dokudan alınan materyale aseto- orsein uygulanarak ezme preparasyon yöntemi ile preparatlar hazırlandı. Kök uzunlukları, mitotik indeks ve kromozom anormallikleri belirlendi. Bu farklı kriterler Mann Whitney U ve Ki-Kare testleriyle istatistiksel olarak analiz edildi.

Araştırma sonuçları, Etoposid konsantrasyonlarının artışı ile ters orantılı olarak kök uzamasının azaldığını göstermiştir. Fakat bu sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Bu çalışma, bütün ökaryotlarda bulunan Topoizomeraz II'nin *Allium cepa* hücrelerinde de Etoposid tarafından inhibe edildiğini ve çoğalma (proliferasyonla) ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Topoizomeraz II aktivitesinin yokluğunun, mitoz bölünmenin hatalı sonuçlanmasına yada baskılanmasına neden olduğu anlaşıldı.

Etoposid konsantrasyonu ile mitotik indeks arasında ters bir orantının olduğu, fakat mitotik indeks ve kök uzaması arasında tam bir ilişki tespit edilemedi.

Etoposidin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı doz gruplarında birbiriyle aynı ve birbirinden farklı kromozom hasarları da saptandı. I. Doz grubunda, en fazla nükleusu olmayan hücreler görüldü; II. Doz grubunda, en fazla anafazda kromozom köprüleri ve mikronükleus oluşumları gözlemlendi. III. Doz grubunda ise en çok kromozomlarda yapışma anormalliği görüldü.

Yapılan bu çalışma, Etoposidin herbisit olarak kullanımında ortaya çıkacak tehlikenin boyutunu göstermesi bakımından da önemlidir. Kullanılacak dozların miktarlarına dikkat edilmediği takdirde, Etoposidin bitki dokularında meydana getirdiği zararlı etkilerin, hayvanlar ve insanlarda da benzer şekilde ortaya çıkacağı açıktır.

Hücrelerin proliferasyonunda görevli diğer enzimlere göre Topoizomerez II enzimi ile yapılan çalışmalar yeni bir alan teşkil etmektedir. İleriye yönelik olarak, kanser hücrelerinin enerji üretimlerini baskılamak amacıyla yapılacak çalışmalarda, bu tip hücrelerin mitokondriyal DNA'larına Topoizomerez inhibitörlerin uygulanmasının kanser tedavisinde daha belirgin sonuçlar vermesi beklenmektedir. Ayrıca, virüslerin kodladığı Topoizomerezlar ve bunların bitki tümörlerine etkileri, Topoizomerez inhibitörlerinin herbisit ve antibakteriyel kullanımda çalışmalarının farklı bir boyutunu oluşturabilecek niteliktedir.

Sonuç olarak, Topoizomerez ailesinin üyelerinin tanınması, biyolojik rollerinin netlik kazanması, detaylı yapısal bilgilerinin oluşturulması, daha etkili antibakteriyel, antikanser hedeflerin Topoizomerezlar için geliştirilmesi ve inhibitörlerinin etkilerinin araştırılması bu alanda yeni ufukların açılmasına ve çift sarmal bakış açımıza derinlik kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

- 1-Alberts B. , Molecular biology of the CELL. Third edition, Garland Publishing. Inc, 1994.

- 2-Albian J.F., Clarke DJ., Martin G. and Bobre L. , DNA catenations that link sister chromatids until the onset of anaphase are maintained by a checkpoint mechanism. Eur. J. Cell Biol. Vol: 81 (1) , 9-16, 2002.

- 3-Austin C.A. and Marsh K.L., Eukaryotic DNA topoisomerase II β . Bioassays Vol: 20, 215-226, 1998.

- 4-Backer L.C., Genotoxicity of inhibitors of DNA topoisomerase I (camptothecin) and II (m-AMSA) in vivo and in vitro . Mutagenesis Vol: 541-547, 1990.

- 5-Bae Y., A shuttle vector for analysis of illegitimate recombination in mamalian cells : effects of DNA topoisomerase inhibitors on deletion frequency. Gene Vol: 101, 285-289, 1991.

- 6-Bangi N., Serafini-Fracassini D., Polyamines and plant tumors. The Italian Jour. Biochem. Vol: 28(5) , 392-394, 1979.

- 7-Baybek F., Adriamcyin invitro insan lenfosit kltrleri üzerindeki etkileri. İ.. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik ABD Yüksek Lisans Tezi, 1995.

- 8-Bean CL., Effect of sampling time on chromosome abberation yield for 7 chemicals in chinese hamster ovary cells. Mutation Research. Vol: 265, 31-44, 1992.

- 9-Beck W., Mo Y. and Bhat G., Cytotoxic signalling by inhibitors of DNA topoisomerase II. Biochemical Society Transactions. Vol :29, part 6, 2001.
- 10-Bedows A. and Hatfield GM., An investigation of the antiviral activity of *Podophillum peltatum*. J. Nat. Prod. Vol: 45,725, 1982.
- 11-Berger J.M., Fass D., Wang J. and Harrison S.C., Structural similarities between topoisomerases that cleave one or both DNA strands. Proc. Natl.Acad. Sci. Vol: 95, pp. 7876-7881, 1998.
- 12- Bhat M.A., Philip A.V. and Glover D.M., Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with topoisomerase II. Cell Vol: 87: 1103-1114, 1996.
- 13- Bickel S.E. and Wyman D.W., Mutational analysis of the Drosophila sister-chromatid cohesion protein ORD and its role in the maintenance of centromeric cohesion. Genetics Vol: 146: 1319-1331, 1997.
- 14- Brutlag D., DNA Topoisomerases. Biochemistry 201 Advanced Molecular Biology January 7, 2000.
- 15-Burden D., Kingma S. and Osheroff N., Topoisomerase II Etoposide Interactions Direct the Formation of Drug-induced Enzyme-DNA Cleavage Complexes. The Journal of Biological Chemistry Vol: 271, No : 46, 29238-29244, 1996.
- 16-Carballo M., Gine R., Santos M. and Puigdomenech P., Characterization of topoisomerase I and II activities in nuclear

extracts during callogenesis in immature embryos of *Zea mays*.
Plant Mol. Biol. Vol: 16 (1) : 59-70, 1991.

17- Chen A.Y. and Liu L.F., DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. Annual Review of Pharmacology and toxicology Vol: 34, 191, 1994.

18- Chung T.D.Y., Drake F.H., Tan K.B., Per S.R., Crooke S.T. and Mirabelli C.K., Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes Proc. Natl. Acad. Sci. Vol: 86, 9431-9435, 1989.

19- Cook P., Chromomeric model of nuclear and chromosome structure Journal of Cell Science Vol: 108, 2927-2935, 1995.

20- Cooper M., The Cell – a molecular approach. ASM press and Sinaver Associates, Inc., 1997.

21- Cortes F., DNA Topoisomerase activities in Chinese Hamster radiosensitive mutants after X- ray treatment . Cell Biology International. Vol: 26, 547-555, 2002.

22- Cortes F. and Pastor N., High yield of endoreduplication induced by ICRF-193. Mutation Research. Vol: 26, 516(1-2), 2002.

23- Cozzarelli N.R., DNA topoisomerases. Cell Vol: 22, 327-328 , 1990.

24- Crick F.H.C., Wang J.C. and Bauer W.R., Is DNA really a double helix? J. Mol. Biol. Vol: 129, 449-457, 1979.

- 25- Dayan F.E., Hernandez S.N., Allen R.M., Moraes J., Vroma A., Avery M.A. and Duke S.O., Comparative phytotoxicity of artemisinin and several sesquiterpene analogues. *Phytochemistry* Vol: 50, 607, 1999.
- 26- Dayan F.E., Watson S.B., Galindo J.C.G., Hernandez J. and Duke S.O., Phytotoxicity of quassinoids: Phyological responses and structural requirements. *Pestic. Biochem. Physiol.* Vol: 65, 15, 1999.
- 27-Del Bino G., Diverse effects of camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, on the cell cycle of lymphocytic (L 1210, MOLT-4) and myelogenous (HL-60, KG1) leukemic cells. *Cancer Research* Vol: 50, 5746-5750, 1990.
- 28-Dingemans A., Clinical resistant to topoisomerase-targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta.* Vol: 1400, 275-288, 1998.
- 29-Downes C.S., Inhibitors of DNA topoisomerase II prevent chromatid separation in mamalian cells but do not prevent exit from mitosis. *Proc. Natt. Acad. Sci. USA* Vol: 88, 8895-8899, 1991.
- 30-Drake F.H., In vitro and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor Agent Merborone cancer Research. Vol: 49, 2578-2583, 1991.
- 31- Drake F.H., Zimmerman J.P., McCabe F.L., Bartus H.F., Per S.R., Sullivan D.M., Ross W.E., Mattern M.R., Johnson R.K. and Crooke S.T., Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* Vol: 262(34), 16739-47, 1987.

- 32-Duguet M., DNA Topoisomerase from rat liver : Physiological variations. *Nucleic Acids Research* Vol: 11, 1059-1075, 1983.
- 33-Duncan J., Robert T. and Downes S., Topoisomerases II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks. Vol: 105, 563-569, 1993.
- 34- Earnshaw W.C., Halligan B., Cooke C.A., Heck M.M.S. and Liu L.F., Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds, *J. Cell Biol.* Vol: 100, 1706–1715, 1985.
- 35-Ennever F.K. and Andreano G., The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. *Mutation Research* Vol: 205, 99-105, 1988.
- 36- EORTC, Cancer Chemotherapy / 7 , The EORTC Cancer Chemotherapy annual. New York 98-104, 1985.
- 37-Errington F., Murine transgenic cells lacking DNA topoisomerase II β are resistant to acridines and mitoxantrone : Analysis of cytotoxicity and cleavable complex formation. *Molecular Pharmacology* Vol: 56:1309-1316, 1999.
- 38-Fry A.M., Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in Human Tumor Cell lines. *Cancer Research* 6592-6595, 1991.
- 39-Fukata H., Muchida A., Maruyama N. and Fukasawa H., Chloroplast DNA topoisomerase I from cauliflower. *J. Biochem* Vol: 109 (1) , 127-31, 1991.

- 40-Gangloff S., The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. The EMBO Journal Vol:18, No : 6 pp.1701-1711, 1999.

- 41- Gasser S.M., Laroche T., Falquet J., Boy de la Tour E., and Laemmli U.K., Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II, J. Mol. Biol. Vol: 188, 613–629, 1986.

- 42- Gellert M., DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. Vol: 50, 879-910, 1981.

- 43- Gellert M., Martin A., Mizuuchi G., O'Dea M.H. and Nash K., DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol: 73, 3872-3876, 1976.

- 44- Ghosh S. and Paweletz N. , Okadaic acid inhibits sister chromatid separation in mamalian cells. Exp Cell Res. Vol: 200, 215-217, 1992.

- 45-Goodman L.S. and Gilman A., The pharmacological basic of therapeutic, Macmillan, New York (NY), 1994.

- 46-Gökmen Y., Bazı *Allium* Türlerinde Sitotaksonamik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi,Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1987.

- 47- Grant W., The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. Mutation Research Vol: 310,175-185, 1994.

- 48-Grant F.W., Chromosome aberration assays in *Allium*. Mutation Research. Vol: 99,275-291,1982.

- 49- Heck M.M.S. and Earnshaw W.C., Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. J. Cell Biol. Vol: 103, 2569-2581, 1986.
- 50- Heck M.M.S., Hittleman W.N., and Earnshaw W.C., Differential expression of DNA topoisomerase I and II during the eukaryotic cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol: 85,1086-1090, 1988.
- 51-Hidalgo A., Navas P. and Garcia G., Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by protham and chlorprotham. Cytobios Vol: 57(228), 7-14,1989.
- 52- Holloway S.L., Glotzer M. and King R.W., Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation promoting factor. Cell Vol: 73, 1393- 1402, 1997.
- 53-Holm C., Goto T. and Wang JC., DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. Cell Vol: 41, 553-63, 1985.
- 54-Holm C., Stearns T. and Botstein D., DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. Mol. Cell Biol. Vol: 9 (1) , 159-68, 1989.
- 55-Hsiang Y.H., Proliferation dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. Cancer Research. Vol: 48, 3230-3235, 1988.
- 56-Ishida R., Inhibition of intracellular topoisomerase II by antitumor bis (2,6-dioxopiperazine) derivatives : Mode of cell growth inhibition distinct from that of cleavable complex-forming type inhibitors. Cancer Research Vol: 51, 4909-4916,1991.

- 57- Jörgensen P.M., Brundell E. and Höög C., A subunit of the anaphase promoting complex is a centromere- associated protein in mamalian cells. *Moll Cell Biol.* Vol: 18, 486-476, 1998.
- 58- Katoh M.A., Famele spesific dominant lethal effects in mice. *Mutation Research.* Vol: 230, 205-217, 1990.
- 59-Kaufmann S.H., Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide,camptothecin and other cytotoxic anticancer drugs : A cautinory note. *Cancer Research* Vol: 48, 5870-5878, 1989.
- 60- Kieber J.J., Lopez M.F., Tissier A.F. and Signer E., Purification and properties of DNA topoisomerase I from broccoli. *Plant Mol Biol.* Vol: 18, 865-71, 1992.
- 61-King R.C. and Stansfield W.D., A dictionary of Genetics, Oxford University Press., 1990.
- 62-Kornberg A., DNA Replication, WH. Freeman Company. 2. Edition, 1992.
- 63-Koshl D. and Stronnikov A., Mitotic chromosome condensation. *Annual Rev. Dev. Biol.* Vol: 12 , 305-333, 1996.
- 64-Lemoine D. and Neoptolemos A., Cancer, A molecular Approach. Blackwell Scientific Publications, 1994.

- 65- Levan A., The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. Hereditas Vol: 24, 471-486, 1938.
- 66- Lewis C.D. and Laemmli U.K., Higher order metaphase chromosome structure: Evidence for metalloprotein interactions. Cell Vol: 29, 171–181, 1982.
- 67- Liu L.F., DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. Annual Review of Biochemistry Vol: 58, 351, 1989.
- 68- Lopez-Saez J.F. and Gimenez Z., Expression in *Allium cepa* L. chromosomes. Mikrosk. Anat., 75, 591-600, 1966.
- 69-Manuel F., Natural Plant Chemicals Sources of Industrial and Medicinal Materials. Science. Vol: 228, 1154-6, 1985.
- 70-Maraschin J., Chromosome aberration induced by etoposide (VP-16) are not random. Int. Journal Cancer. Vol: 46 , 808-812,1990.
- 71-Markovits J., Topoisomerase II – mediated DNA breaks and cytotoxicity in relation to cell proliferation and the cell cycle in NIH 3T3 fibroblasts on L1210 leukemia cells. Cancer Research. Vol: 4 , 2050-2055,1987.
- 72-Markovits J., Inhibitory effects of the Tyrosine kinase inhibitor genistein on mamalian DNA topoisomerase II. Cancer Research. Vol: 49, 511 – 517,1989.
- 73- Matagne R., Radiat. Bot. Vol: 8, 489-497, 1968.

- 74- Meistrich M.L., Low levels of chromosomal mutations in germ cells derived from doxorubicin treated stem spermatogonia in the mouse. *Can. Res. Vol: 50, 370-374, 1990.*
- 75- Meyer K.N., Kjeldsen E. and Staub T., Cell cycle –coupled relocation of type I and type II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J. Cell Biol. Vol: 136, 775-788, 1997.*
- 76- Mizushima Y., Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Biochem. J. Vol: 350 , 757-763, 2002.*
- 77- Michaelis C. and Ciosk R., : Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell Vol: 91, 35-45, 1997.*
- 78- Mohandes T. and Grant W.F., Cytogenetic effects of 2,4-D and amitrol in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants. *Can. J. Genet. Cytol. Vol: 14, 773-778, 1972.*
- 79- Moreno D  az de la Espina SM., Nuclear matrix isolated from plant cells. *Int Rev. Cytol. Vol: 162B, 75-139, 1995.*
- 80- Musk S., The inhibition of cellular recovery in human tumors cells by inhibitors of topoisomerase. *Br. J. Cancer Vol: 62, 364-367, 1990.*
- 81- NC-IUB., International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzyme-Catalysed Reactions: Enzyme Nomenclature 1984 of IUB. Academic Press, New York, 1984.

- 82-Nersessian A.K., Inhibitory effect of rat immunization with tularemia vaccine on the in vivo clastogenicity of 4 anthracycline antibiotics. Mutation Research. Vol: 260 , 215-218,1991.
- 83- Nuti Ronchi V. and Arcara P.G., The chromosome breaking effect of 6-methylcoumarin in *Allium cepa* in relation to the mitotic cycle. Mutation Res. Vol: 4, 791-796, 1967.
- 84-Oleg V., Topoisomerase II from Chlorella Virüs PBCV. Vol: 275, No: 10; 6915-6921, 2000.
- 85-Olivia A., Moraes M., Watson B., Duke O. and Dayan E., Aryltetralin Lignans Inhibit Plant Growth by Affecting the formation of Mitotic Microtubular Organizing Centers. Pesticide Biochemistry and Physiology Vol: 72, 45-54, 2002.
- 86-Osheroff N., DNA topoisomerases. Biochimica et Biophysica Acta Vol: 1400, 1-2, 1998.
- 87-Passarge E., Color Atlas of Genetics. Theime, 1995.
- 88- Paulson J.R. and Laemmli U.K., The structure of histone- depleted metaphase chromosomes. Cell Vol: 12, 817-828, 1977.
- 89-Perez C., Vilaboa E., Bermejo L., Blas E. and Aller P., Differentiation of U-937 promonocytic cells by etoposide and ICRF-193, two antitumour DNA topoisomerase II inhibitors with different mechanisms of action. J of Cell Science. Vol: 110,337-343,1997.
- 90-Perrin D., Van H. and Hill BT., Differential sensitivities of recombinanat human topoisomerase II alpha and beta to various

classes of topoisomerases II- interacting agents. Biochemical Pharmacology Vol: 56, 503, 1998.

- 91-Pfeifer K., Merz H., Steffen R., Muller W.E.G., Trumm S., Schulz J., Eich E. and Schroder HC., In-vitro anti-hiv activity of lignans - differential inhibition of hiv-1 integrase reaction, topoisomerase activity and cellular microtubules. J Pharm Med. Vol: 2, 75-97 ,1992.
- 92- Pommier Y. and Zwelling L.A., Effects of DMSO and thiourea upon intercalator- induced DNA single strand breaks in mouse leukemia (L-1210) cells. Cancer Research. Vol: 43, 5718-5724, 1983.
- 93- Pommier Y., Sister chromatid exchanges,chromosomal aberrations and cytotoxicity produced by antitumor topoisomerase II inhibitors in sensitive (DC3f) and resistant (DC 3f / 9-OHE) Chinese hamster cells. Cancer Res. Vol: 48, 512-516, 1998.
- 94- Poot M., Cell cycle effects of the DNA topoisomerase inhibitors camptothecin and m-AMSA in lymphoblastoid cell lines from patients with fanconi,anemia. Mutation Research Vol: 270, 185-189, 1992.
- 95- Potmesil M., Resistance of human leukemic and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA topoisomerase II. Cancer Research Vol: 48, 3537-3543,1988.
- 96-Preston G.M., Effects of the DNA topoisomerase II inhibitor, VM-26 on transcriptional initiation in vitro. Life Sciences Vol: 46 , 1309-1318,1990.

- 97- Prosperi E., Nergi G. and Marchese G., Expression of 170kDA and 180kDA isoforms of DNA topoisomerase II in resting and proliferating human lymphocytes. *Cell Prolif.* Vol: 27, 257-267, 1994.
- 98- Reddy M.K., Nair S., Tewari K.K., Mudgil Y., Yadav B.S. and Sopory S.K., Cloning and characterization of a cDNA encoding topoisomerase II in pea and analysis of its expression in relation to cell proliferation. *Plant. Mol. Biol.* Vol: 41:125-37, 1999.
- 99- Roca J., Berger J.M., Harrison S.C., and Wang J.C., Evidence for a Two-Gate Mechanism. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* Vol: 93,4057-4062,1996
- 100- Russel G.B., and Fenemore P.G., Insect control chemicals from plants III. *Aust. J. Biol. Sci.* Vol: 29, 99,1986.
- 101- Sequires S., Deoxyquanosine enhances the cytotoxicity of the topoisomerase I inhibitor camptothecin by reducing the repair of double strand breaks induced in replicating DNA. *Journal of cell science*, Vol: 100, 883-893,1991.
- 102- Shin C.G., Rapid evaluation of topoisomerase inhibitors : Caffeine inhibition of topoisomerase in vivo. *Teratogenesis,Carcinogenesis and Mutagenesis* Vol: 10, 41-52, 1990.
- 103- Sinha B.K., Topoisomerase inhibitors. A review of theirtherapeutic potential in cancer. *Drugs.* Vol: 49, 11-19, 1995.
- 104- Sipahioğlu H., Onkoloji, medikal onkolojide tedavi prensipleri ve protokolleri, 1981.

- 105- Smith P.J, and Soues S., Multilevel therapeutic targeting by topoisomerase inhibitors. Br. J. Cancer , Vol: 23, S47, 1994.
- 106- Stryer L., Biochemistry., Press. Stryer,1994.
- 107- Sumner A.T., Induction of diplochromosomes in mammalian cells by inhibitors of topoisomerase II. Chromosoma. Vol: 107, 486-490, 1998.
- 108- Sumner A.T., Inhibitors of topoisomerases do not block the passage of human lymphocyte chromosomes through mitosis. Journal of Cell Science Vol: 103, 105-115, 1992.
- 109- Temizkan G., Genetik II - Moleküler Genetik, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, sayı 4067, 1999.
- 110- Topaktaş M. and Rencüzoğulları E., Genotoxic effects of marshal in *Allium cepa* L., T.R. Journal of Botany, Vol: 20; 481-487, 1996.
- 111- Uemura T. and Yanagida M., Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. EMBO J. Vol: 3(8), 1737-44, 1984.
- 112- Vizan J.L., The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by E: Coli DNA gyrase. The EMBO Journal Vol: 10, 467-476,1991.
- 113- Wang J.C., Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. J. Mol. Biol. Vol: 55, 523-533, 1971.

- 114- Wang J.C., DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. Vol: 54, 665-697, 1985.
- 115- Wang J.C., DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. Vol: 65, 635-692, 1996.
- 116- Wang J.C. and Roca J., DNA transport by a type II DNA topoisomerases: evidence in favor of a two gate mechanism. Cell Vol: 77, 609, 1994.
- 117- Wang J.C. and Roca J., The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. Cell Vol: 71, 833, 1992.
- 118- Wang J.C., Caron P.R., Kim R.A., The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? Cell Vol: 62, 403, 1990.
- 119- Watson J. D. and Crick F. H. C., Molecular Structure of Nucleic Acids. Nature, Vol: 171, 737-738, 1953.
- 120- Wozniak A.J., DNA damage as a basis for 4' - Demethylepipophyllotoxin-9- (4,6-O-Ethylidene- β -D-glucopyranoside) (Etoposide) cytotoxicity. Cancer Research, Vol: 43, 120-124, 1983.
- 121- Xie S. and Lam E., Abundance of nuclear DNA topoisomerase II is correlated with proliferation in *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res. Vol: 22, 5729-36, 1994.
- 122- Zucker R.M., Polyploidy induction as a consequence of topoisomerase inhibition. Biochemical Pharmacology Vol: 42, 2199-2208, 1991.

ÖZGEÇMİŞ

14. 04. 1975 yılında Diyarbakır'da doğdu. 1993 yılında 50. Yıl Avcılar İnsa Lisesi'nden mezun oldu. 1998'de İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünün Hücre ve Doku Kùltürleri Kùmesini bitirdi. Aynı yıl evlendi. 1999 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisansa başladı. 2001 yılında Web Master eğitimi aldı. Yabancı dili ingilizcedir.

EKLER

1. α -monobromonaftalin Çözeltisinin Hazırlanması

250 ml. distile su içine 4-5 damla α -monobromonaftalen damlatıldı, çözülmenin gerçekleşmediği görülene kadar (çözelti doyana kadar) çalkalandı. Karışım her defasında taze olarak hazırlandı.

2.Aseto-Orsein Boyasının Hazırlanması

45 ml. asetik asit balonjoje içinde ve ısıtıcıda yaklaşık 2 saat kaynatıldı. Kaynamış olan asetik asit içine 2 gr. toz orsein eklenip eritildi. Eriyik soğuduktan sonra üzerine 55 ml. distile su ilave edilip süzüldü. Oda sıcaklığında depo edildi.

3.Carnoy fiksatifinin Hazırlanması

3 birim %96 Alkol ve 1 birim % 45'lik asetik asit karıştırıldı ve oda sıcaklığında depo edildi.

4.Albumin-Mayer Hazırlanması

Günlük bir yumurtanın akı akışkanlık kazandırabilmek için cam bagetle kuvvetlice karıştırıldı. Ardından 1 gece boyunca filtre kağıdından süzüldü. Süzülen yumurta akı kadar gliserin (1 albumin : 1 gliserin) ile karıştırıldı. Mantarların üremesini önlemek amacıyla karışıma pirinç büyüklüğünde timol katıldı. Buzdolabında depo edildi.