



DAPAGLİFLOZİN'İN GENOTOKSİSİTESİNİN
***Drosophila melanogaster*'de COMET, SMART VE DAVRANIŞ**
TESTLERİYLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zebiha YİĞİT

Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK

ANABİLİM DALI

Haziran 2024

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DAPAGLİFLOZİN'İN GENOTOKSİSİTESİNİN
Drosophila melanogaster'de COMET, SMART VE DAVRANIŞ
TESTLERİYLE ARAŞTIRILMASI

Zebiha YİĞİT

Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran 2024

TEZ ONAY SAYFASI

Zebiha YİĞİT tarafından hazırlanan “Dapagliflozin’in Genotoksisitesinin *Drosophila melanogaster*’de Comet, Smart ve Davranış Testleriyle Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 01 / 08 / 2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

Başkan : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Nilay İŞİTEZ
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YALÇIN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

28 / 06 / 2024

Zebiha YİĞİT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DAPAGLİFLOZİN'İN GENOTOKSİSİTESİNİN *Drosophila melanogaster*'de COMET, SMART VE DAVRANIŞ TESTLERİYLE ARAŞTIRILMASI

Zebiha YİĞİT

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

Bu çalışmada bir sodyum glikoz kotasıyıcı inhibitörü olan, tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) tedavisinde kullanılan ve klinik araştırmalarda karaciğer hasarının yanı sıra ilaç kullanımına bağlı bildirilen mesane ve meme kanseri vakalarının yarattığı endişe nedeniyle Dapagliflozin'in (DAPA) olası genotoksik ve sitotoksik etkilerinin *Drosophila melanogaster* üzerinde araştırılması amaçlanmıştır. DAPA, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi izleme listesindedir ve ülkemizde de ek izleme listesinde yer alan bir ilaçtır. DAPA kullanımına bağlı olarak meme ve mesane kanser vakaları bildirilmesine rağmen hayvan deneylerinde kanser bulgusuna rastlanmamıştır. Ancak insan üzerindeki potansiyel etkileri hakkındaki bilgi eksikliği nedeniyle DAPA'nın genotoksik değerlendirmelerinin yapılması ve değerlendirmeler sonucu kullanımının tekrar gözden geçirilmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışma ile DAPA'nın 0.1, 1, 5 ve 10 mM olmak üzere dört farklı konsantrasyonunun *D. melanogaster* üzerinde davranış toksisitesi ve Comet testi ile DNA hasar tespiti araştırılmıştır. Bunun yanı sıra DAPA'nın 0.225, 0.45 ve 0.9 mM olarak belirlenen üç farklı konsantrasyonu ile genotoksik potansiyeli *Drosophila* Smart testi ile değerlendirilmiştir. Yapılan davranış toksisitesi deneylerinin sonuçlarına göre, larval ağırlıkta kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiş ve 1, 5, 10 mM'lık dozlardaki bu

azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Larval sürünme ve negatif jeotaksis deney sonucunda ise son doz olan 10 mM’lık uygulama grubundaki azalmalar istatistiksel olarak anlam ifade etmiştir. Ergin birey oluşturma başarısında ise 5 ve 10 mM’lık uygulama gruplarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, pupa oluşturma başarısı, pupa pozisyonu ve ergin birey ağırlık deneylerinde meydana gelen değişimler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak herhangi bir anlam ifade etmemiştir. *D. melanogaster*’de gerçekleştirilen Comet testi sonuçlarında kontrol grubu değerlerine kıyasla gerçekleşen değişimler tüm uygulama gruplarında anlamlı bulunmuştur. Smart test sisteminde ise 0.225, 0.45 ve 0.9 mM’lık uygulama dozlarından sadece son doz olan 0.9 mM’lık uygulama grubundaki frekans artışları istatistiksel olarak anlamlıdır.

Yaygın kullanım alanına sahip olan DAPA’nın daha önceki yıllarda güvenilirlik açısından piyasadan bir kez kaldırılmış ve sonrasında piyasaya tekrar sürülmüş olması, bu farmasötik ajanın farklı etkilerinin ortaya çıkarılması noktasında değişik test sistemleri ile değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. DAPA ile ilişkili bu test sistemleri ile elde edilen verilerin literatüre ilk kez kazandırılmış olması bu çalışmanın önemini artırıp, temel bir çalışma niteliği taşımaktadır.

2024, xiii + 89 sayfa

Anahtar Kelimeler: Comet, *Drosophila melanogaster*, Dapagliflozin, Davranışsal toksisite, Genotoksisite, Smart.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION of GENOTOXICITY of DAPAGLIFLOZIN in *Drosophila melanogaster* using COMET, SMART and BEHAVIORAL TESTS

Zebiha YİĞİT

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Arzu ÖZKARA

This study aimed to investigate the possible genotoxic and cytotoxic effects of Dapagliflozin (DAPA), a sodium glucose cotransporter inhibitor used in the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM), on *Drosophila melanogaster* due to the concern raised by liver damage as well as bladder and breast cancer cases reported due to drug use in clinical studies. DAPA is on the United States Food and Drug Administration watch list and is a drug on the additional watch list in our country. Although breast and bladder cancer cases have been reported due to dapagliflozin use, no cancer findings have been found in animal experiments. However, due to the lack of information about its potential effects on humans, it is very important to conduct genotoxic evaluations of DAPA and to reconsider its use as a result of these evaluations.

This study investigated the behavioral toxicity of four different concentrations of DAPA, 0.1, 1, 5 and 10 mM, on *D. melanogaster* and DNA damage detection with the Comet assay. In addition, the genotoxic potential of DAPA with three different concentrations determined as 0.225, 0.45 and 0.9 mM was evaluated with the *Drosophila* Smart test. According to the results of the behavioral toxicity experiments, a decrease in larval weight was detected compared to the control group and this decrease at doses of 1, 5 and 10 mM was found to be statistically significant. In the results of the larval crawling and negative geotaxis experiments, the decreases in the last dose of 10 mM were found to be statistically significant. While the changes in the exit success in the 5 and 10 mM

application groups were found to be statistically significant, the changes in the pupa formation success, pupal position and adult weight experiments were not statistically significant when compared to the control group. In the results of the Comet test performed on *D. melanogaster*, the changes compared to the control group values were found to be significant in all application groups. In the smart test system, only the frequency increases in the last dose of 0.9 mM, out of the 0.225, 0.45 and 0.9 mM application doses, are statistically significant.

DAPA, which has a widespread use, was removed from the market once in previous years for reliability reasons and then re-entered the market, which reveals the need for this pharmaceutical agent to be evaluated with different test systems in order to reveal its different effects. The fact that the data obtained with these test systems related to DAPA have been brought to the literature for the first time increases the importance of this study and has the nature of a fundamental study.

2024, xiii + 89 pages

Keywords: Behavioral toxicity, Comet, Dapagliflozin, *Drosophila melanogaster*, Genotoxicity, Smart.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında sabır ve özveriyle bana destek olan, bilgi ve tecrübesini paylaşan değerli hocam tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Arzu ÖZKARA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım, araştırmalarım ve yazım süresince her türlü teknik aksaklığı aşmam konusunda deneyim ve birikimleriyle destek olan kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ, Sayın Doç. Dr. Dilek AKYIL ve Sayın Doç. Dr. Hakan TERZİ'ye teşekkür ederim.

Her konuda sorularımı cevaplayan, her zaman desteğini gördüğüm 'karışmayan kafa çözüme ulaşmaz' diyerek sorgulamaya ve bilimsel araştırmaya teşvik eden değerli hocam Sayın Prof. Dr. Şakir Önder ÖZKURT'a teşekkür ederim.

Deney çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı lisans öğrencisi arkadaşlarım Sezin ÖZDEMİR, Selcan GİRGİN, Özkan ŞEŞEN, Mehmet Furkan ÇİLEK, Fadime ÖZER, Emine KOÇ, Süleyman ÖZGÜN'e yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım Zekiye HAZAR, Ayşegül GEDİK, Aleyna ÖZDENİZ ve Beyza ARIKAN'a teşekkür ederim.

Akademik çalışmalarım için beni cesaretlendiren, her zaman yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim, hayatıma değer ve anlam katan çok kıymetli eşim Serkan YİĞİT'e, anlayışları için canımın içi evlatlarım Yağız İnanc ve Cihangir'e, yardıma ihtiyacım olduğu her an yanımda olan annem Ayşe YİĞİT ve babam Mehmet YİĞİT'e çok teşekkür ederim. Çocukluğumdan itibaren beni daima seven, bana inanan, güvenen, varlıklarıyla güçlü hissettiren ve hayatımda teşekkürü en çok hak eden canım annem Necibe KARAHAN ve canım babam Mevlit KARAHAN'a çok teşekkür ediyorum.

Zebiha YİĞİT

Afyonkarahisar 2024

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	5
2.1 Dapagliflozin	5
2.1.1 Sodyum Glukoz Kotransport 2 (SGLT2) İnhibitörleri (Glukoretikler, Gliflozinler).....	5
2.1.2 SGLT2 İnhibitörlerinin Yan Etkileri	7
2.1.3 DAPA ve Önemi	8
2.1.4 DAPA'nın Yan Etkileri	10
2.2 Drosophila melanogaster	11
2.2.1 Drosophila Türlerinin Biyokimyasal ve Genetik Çalışmalardaki Önemi	12
2.2.2 Drosophila melanogaster'in Yaşam Döngüsü	15
2.2.3 Kullanılan Hatların Genetik Yapısı	21
2.3 Lokomotor Aktivite ve Davranışların Biyolojik Önemi	24
2.4 Comet Testi	25
2.5 Smart Testi.....	27
2.6 Önceki Çalışmalar	27
3. MATERYAL ve METOT	32
3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	33
3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışı	33
3.2.1 Comet Testinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	36
3.3 Drosophila melanogaster'de Lokomotor Aktivite Davranış Deneylerinin Uygulanması	39
3.3.1 Davranış Deneylerinde Uygulanacak Dozların Hazırlanması.....	39
3.3.2 Larval Ağırlık ve Larval Hareket Ölçümü Uygulama Aşamaları	39
3.3.3 Pupa Oluşturma Başarısının Ölçümü	40

3.3.4 Pupa Pozisyon Ölçümü ve Negatif Jeotaksis Deneyi.....	40
3.3.5 Ergin Birey Oluşturma Başarısı ve Ergin Birey Ağırlık Ölçümü	42
3.4 Comet Testinin Uygulanması	42
3.4.1 Comet Testi Uygulama Basamakları.....	43
3.5 Smart Testinin Uygulanması	45
3.5.1 Smart Testinde Uygulanacak Dozların Hazırlanması	46
3.5.2 Smart Testi Uygulama Basamakları.....	46
3.5.3 Kanat Preparatlarının Analizi	52
3.5.4 Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması.....	54
3.6 İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR	55
4.1 Davranış Toksisitesi	55
4.1.1 Larval Ağırlık Ölçümü	55
4.1.2 Larval Sürünme	55
4.1.3 Pupa Oluşturma Başarısı	56
4.1.4 Ergin Birey Oluşturma Başarısı	57
4.1.5 Ergin Birey Ağırlık Ölçümü.....	57
4.1.6 Negatif Jeotaksis Ölçümü.....	58
4.1.7 Pupa Pozisyon Ölçümü	59
4.2 Comet Testi Sonuçları	59
4.3 Smart Testi Sonuçları	60
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	62
6. KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	89

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
CuSO_4	Bakır sülfat
dH_2O	Distile su
dk	Dakika
dl	Desilitre
EtBr	Etidium bromid
FeSO_4	Demir sülfat
g	Gram
h	Saat
LD_{50}	%50 letal doz
mA	Miliamper
μL	Mikrolitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Sodyum piro-sülfit
ppm	Milyonda bir
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
V	Volt
♀	Dişi
♂	Erkek
%	Yüzde
>	Büyüktür
<	Küçüktür

Kısaltmalar

AMES	<i>Salmonella</i> / mikrozom mutajenite testi
Bd^S	Beadet serrate
COMET (SCGE)	Tek Hücre Alkali Jel Elektroforez Testi
CP	Siklofosfomidin
CYP	Sitokrom P450
DAPA	Dapagliflozin
DDT	Diklorodifeniltri-kloroetan
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EMA	Avrupa İlaç Kurumu
EMDAC	Endokrinoloji ve Metabolik İlaç Danışma Komitesi
EMS	Ethil metansülfonat
ENU	N- ethil N-nitrozüre
flr^3	Çekinik flare geni

FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FG	Fournier gangreni
GLUT	Glikoz taşıyıcı
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
KA	Kromozom anormallikleri testi
KKD	Kardeş kromatid değişimi testi
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
MA	Molekül ağırlığı
MMS	Methyl metan sulfonat
MN	Mikronükleus test
<i>mwh</i>	Çoklu kanat kılı geni
NB	Nutrient broth
NG	Nekrotizan fasiit
NMA	Normal erime noktalı agaroz
<i>Oregon R+</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> yabanıl tip
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
QTL	Kantitatif karakter lokus
SBM	Sodyum metabisülfid
SGLT	Sodyum glukoz kotransportu
SGLT2	Sodyum bağımlı glikoztransport protein 2
T2DM	Tip 2 Diabetes Mellitus
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
TM3	Dengeleyici kromozom
TPM	Toplam polar madde
UGT1A9	Üridin difosfat glukuronil transferaz
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Böbreğin glikoz metabolizmasındaki etkisi (Wright 2001).	5
Şekil 2.2 Vücutta normal glikoz homeostazı (Gerich 2010).	6
Şekil 2.3 DAPA'nın kimyasal yapısı (İnt. Kyn.3).	8
Şekil 2.4 Gliflozinlerin muhtemel yan etkileri (Faillie 2017).	11
Şekil 2.5 Tıbbi araştırmalarda <i>Drosophila melanogaster</i> kullanımının tarihçesi (Stephenson ve Metcalfe 2013).	14
Şekil 2.6 <i>D. melanogaster</i> 'ın yaşam döngüsü (Stocker ve Gallant 2008).	16
Şekil 2.7 <i>D. melanogaster</i> 'in yumurtası (Margaritis vd. 2014).	16
Şekil 2.8 <i>Drosophila melanogaster</i> larval evre (Chyb ve Gompel 2013).	17
Şekil 2.9 <i>Drosophila melanogaster</i> imajinal diskleri ve ergin bireyde oluşturduğu yapılar (Aldaz vd. 2010).	18
Şekil 2.10 <i>Drosophila melanogaster</i> 'de dişi erkek birey farkı (Chyb ve Gompel 2013).	20
Şekil 2.11 <i>Drosophila melanogaster</i> kanat Smart testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki lokasyonları (Kaya 2000).	23
Şekil 2.12 <i>Drosophila flr³</i> ve <i>mwh</i> mutantlarının kanat ve vücut yapıları (Kurşun 2022).	23
Şekil 3.1 <i>Drosophila melanogaster</i> 'e ait klon türleri (Henderson 2003).	53
Şekil 3.2 Tek tip ve ikiz klonların oluşumunun gösterimi (Guzman-Rincon vd. 2001).	53
Şekil 4.1 DAPA konsantrasyonlarına göre larval ağırlık dağılımı.	55
Şekil 4.2 DAPA konsantrasyonlarına göre larval sürünme.	56
Şekil 4.3 DAPA konsantrasyonlarına göre pupa oluşturma başarısı.	56

Şekil 4.4 DAPA konsatrasyonlarına göre ergin birey oluşturma başarısı.....	57
Şekil 4.5 DAPA konsatrasyonlarına göre ergin bireylerin ağırlık ilişkisi.....	58
Şekil 4.6 DAPA konsantrasyonlarına göre negatif jeotaksis sonuçları.....	58
Şekil 4.7 DAPA konsantrasyonlarına göre pupa pozisyon yüzdeleri.	59



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 <i>Drosophila melanogaster</i> 'in sistematigi.	12
Çizelge 2.2 Lewis besininin içeriği (Yurtsever ve Olgun 2003).	20
Çizelge 2.3 Lewis besininde kullanılan asit karışımının içeriği (Yurtsever ve Olgun 2003).	21
Çizelge 3.1 Davranış deneylerinde kullanılan test materyalleri (Kurşun vd. 2021).	33
Çizelge 3.2 <i>Drosophila melanogaster</i> kanat Smart testinde kullanılan kimyasallar (Kaya 2000).	34
Çizelge 3.3 Faure Solüsyonunun Hazırlanması (Kaygısız 2016).	34
Çizelge 3.4 Comet testinde kullanılan kimyasallar (İşlek 2023).	35
Çizelge 3.5 Düşük erime noktalı agaroz (LMA) çözeltisinin hazırlanması.	36
Çizelge 3.6 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması.	36
Çizelge 3.7 Etidyum bromür çözeltisinin hazırlanması.	37
Çizelge 3.8 %70'lik etil alkol çözeltisinin hazırlanması.	37
Çizelge 3.9 Liziz çözeltisinin hazırlanması.	37
Çizelge 3.10 Liziz çözeltisinden lizing çözeltisinin hazırlanması.	37
Çizelge 3.11 Normal erime noktalı agaroz (NMA) çözeltisinin hazırlanması.	38
Çizelge 3.12 Nötralizasyon çözeltisi hazırlama.	38
Çizelge 3.13 Feniltiyoüre çözeltisinin hazırlanması.	38
Çizelge 4.1 Dapagliflozin uygulamasında Comet testi ile DNA Hasarının tespiti.	60
Çizelge 4.2 DAPA konsantrasyonlarının etkisinin Smart testi sonuçları.	61

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 3.1 Pupa pozisyon ölçümünün gösterimi.	41
Resim 3.2 Negatif jeotaksis deneyinde 10 cm yüksekliği aşabilen bireylerin gösterimi.	41
Resim 3.3 <i>flr³</i> bireylerin eterle bayıltılmasının gösterimi.	47
Resim 3.4 <i>mwh</i> erkek birey seçiminin gösterimi.	48
Resim 3.5 <i>mwh/flr³</i> çaprazlama şişelerinin gösterimi.	48
Resim 3.6 Yumurta bırakan ergin bireylerin gösterimi.	49
Resim 3.7 DAPA maruziyetine bırakılan transheterezigot larvalar.	50
Resim 3.8 Faure solüsyonu damlatma ve lameli kapatma.	51
Resim 3.9 Hazırlanan kanat preparatları.	51
Resim 3.10 <i>Drosophila melanogaster</i> kanat sektörlerinin gösterimi.....	52

1.GİRİŞ

Dapagliflozin (DAPA) bir sodyum glikoz kotasıyıcı (SGLT) inhibitörü olup tip 2 diyabetes mellitus tedavisinde kullanılır, biyoyararlanımı %78, yarı ömrü 12.9 saat ve Emilimi hızlıdır. DAPA 5 mg ve 10 mg tabletler şeklinde bulunmaktadır ve anlamlı bir ilaç etkileşimi bilinmemektedir. DAPA'nın glikoz atılımının artışı neticesinde oluşan kalori kaybı nedeniyle ilacı kullanan hastalarda kilo vermeye neden olduğu bilinmektedir (Rosenstock vd. 2012, Zambrowicz vd. 2012).

Böbreklerin glikoz dengesindeki rollerinden birinin glikozun tübüler geri Emilimi (reabsorbsiyonu) olduğu bilinmektedir. Sağlıklı bireylerde, kanda glikoz değeri yaklaşık 90 mg/dl olarak kabul edilmekte olup böbreklerden günde yaklaşık 180 g glikoz reabsorbe olmaktadır (Wright vd. 2004, Wright vd. 2007, Ferrannini 2010). Protein yapısındaki SGLT ve glikoz taşıyıcılar (GLUT), glikozun tübüllerdeki Epitel hücrelerine girip çıkmasında rol almaktadırlar (Marsenic 2009). Özelliklerine ve vücutta dağılımına göre farklı SGLT'ler bulunmakta olup (Wright vd. 2007), en çok bilinenleri SGLT1 ve SGLT2'dir (Lee ve Han 2007). SGLT2; vücutta beyin, böbrek, karaciğer, kalp, kas, tiroit içinde yer almakta (Wright vd. 2007) ve glikozun büyük kısmı, daha yüksek taşıma kapasitesi olan SGLT2 yardımıyla, böbrekteki proksimal tübüllerde reabsorbe edilmektedir (Duran ve Kutlu 2014).

Drosophila melanogaster, Dipteryoloji'nin babası olarak bilinen Johann Wilhem Meigen tarafından 1830 yılında tanımlanmıştır. *D. melanogaster* 1910 yılında Amerikalı Zooloji ve Genetik uzmanı Thomas Hunt Morgan tarafından ilk kez kullanılmış ve Morgan *D. melanogaster* kromozomlarının haritalama potansiyelini fark eden ilk bilim insanı olmuştur. 2001 yılında *D. melanogaster*'in tüm DNA dizilimi tamamlanmış olup, bu organizmanın 14.000 gen ve 165 milyon baz çiftine sahip olduğu açıklanmıştır (Keller 2007).

D. melanogaster %60 bağıl nem ve 25±1 °C şartlarında kültür odasında kolay yetiştirebilen bir model organizma olup, döllenmiş bir *D. melanogaster* yumurtasından 1. evre larva oluşumu yaklaşık 22-24 saat sonra gerçekleşmektedir. Organizmanın yaşam döngüsü 2. evre larva, 3. evre larva, prepupa, pupa ve 9. günün sonunda ergin birey olarak

devam etmektedir. Ancak sıcaklık, beslenme, nem, ışık, radyasyon ve kontaminasyon gibi çevresel faktörler gelişim sürecinde değişikliğe neden olabilmektedir (Clark ve Rockstein 1964).

Mutasyon, delesyon veya amplifikasyon sonucu dizilimi değişikliğe uğrayan ve insan hastalıklarıyla ilişkilendirilen 287 genin %62'sinin yani 178'inin ortolog geni *D. melanogaster*'de bulunmaktadır. Bu genler; insan hayatı için önemli olan kanser, nörodejeneratif hastalıklar, sindirim sistemi rahatsızlıkları, diyabet gibi birçok kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalıklarda ve bu hastalıkların çoğunun ilaç keşfinde kullanılabilir. *D. melanogaster*'in genomunun insana yakın olması, genetik çalışmalarda kullanımı için etik kurul iznine ihtiyaç duyulmaması ve deneysel modellemeler için oldukça elverişli olması model organizma olarak tercih edilme nedenleri arasında sayılmaktadır (Rudrapatna vd. 2012, Liu ve Xun 2013).

Davranışsal test yöntemleri çeşitli kimyasal ajanların ve ksenobiyotiklerin toksikolojik bakımdan değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan test yöntemleri arasındadır (Truong vd. 2012, Chen vd. 2014). Davranış testlerinden elde edilen veriler, bu maddelerin farklı etkilerinin belirlenmesinde spesifik, hassas ve güvenilir olmasının yanı sıra, araştırmalarda temel oluşturacak bilgilerin elde edilip değerlendirilmesinde yararlı bilgiler sağlamaktadır ve davranış testleri toksisite değerlendirmelerinde kullanılan önemli araştırma alanlarından biridir. Bu ajanlara maruziyet sonucunda ortaya çıkan klinik belirtiler veya yapısal lezyonların görülmesinden daha önce canlıda davranışsal tepkiler görülebilmekte ve bu davranışsal değişimler, kimyasal maruziyetin ilk ölçülebilir parametresi olarak kullanılmaktadır. *D. melanogaster* davranış deneyleri larval ağırlık ve larval hareketi, pupa oluşturma başarısı, pupa pozisyonu, pupadan çıkış başarısı, negatif jeotaksis ve ömür uzunluğu, ergin birey ağırlığı deneylerini kapsar (Philbert 2010, Kurşun vd. 2021).

Comet [Tek Hücre Alkali Jel Elektroforez (SCGE)] testi, kimyasal ve fiziksel faktörlerin canlılarda neden olduğu sitotoksik ve genotoksik etkilerin göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin tespit edilmesini sağlayan ve yaygın olarak kullanılan bir test sistemidir. Comet testi ilk kez, hücrelerde gama radyasyonundan sonra nötral koşullarda DNA

hasarını çalışmak amacıyla gelişmiş mikroelektroforetik bir yöntem olarak, Ostling ve Johanson (1984) tarafından uygulanmıştır. Comet tekniği bugün *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Comet testi; basit, hızlı, ucuz, hassas olması, tek veya çift bağ DNA hasarının ayrı ayrı görülebilmesi ve verilerin hızlı ve etkili olarak elde edilebilmesi bakımından halen tercih edilen önemli bir yöntemdir (Fairbairn vd. 1995).

İnsan periferik lenfositlerinde meydana gelmiş DNA hasarı, kuyruklu yıldız görünümünde olduğundan bu yöntem çoğunlukla İngilizce kuyruklu yıldız anlamındaki “comet” ismiyle anılmaktadır (Klaude vd. 1996, Collins vd. 1997). Comet testi, pek çok DNA hasarını gen düzeyinde DNA kırıklarının tespiti ilkesiyle belirlemektedir ve genetik toksikoloji ile biyolojik gözlem araştırmalarında geniş bir kullanım alanına sahiptir (Park ve Kang 2004, Sardas vd. 2006).

Somatik rekombinasyon ve mutasyon testi (SMART), Graf vdadaşları tarafından uygun gen işaretlerinin heterozigotluk kaybının tanınması ile 1984’te geliştirilmiş olup, hedef genleri kolay tespit edilebilen, tek bir kuşakta sonuç alınabilen, sonuçları kolaylıkla değerlendirilebilen, tek bir sinekle çok sayıda hücrenin analizini sağlayan, güvenilirliği kanıtlanmış, ekonomik ve hızlı *in vivo* bir test sistemidir (Graf ve Würzler 1996, Zimmering vd. 1997). Smart testi ile kromozom bozuklukları, delesyon ve nokta mutasyonları tespit edilebilmektedir ve bu yöntem embriyonik gelişim esnasında *D. melanogaster*’in farklı imajinal disk hücrelerine çeşitli kimyasal ajanların uygulanması esasına dayanmaktadır (Garcia-Bellido ve Merriam 1971). Smart yöntemi; günümüzde kimyasal, fiziksel ve biyolojik maddelerin rekombinojenik ve mutajenik etkilerini yani bu gibi maddelerin indüklediği delesyon, kromozom kaybı, mutasyon, mitotik rekombinasyon, kararsız translokasyon ve ayrılmama gibi kromozomal aberasyonları tespit etme amaçlı kullanılmaktadır (Graf vd. 1984). Bu test sistemi aynı zamanda maddelerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinin yanında, genotoksik etkileri bilinen maddelere farklı maddelerin antigenotoksik etkilerinin tespitini de sağlamaktadır (Graf vd. 1998).

DAPA, Kasım 2012’de onay aldıktan sonra Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç

Dairesi (FDA)'nin Endokrinoloji ve Metabolik İlaç Danışma Komitesi (EMDAC) tarafından bildirilen mesane ve meme kanseri vakaları ile klinik araştırmalarda ilacın karaciğer hasarına neden olduğuna dair endişeler sebebiyle piyasadan geri çekilmiş ve bu endişelerin giderilmesi sonrasında kullanımı tekrar onaylanmıştır. Bu bağlamda DAPA'nın *D. melanogaster* larvalarına uygulanıp davranış toksisitesi, Smart ve Comet test yöntemleriyle genotoksik ve sitotoksik etkisinin gözden geçirilmesi sağlanarak elde edilen bilimsel sonuçlarla ilacın neden olabileceği hasarların bir kez daha ortaya koyulması amaçlanmış olup, bu çalışma ile literatüre bu ilaç ile ilgili bu konudaki ilk veriler kazandırılacaktır.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Dapagliflozin

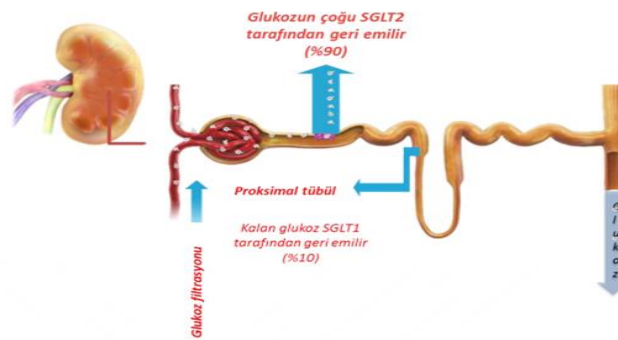
2.1.1 Sodyum Glukoz Kotransport 2 (SGLT2) İnhibitörleri (Glukoretikler, Gliflozinler)

Glikozun tübüler reabsorpsiyonu böbreklerin glikoz dengesini sağlamadaki rollerinden biri olarak bilinmektedir. Kan glikozunun sağlıklı normal bireylerdeki yaklaşık değeri 90 mg/dl olarak kabul edilmektedir ve böbreklerden reabsorbe edilen glikoz günlük oranı yaklaşık 180 gramdır (Wright vd. 2004, Wright vd. 2007, Ferrannini 2010). Glikoz, protein yapısında farklı taşıyıcılar ile tübüllerdeki epitel hücrelerine girip çıkmaktadır ve bu taşıyıcı proteinler glikoz taşıyıcı ve sodyum glikoz kotasıyıcı olarak bilinmektedir (Marsenic vd. 2009). Özelliklerine ve vücutta dağılımına göre farklı SGLT'ler bulunmaktadır (Wright vd. 2007).

Vücutta bulunan 6 adet sodyum glukoz yardımcı taşıyıcısından en çok bilinen iki sodyum glukoz kotasıyıcısı:

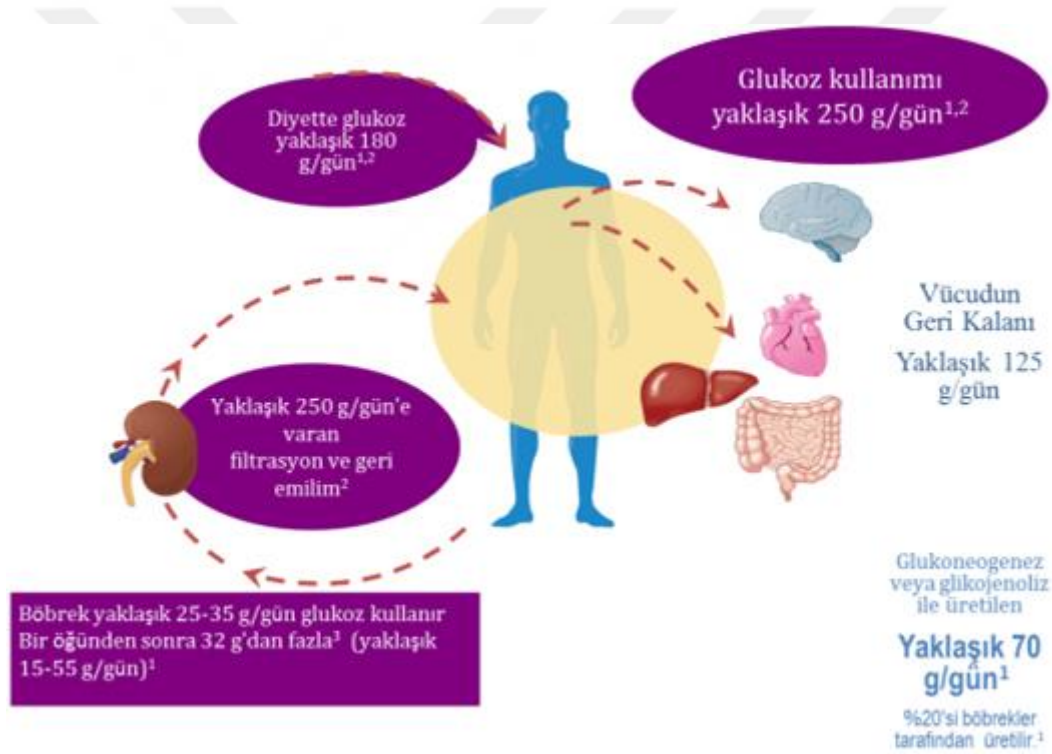
SGLT 1: Galaktoz, sodyum ve glukozun bağırsağın çizgili kenarından ve böbrekte proksimal tübülden eşzamanlı olarak taşınmasını gerçekleştirmektedir.

SGLT 2: Glikoz ve sodyumun böbrekte bulunan proksimal tübülün S1 segmentinde, eşzamanlı olarak taşınmasını ve proksimal tübülde glikozun %90'ının geri emilimini sağlamaktadır (Şekil 2.1) (Lee ve Han 2007, Triplitt 2012).



Şekil 2.1 Böbreğin glikoz metabolizmasındaki etkisi (Wright 2001).

SGLT2; vücutta beyin, böbrek, kalp, tiroid, karaciğer ve kas içinde bulunmaktadır (Wright vd. 2007). SGLT2 böbreklerde proksimal tübüllerde yüksek taşıma kapasitesine sahiptir ve burada glikozun büyük bir kısmının reabsorbe edilmesine yardımcı olmaktadır (Duran ve Kutlu 2014). Diyetle günlük glikoz emilimi 180 g iken, karaciğer glikojenoliz ve glukoneogenez ile 70 g glukoz üretimi sağlamaktadır. Günlük toplam glikoz miktarının 125 gramını beyin, kalan kısmını diğer dokular kullanmaktadır. Glikozun günlük 180 gramını böbrekler filtre ederken, tamamına yakını böbrek tübülleri ile geri emilerek dolaşıma yeniden katılmaktadır (Şekil 2.2). Diyabet hastalığında ise günlük 280 gramı aşan glikoz girişi gerçekleştiği için geri emilim eşik değerini aşan glikoz düzeyi glikozüriye neden olmaktadır (Zinman vd. 2015, Neal vd. 2017).



Şekil 2.2 Vücutta normal glikoz homeostazı (Gerich 2010).

SGLT inhibitörleri grubunda 1835'te Fransızlar tarafından keşfedilen ilk ilaç Filorizin (Phlorizin)'dir ve elma ağacının kök kabuğundan elde edilmiştir. Başlangıçta ateş düşürücü olarak kullanılan Filorizin'in renal glikoz transport sistemini inhibe ettiği ve glikozüriye neden olduğu tespit edilmiştir (Idris ve Donnelly 2009, White 2010). SGLT'lerin keşfedilmesi sonucu diyabet tedavisinde bu ajanların kullanımı kararlaştırılmıştır (Perez vd. 2010). Etkilerini insülininden bağımsız gösteren ve

‘glukoretikler’ veya ‘gliflozinler’ olarak da isimlendirilen SGLT2 inhibitörleri diyabetin herhangi bir evresinde kullanım alanı bulmuştur. Kullanım avantajları arasında; kan basıncını, albuminüriyi (idrarda albümin çıkması), serum ürik asit değerini düşürmeleri, kilo kaybına sebep olmaları ve hipoglisemi riskini azaltmaları sayılabilir. Dezavantajı ise çoğunlukla kullanılan diğer oral antidiyabetik ilaçlara göre fiyatlarının yüksek olmasıdır (TEMD 2016).

2.1.2 SGLT2 İnhibitörlerinin Yan Etkileri

SGLT2 inhibitörlerinin en çok görülen yan etkileri; ortostatik hipotansiyon, hipoglisemi, dehidratasyon, idrarla glikoz atımının neden olduğu tedavisi kolay orta dereceli genital enfeksiyon ve glikozürinin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonudur. İdrar yolu enfeksiyonlarının kötüye gitmesi sonucu ürosepsis, mesane kanseri, akut böbrek hasarı, pyelonefrit rahatsızlıklarının görülebileceği tespit edilmiştir (İnt. Kyn. 1, Desouza vd. 2015, Faillie 2017, Jabbour vd. 2018). Kan şekeri seviyesini insülin salgılanmasından bağımsız olarak düşürmeleri, hipoglisemi riskini oldukça azaltmaktadır. Hipoglisemiye neden olan İnsülin, Tiazolidindion ya da Sülfonilüre gibi ilaçlar ile kombinasyon şeklinde uygulanan tedavilerde hipoglisemi artışına rastlanmamıştır (Halimi ve Verges 2014). SGLT2’lerin kullanımı sonucu deri toksisitesiyle birlikte çeşitli döküntülerin görüldüğü vakaların yanısıra kaşıntı, ışığa duyarlılık, ürtiker gibi birçok vaka da bildirilmiştir. Ek olarak bu ilaçlarda aromatik halkanın bulunmasının hipersensitivite reaksiyonlarını tetiklediği de düşünülmektedir (Raschi vd. 2017). SGLT2 inhibisyonu serum fosfat seviyelerini artırma potansiyeline sahiptir ve serum fosfat seviyesi artışının kemikte olumsuz etkilere neden olduğu varsayılmaktadır (Taylor vd. 2015); fakat Kanagliflozin (Qiu vd. 2017), DAPA (Fioretto vd. 2018) ve Empagliflozin kullanımında kemik kırılma riskinin artmadığı belirtilmiştir. Ayrıca DAPA kullanımı sonucu kemik minerallerinden inorganik fosfor, kalsiyum ve 25-hidroksivitamin D seviyelerinde anlamlı bir değişim bildirilmemiştir (Ljunggren vd. 2012).

Son yıllarda SGLT2 kullanımı sonucu en ciddi yan etkinin fourneir gangreni (FG) olduğu bildirilmiştir (Bersoff-Matcha vd. 2019). FG; hızlı ilerleyen, akut ve mortalite potansiyeli olan infektif nekrotizan fasiit (NF)’tir (Smith vd. 1998). FG gelişiminde diabetes mellitus (diyabet) bir risk faktörü olsa da raporlarda bildirilen vakaların bir kısmının SGLT2

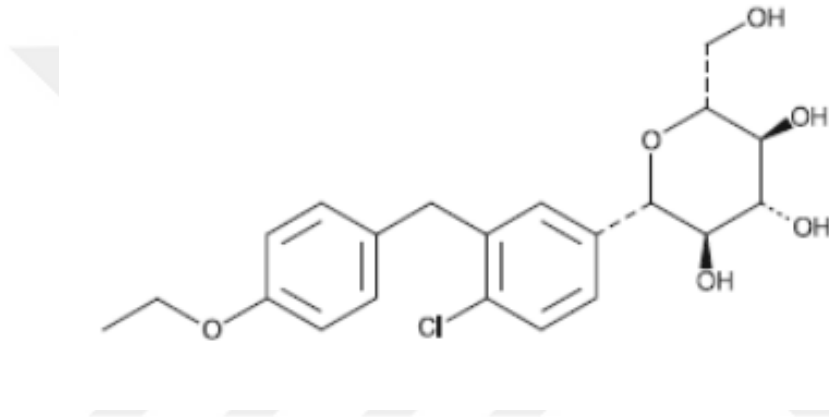
kullanımı ile ilişkili olması olasıdır. Sağlık otoriteleri SGLT2 kullanan hastalara ve hekimlere bu konuda dikkat uyarılarında bulunmuştur (İnt. Kyn. 2).

2.1.3 DAPA ve Önemi

DAPA Kimyasal Formülü: $C_{21}H_{25}ClO_6$ (Şekil 2.3)

MA_{DAPA} : 408,875 g/mol

IUPAC : (2S,3R,4R,5S,6R)-2-[4-kloro-3-[(4-etoksifenil)metil]fenil]-6-(hidroksimetil)oksan-3,4,5-triol.



Şekil 2.3 DAPA'nın kimyasal yapısı (İnt. Kyn.3).

DAPA bir SGLT inhibitörüdür ve biyoyararlanımı %78, yarı ömrü 12.9 saat (yaklaşık 13 saat) ve emilimi oldukça hızlıdır. DAPA, güçlü, geri dönüşümlü ve doğrudan etkili, antidiyabetik olan ve oral yolla kullanılan bir SGLT2 inhibitörüdür. DAPA böbrekte renal proksimal tübülün S1 bölümünde eksprese edilen, glikozun %90'nın geri emilimini sağlayan taşıyıcı protein olup, SGLT2'yi inhibe ederek glikozun idrarla atılmasını sağlar (Akahane vd. 2015, Hamouda vd. 2015).

DAPA, hemoglobin A1c (HbA1c) değerini düşürmesi ve insülin den bağımsız olarak hiperglisemi yi azaltması yönüyle diğer antidiyabetik ajanlardan farklıdır. Kan basıncını düşürücü etkisinin nedeni ise diürezistir. Üriner glikoz atılımı sayesinde kilo kaybı sağlaması özellikle T2DM ile görülen obezite ve obeziteyle ilişkili hastalıklar bakımından önemli bir avantajdır (İnt. Kyn. 4, Reilly vd. 2014). DAPA'nın glikozun fazlasını vücuttan uzaklaştırması glikoz toksisitesi ile görülen insülin direncini azaltmaya,

solunum yollarındaki glikozu azaltarak patojenlerin neden olduğu akciğer rahatsızlıklarının önlenmesine ve β -hücre adacıklarında oluşabilecek hasarın engellenmesine katkı sağlamaktadır (Macdonald vd. 2010, Astrand vd. 2017, Joannides vd. 2017).

Dünyada kullanımı ilk defa Amerika'da Kasım 2012'de onaylanan SGLT2 inhibitörü DAPA'dır. Ancak, klinik araştırmalarda ajanın karaciğer hasarına neden olduğu ile ilgili endişelerin yanı sıra mesane ve meme kanseri vakalarının bildirilmesi nedeniyle FDA'ya bağlı Endokrinoloji ve Metabolik İlaç Danışma Komitesi (EMDAC) tarafından piyasadan çekilmiştir. 8 Ocak 2014 tarihinde, ilaçla ilgili endişeler giderildikten sonra, glisemik kontrol amacıyla T2DM'li yetişkinler için 'Farxiga/ Forxiga' markası ile FDA tarafından tekrar onaylanmıştır. FDA, 29 Ekim 2014'te, DAPA'nın uzun salınımlı tabletinin (Xigduo XR) metformin hidroklorür ile kullanımını onaylamıştır. Bu kombinasyon ABD'de kullanımı onaylanan ilk metformin-SGLT2 inhibitörü kombinasyonudur.

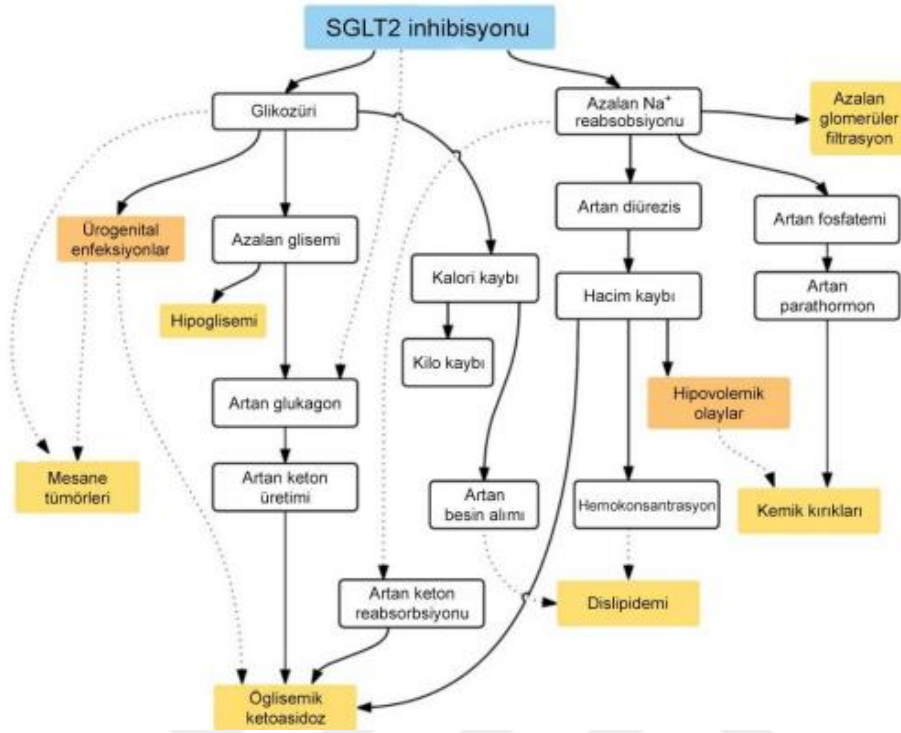
DAPA piyasada 5 mg ve 10 mg'lık tabletler şeklinde bulunmakta ve başlangıç dozu, aç veya tok olarak günde tek doz 5 mg alınması şeklinde önerilmektedir. 5 mg dozun yetersiz olması durumunda, günlük doz 10 mg'a yükseltilebilmektedir. Dağılım hacmi yüksek olan DAPA'nın, günde bir kez (10 mg) oral uygulama sonrası absorpsiyonu hızlı bir şekilde gerçekleşir ve önemli bir kısmı, karaciğer ve böbrekte CYP1A9 enzimi ile DAPA 3-O-glukuronid metabolitine dönüşür. Bu metabolit stabildir, farmakolojik aktivitesi bulunmaz ve reaktif değildir. 330'dan fazla enzim, reseptör, taşıyıcı protein ve iyon kanalı içeren geniş kapsamlı bir panel üzerinde DAPA ile metabolitinin organizmadaki etkileşimi test edilmiştir ve hedef dışı hiçbir etki görülmemiştir (Reilly vd. 2014). Bunun yanı sıra DAPA'nın anlamlı bir ilaç etkileşimi bildirilmemiştir. DAPA başlıca üridin difosfat glukuronil transferaz (UGT1A9) tarafından, az oranda da sitokrom 450 ile metabolize edilmektedir. Tek başına Metformin kadar etkili bulunan DAPA, 52-102 haftalık periyotlarda bu etkisini korumuştur. DAPA'nın Sitagliptin, Pioglitazon, Metformin ve Glimepid ile kombine kullanımı değerlendirildiğinde kullanımı esnasında DAPA'nın ve bu ilaçların metabolizmasının ayrıca farmakokinetik profilinin etkilenmediği belirtilmiştir. T2DM hastalarında DAPA tedavisi ile kan glikoz seviyesinin azalmasına bağlı insülin duyarlılığı ve endojen glikoz üretimi artar, Sülfonilüre'lere

kıyasla hipoglisemi riski daha az görülür. Normal veya ılımlı böbrek fonksiyon bozukluğu bulunan hastalarda akut renal toksisiteye rastlanmamıştır (Rosenstock vd. 2012, Zambrowicz vd. 2012).

2.1.4 DAPA'nın Yan Etkileri

DAPA; metabolik kemik hastalığı, ekstremitte amputasyonu, fournier gangreni, diyabetik ketoasidoz ve artmış hematopoez ile ilişkilendirilmiştir (McCullough vd. 2018). DAPA kullanımına bağlı olarak meme kanseri (Lin ve Tseng 2014) ve mesane kanseri (Ptaszynska vd. 2015) vakaları bildirilmiştir (Faillie 2017); fakat hayvan deneylerinde kanser bulgusuna rastlanmamıştır. Ayrıca, DAPA'nın prelinik çalışmalarda kanseri tetiklememesi ve kanser vakasının az sayıda görülmesi (Billger vd. 2019), DAPA'ya bağlı mesane kanseri artışı olasılığını desteklememektedir. Bunun yanında, insanlarda DAPA kullanımına bağlı kanser ilişkisinin daha önceden var olan kanserin erken teşhisini sağladığı da düşünülmektedir (Lin ve Tseng 2014).

Gliflozinlerin olası ve istenmeyen yan etkileri Şekil 2.4'te şematize edilmiştir (Faillie 2017). FDA'nın diyabetik ketoasidoz oluşturması sebebiyle 2015'te, böbrek taşı oluşturması sebebiyle 2017'de ve Fournier gangreni oluşturması sebebiyle 2018'de uyarı yayınladığı DAPA, FDA'nın izleme listesindedir ve ülkemizde de ek izleme listesinde yer alan ilaçlardandır (İnt. Kyn. 5, Karaca 2020). DAPA Forziga (Astra Zeneca) ticari adıyla 2015 yılında ruhsat almıştır ve sıklıkla monoterapi halinde ya da diğer antidiyabetik ilaçlarla kombinasyon şeklinde Tip 2 diabetes mellitus tedavisi için tercih edilmektedir (İnt. Kyn. 5, İnt. Kyn. 6).



Şekil 2.4 Gliflozinlerin muhtemel yan etkileri (Faillie 2017).

2.2 *Drosophila melanogaster*

Sirke veya meyve sineği olarak da bilinen ve diploid bir organizma olan *Drosophila melanogaster* bir çifti cinsiyet kromozomu, üç çifti otomozal kromozom olmak üzere dört çift kromozom bulundurmaktadır. Kromozomların numaralandırılması sırasıyla telosentrik X kromozomu, submetasentrik Y kromozomu, metasentrik 2. ve 3. kromozomlar, nokta kromozom olarak görülen en küçük 4. kromozomdur. 4. kromozom çiftinin sentromeri bir uca çok daha yakındır (Graf ve Singer 1992, Rothwell vd. 1993, Yamaguchi ve Yoshida 2018).

Drosophila, Latince’de nem seven anlamındadır ve taksonomik olarak hayvanlar aleminin, Insecta (böcekler) sınıfı, Diptera (çift kanatlılar) ordosunun, Drosophilidae ailesine aittir (Çizelge 2.1). “Meyve sineği” olarak adlandırılma nedeni doğada çürüyen ve olgunlaşmış meyvelerle beslenirken meyveler üzerinde üremesidir (Fortini ve Bonini 2000).

Çizelge 2.1 *Drosophila melanogaster*'in sistematigi.

Regnum (Alem)	Animalia
Phylum (Şube)	Arthropoda (Eklembacaklılar)
Subphylum (Altşube)	Mandibulata-Antennata
Superclassis (Üstsinif)	Hexapoda- Insecta (Altıbacaklılar- Böcekler)
Classis (Sınıf)	Pterygota (Kanatlı böcekler)
Superordo (Üsttakım)	Mecopteroidea (Uzunkanatlılar)
Ordo (Takım)	Diptera (Çift kanatlılar)
Subordo (Alttakım)	Brachycera (Kısa antenliler)
Familia (Aile)	Drosophilidae
Subfamily (Altaile)	Drosophilinae
Genus (Cins)	<i>Drosophila</i>
Species(Tür)	<i>Drosophila melanogaster</i> (Sirke sineği, Meyve sineği)

Holometabol (tam başkalaşım geçiren) bir organizma olan *D. melanogaster*' in deneysel ilk türlerini, 19. yüzyılda, 1830 yılında Dipteryoloji'nin babası olarak da bilinen Johann Wilhelm Meigen tanımlamıştır. *Drosophila*'yı laboratuvar ortamında kültüre ederek ilk kez Charles William Woodworth çoğaltmıştır. Woodworth çalışmaları esnasında *Drosophila*'nın kısa yaşam döngüsünü ve kültüre edilebilmesinin kolaylığını farketmiştir.

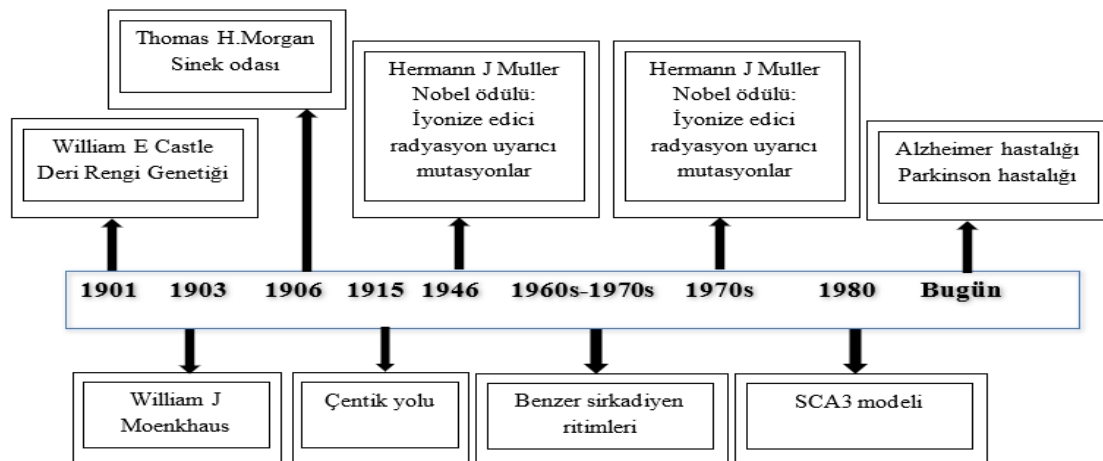
Bu organizmanın genetik laboratuvarlarında kullanılmasını 1909 yılında ilk öneren Amerikalı Zooloji ve Genetik uzmanı Thomas Hunt Morgan'dır. "Kalıtsal kromozomun oynadığı rol" ile ilgili çalışmasıyla 1933 yılında Nobel Tıp (Fizyoloji) Ödülü'nü almıştır ve *Drosophila* kromozomlarının haritalanma potansiyelini keşfeden ilk kişidir. (Roberts 2006, Markow 2015, Vecchio 2015). 19. yüzyılda keşfedilmesi ile başlayan ve yüz yılı aşkın süredir sayısız çalışmada kullanılmış olan *Drosophila*'nın 20. ve 21. yüzyılda da model organizma olarak klasik ve modern genetik çalışmalardaki önemi giderek artmış ve yapılan çalışma sayısı da halen artarak devam etmektedir. 2001 yılında genomu tamamen sekanslanıp tanımlanmıştır ve genlerin % 95'inin üç kromozomda kodlandığı 14.000 gen ile 165 milyon baz çifti tespit edilmiştir (Keller 2007). *D. melanogaster*'in çalışmalarda kullanımının avantajlı olmasını sağlayan nedenler arasında tüm DNA dizilimi açıklanan ilk ökaryot organizma olması ve dört çift kromozomlu basit genetik yapısı sayılabilir (Lyod ve Taylor 2010).

2.2.1 *Drosophila* Türlerinin Biyokimyasal ve Genetik Çalışmalardaki Önemi

- Meyve sineğinin kromozom sayısının az olması ve insanlardan daha az gen içermesi genel genetik fazlalığın daha az olduğunu göstermektedir. Bu durum genlerin biyolojik süreçler üzerindeki etkilerini incelerken daha basit bir analiz yapılmasına olanak tanımaktadır (Dimova ve Dyson 2005, Zhang vd. 2007).
- *D. melanogaster* doğal ve yapay pek çok varyasyon gösteren bir organizma olduğu için genetik çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Örneğin Smart'ta *Drosophila*'ya ait farklı kanat, kıl ve göz tipleri incelenmektedir.
- Araştırılan özelliklerin yavrulara aktarımını inceleyebilmek bakımından genetik çalışmalarda yaşam döngüsü kısa canlılar tercih edilmektedir. *D. melanogaster* 25 °C ±1 sıcaklık ve %60 bağıl neme sahip ortamda yaklaşık olarak 9-10 günde erginleşerek üremeye başlar.
- *Drosophila* kontrollü çaprazlamanın optimum gerçekleştirildiği organizmalardandır. Araştırılmak istenen özellikleri taşıyan organizmaların seçilerek araştırmacının gözetiminde çaprazlanması, kontrollü çaprazlamadır. Uygulamalar sırasında değişkenler ile deney ve kontrol grupları belirlenir, incelenecek özelliklerin sonraki nesillere aktarımı gözlenir.
- *D. melanogaster*'in yetiştirilmesi, bakımı ve gerekli besin, kimyasal ve sarf malzeme temini kolay ve ekonomiktir.
- Rekombinasyon, eşeyli üreme yoluyla oluşan sperm ve yumurtanın döllenmesi sonucu gerçekleşir. Eşeyli üreme geçiren *Drosophila*, incelenen özelliklerin kalıtımını gözlemlemek açısından uygun bir model organizmadır.
- Kalıtım çalışmalarında daha güvenilir sonuçlara ulaşmak için kullanılan organizmanın bir dölde verdiği yavru sayısı fazla olmalıdır. *D. melanogaster*'in dişi bireyleri yaklaşık olarak günde 50 yumurta bırakmaktadır (Bahçeci 2010).
- *D. melanogaster* ökaryotik bir organizmadır. Omurgalı canlılarla çalışırken alınması gereken etik kurul izninin *Drosophila* ile çalışırken alınmasına gerek yoktur.
- *Drosophila*'nın ve memelilerin biyoaktivitede görevli enzim sistemleri yüksek oranda benzerdir. İnsan proteinleri ile benzerlik gösteren, metabolizma ve gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu *D. melanogaster* proteinleri keşfedilmiştir. Bunun yanında *Drosophila* zaman içerisinde, insana özgü obezite, kalp hastalıkları, kanser, nörolojik ve sinir sistemi hastalıkları gibi hastalıklara ilişkin

biyolojik süreçleri gözlemlemek açısından ideal bir organizma haline gelmiştir (Şekil 2.5). Ayrıca ilaçların denenmesi sürecinde oldukça önemli bir alternatiftir (Pandey ve Nichols 2011, Markow 2015).

- Drosophilidae familyasından *Drosophila* cinsinin *D. yakuba*, *D. santomea*, *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. erecta* gibi 1500'ün üzerinde türe sahip olduğu tespit edilmiştir. Tür çeşitliliğinin fazlalığına rağmen hastalık çalışmalarında *D. melanogaster*'in öne çıkmasının ve en çok tercih edilmesinin temel nedenleri arasında; kolaylıkla ulaşılabilir olması, dünyanın her yerinde bulunabilmesi ve endemik olmaması sayılabilir (Gonzalez 2013, McGurk vd. 2015, Bachli 2017).
- *Drosophila*, uygulanacak işlem öncesi eterle kolayca bayıltılabilmektedir. Bunun yanı sıra memeliler ile arasındaki pek çok temel fizyolojik, nörolojik ve biyolojik özellikler korunmakta olup, insandaki viral genlerin yaklaşık %77'sinin *D. melanogaster*'de işlevsel bir homoloğu bulunmaktadır ve insanla yüksek oranda homoloji göstermektedir (bu benzerlik korunmuş bölgelerde %80-%90'a kadar çıkmaktadır). *D. melanogaster*'in viral proteinlerin moleküler fonksiyonunu anlamak için güçlü bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Sinek ve insan arasındaki korunmuş genetik yollar, gen fonksiyonunu incelemek için çok sayıda genetik kaynağın mevcudiyeti ve insan biyolojisiyle ilgili mekanizmalar *D. melanogaster*'i moleküler çalışmalar için doğal bir model sistem haline getirmektedir (Reiter vd. 2001, Pandey ve Nichols 2011, Alaraby vd. 2015, Alloca vd. 2018, Baenas ve Wagner 2019).

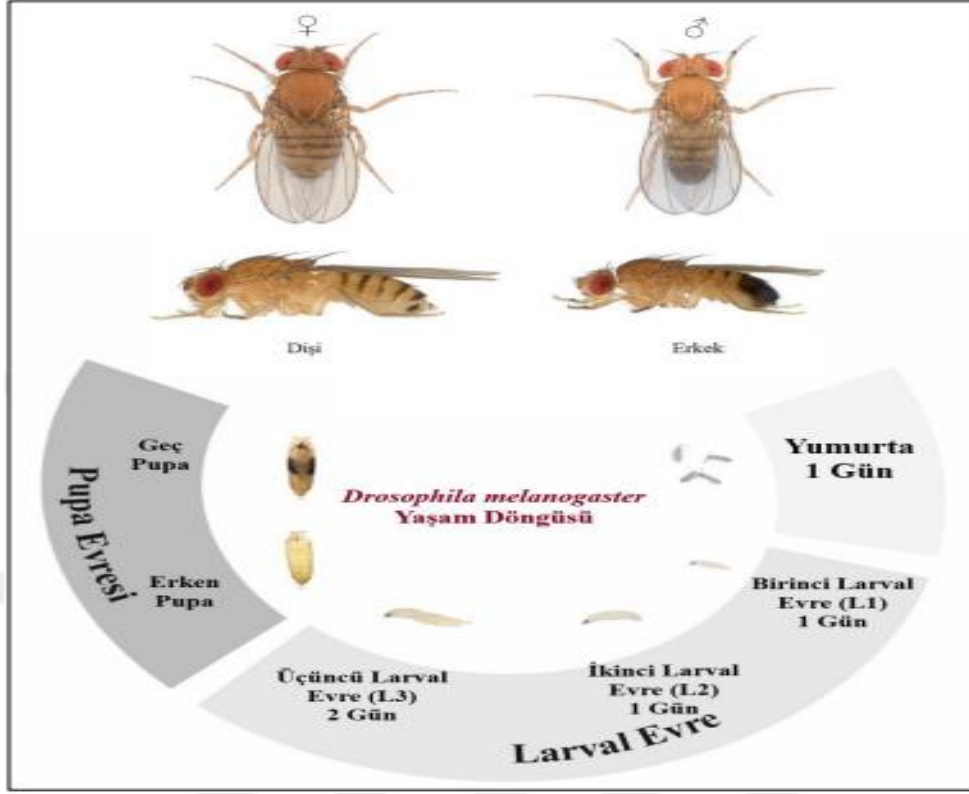


Şekil 2.5 Tıbbi araştırmalarda *Drosophila melanogaster* kullanımının tarihçesi (Stephenson ve Metcalfe 2013).

2.2.2 *Drosophila melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

D. melanogaster, yumurta, larva, pupa ve ergin şeklinde geçirmiş olduğu dört farklı gelişim aşamasından oluşan yaşam döngüsü nedeniyle holometabol canlı olarak kabul edilmektedir. *D. melanogaster* yumurtalarının ergin birey haline gelmesi optimum koşullarda (25 ± 1 °C sıcaklık ve %60-70 bağıl nem) 8-11 gün arasında olmakla beraber ortam sıcaklığı değişikliklerinde bu süre farklılık gösterebilmektedir. Gelişim sürecini, sıcaklığın yanı sıra laboratuvar koşulları ve beslenme şekilleri de etkilemektedir (Flagg 1988, Moreno vd. 2007, Markow 2015, Allocca vd. 2018). *Drosophila*'da gelişimin ilk evresi embriyonik evredir ve bu evre yumurtanın döllenmesiyle başlayıp yumurtadan birinci evre larvanın çıkmasına kadardır. Embriyonik gelişmeler yumurta zarları içerisinde gerçekleşir. Post embriyonik dönem olan gelişimin ikinci evresi; genç larvaların yumurtadan çıkmasıyla ergin olana kadar geçirdiği tüm değişimleri içerir (Kumar 2020). *D. melanogaster*'in hayat siklusu detaylı olarak incelendiğinde bu siklusun birinci (L1), ikinci (L2) ve üçüncü larval evre (L3), erken pupa, geç pupa ve ergin evre olmak üzere birbirini takip eden birçok aşamadan meydana geldiği görülmektedir (Flagg 1988). *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

D. melanogaster'in yumurtaları, beyaz renkte, oval ve lateral açıdan hafif basık şekilli ve 0.5 mm uzunluğunda 0.2 mm çapındadır, dorsal yan bölgenin ön ucunda mikropil adlı spermin yumurtaya geçmesini sağlayan bir açıklık ve iki adet filament bulunmaktadır. Filamentler yumurtaların oksijen ihtiyacını gidermek ve ıslak besin ortamında batmalarını engellemekle görevlidir.



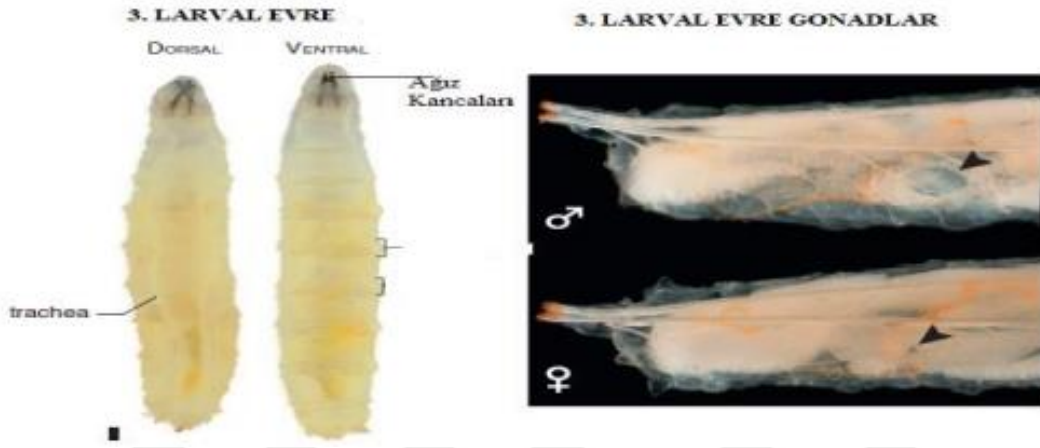
Şekil 2.6 *D. melanogaster*'ın yaşam döngüsü. 25 °C'de döllenmiş yumurtadan yetişkin sineğe (imago) kadar gelişimsel zihinsel döngü devam eder. 10 gün süren, üç larva dönemi ve bir pupa evresinden geçer (Stocker ve Gallant 2008).

Yumurtanın koruyucu kısmı koryon zarı ve vitellin membranıdır (Markow 2015). *D. melanogaster* dişi çiftleşmeden hemen sonra yaklaşık 400 yumurta bırakabilir (Şekil 2.7). Dişi *Drosophila*'nın yumurta üretimi altıncı ve onuncu günlerde maksimum düzeye ulaşır ve yaşam boyu sabit değildir. *D. melanogaster*'de hayat siklusu boyunca; dişinin yaşı ve yaşlanma hızı, günlük en yüksek yumurta verimi, yumurta bırakabildiği gün sayısı, ergin ömür uzunluğu gibi parametreler yumurta veriminde farklılığa neden olmaktadır (Kumar 2020).



Şekil 2.7 *D. melanogaster*'in yumurtası (Margaritis vd. 2014).

Yumurtalar optimum koşullarda (25 ± 1 °C sıcaklık, %60-70 bağıl nem) 22-24 saat içinde açılarak birinci larval evreye geçer. Larvalar yoğun bir şekilde beslenerek büyür ve 4 gün süren büyüme periyodunda pupa evresine kadar iki kez deri değişimi geçirerek üç aşamalı larval evreyi oluşturur. Larvalar vücutlarına besin alabilmek için hareketli siyah çene kancaları ile besi ortamında hareket ederler (Şekil 2.8). Bu evrede larvalar başlangıçtaki ağırlıklarının 3-5 katı kadar besin alabilir (Markow 2015).

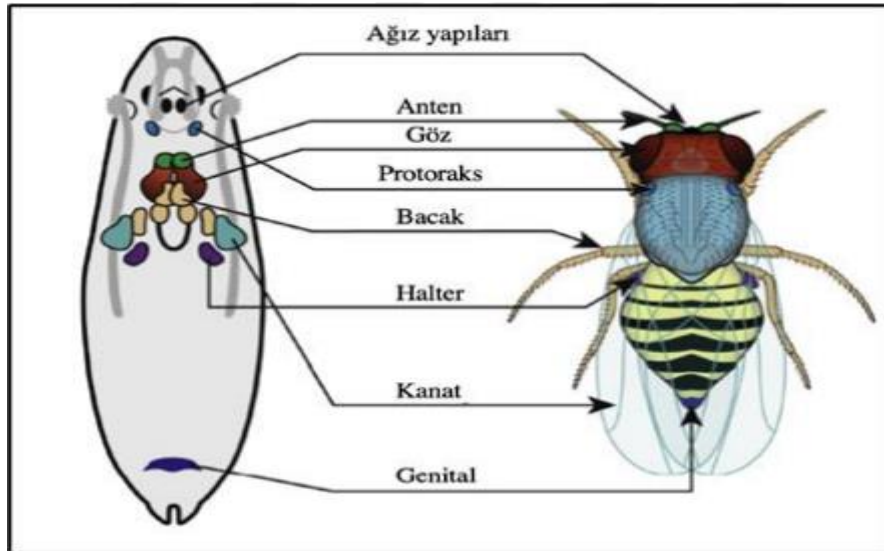


Şekil 2.8 *Drosophila melanogaster* larval evre (Chyb ve Gompel 2013).

Larvalar, baş 3, göğüs 3 ve karında 8 olmak üzere toplam 12 segmentten oluşur. Ekzokutikula, endokutikula, epidermis tabakalarından oluşan larvalar beyaz renklidir. Larval evrede larvaların ağız açıklık değeri 50-200 µm arasında değişebilmektedir. *Drosophila* larvalarında bulunan ve devamlı olarak mitotik bölünme geçiren özelleşmiş hücre grupları, pupasyon sürecinde metamorfozla ergin bireylerdeki organları ve uzuvları oluşturmaktadır. Embriyonik evreden köken alarak üçüncü larval evrede farklılaşıp vücut planını meydana getiren bu hücre grupları “imajinal disk hücreleri” olarak adlandırılmaktadır (Yamaguchi ve Yoshida 2018). *Drosophila* larvalarının sahip olduğu imajinal diskler kanat, halter, protoraks, bacak ve genital diskler olmak üzere toplamda 19 adettir (Şekil 3.2). Genital disk dışındaki tüm imajinal diskler çiftler halinde bulunur. Kafayı meydana getiren imajinal diskler, göz ve anteni oluşturan imajinal disklerle birlikte ağız yapılarını oluşturan 4 imajinal disklerdir. Yaklaşık dört gün süren larval evrede imajinal diskler ortalama 10 saatte bir bölünme geçirmektedir. Kanat imajinal diskleri en büyük imajinal disklerdir ve 50.000’e yakın hücreden oluşmaktadır.

Larval evrede larvaların oral olarak herhangi bir ajana maruz bırakılması imajinal disk hücrelerinde genetik farklılaşmaya neden olarak fenotipi etkilemektedir (Liu vd. 2009, Aldaz vd. 2010, Markow 2015).

Besin üzerindeki larvaların pupalaşmaya geçebilmek için ulaşması gereken eşik ağırlık yaklaşık 0.3 mg'dir ve larvalar üçüncü larval sürecin sonunda bu ağırlığa ulaştıktan sonra beslenmeyi durdurur, besiyerini terk ederek kültür şişesinde temiz kuru bir alana yerleşir. Hareketsiz ve dış tabakasını sertleştirmiş bir şekilde ortalama dört saat süren prepupa evresine yani pupa dönemi öncesi evreye girer (Markow 2015). Sarımsı bir renk halini alır ve larval kütikül sertleşerek "puparium" adlı kılıfı oluşturur. Açık sarıdan kahverengiye doğru renk alır ve puparium daha da sertleşir. Meyve sineği larvadan ergin hale geçiş sürecinde metamorfoz adlı değişimlere uğrar. Dönüşüm sürecince en belirgin farklılaşma pupa evresinde meydana gelir. Pupa evresinde beslenme gerçekleşmez. Larvanın tam başkalaşım geçirdiği bu süreçte, larval doku ve organlar parçalanır. İmajinal disk ve histoblastlardan ergin bireyin vücut yapıları meydana gelir (Şekil 2.9). Evrenin sonuna doğru kanat, göz ve ayaklar fark edilebilir, pupa daha koyu kahverengi renkte görünür. Pupa evresi 25 ± 1 °C'de optimum koşullarda 4-4.5 gün sürmektedir (Kumar 2020). Pupa evresinde gerçekleşen metamorfoz sonucu gelişmiş bir böcek (imago) oluşarak süreç tamamlanır (Graf vd. 1992, St Johnston ve Volhard 1992, Stocker ve Gallant 2008).

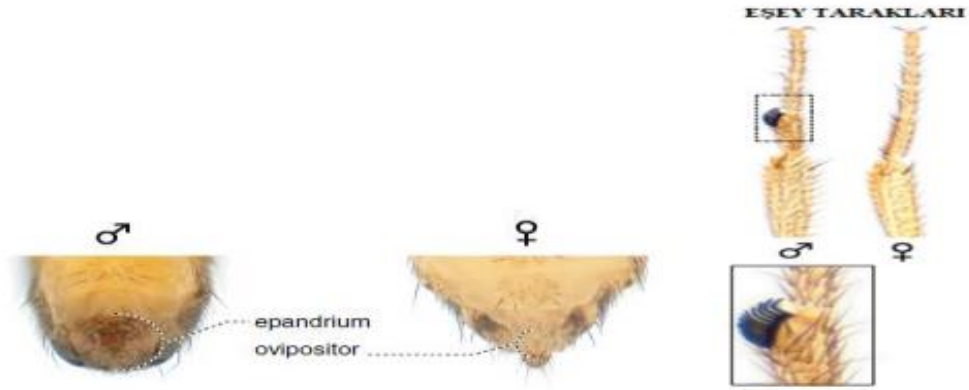


Şekil 2.9 *Drosophila melanogaster* imajinal diskleri ve ergin bireyde oluşturduğu yapılar (Aldaz vd. 2010).

Ergin *D. melanogaster* bireylerinin oluşumu için pupa evresinde gerekli dönüşümler yani metamorfoz gerçekleştikten sonra bireyler pupa kılıfının anteriorunu deler ve pupadan çıkar. Pupadan yeni çıkan bireyler yumuşak ve açık renklidir, kanatlar açılmamıştır ve pupadan çıktıktan bir saat sonra açılır. Erkek bireyler pupadan çıktığında eşeyssel olgunluğa erişmiştir, dişi bireyler pupadan çıktıktan sonra çiftleşmez, yaklaşık 10 ila 12 saat sonra eşeyssel olgunluğa erişip çiftleşebilirler. Dişiler eşeyssel olgunluğa ulaştıktan 48-72 saat sonra yumurta bırakmaya başlar ve yumurta bırakması çiftleşmeye bağlı değildir (Alaraby vd. 2016).

Baş, toraks ve abdomen *Drosophila*'nın ergin bireylerini oluşturan üç kısımdır. Erkek sineklerde son segmentler birleştiği için 5 abdominal segment, dişi bireylerde 7 abdominal segment bulunur. Erkek sineklerin abdomenleri son segmentler birleştiği için dişi sineklerin abdomeninden daha kısadır ve abdomenin posterior ucu küttür ve koyu siyahtır. *D. melanogaster* dişilerinin abdomen ucu, anal plakadan kaynaklı çıkıntı nedeniyle sivridir. Ergin bireylerin eşey belirlemesinde erkek sineklerin özellikleri dişilerden kolaylıkla ayırt edilmesini sağlamaktadır. Abdomen erkek ve dişi bireylerin ayırımında kullanılan önemli bir kısımdır. Eşey tarağı, abdomen şekli ve rengi eşey ayrımı yapmayı sağlayan en önemli özelliklerdir (Şekil 2.10).

D. melanogaster'in ergin ömür uzunluğu 25 ± 1 °C'de 40-60 gün arasında değişmektedir (Allocca vd. 2018). Bu sineklerin hayat döngüsü ve ergin ömür uzunluğu sıcaklık, beslenme, genetik faktörler ve birey sayısı gibi faktörlerden etkilenebilmektedir. Larva yoğunluğunun gelişim üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda birey sayısındaki fazlalığın rekabeti artırdığı ve gelişimi yavaşlattığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte popülasyondaki yoğunluk ergin bireylerin geç çıkmasına, vücut büyüklüklerinin küçük olmasına ve küçük bireylerin daha uzun yaşamasına neden olmaktadır. Popülasyon yoğunluğu, larval evrede pupalaşma için gerekli besin depo edilemediği için pupal ölümlere de neden olmaktadır (Mcintyre ve Gooding 2000, Foley ve Luckinbill 2001).



Şekil 2.10 *Drosophila melanogaster*'de dişi erkek birey farkı (Chyb ve Gompel 2013).

Sinekler poikilothermal canlı oldukları için metabolik hızları çevresel sıcaklıklardan etkilenmektedir. Normal gelişim süresi 25°C'de yaklaşık olarak 8-10 gün süren *D. melanogaster*'in daha yüksek sıcaklıkta gelişim süresi kısalmır (Lints ve Lints 1971, Ashburner 1989). Çevresel sıcaklığın artması poikilotermik canlıların ömür uzunluğunun kısılmasına neden olur (Bağcı vd. 1990, Sestini vd. 1991).

D. melanogaster'in kullanıldığı araştırmalarda standart Lewis besin ortamı ve etkisi araştırılan ajan madde ile ıslatılmış *Drosophila* hazır instant medium besin de kullanılmaktadır (Graf ve Vanschaik 1992, Marcos ve Carmona 2013). “Lewis mediumu” olarak da bilinen standart *Drosophila* besininin içeriği Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (Lewis 1960).

Çizelge 2.2 Lewis besininin içeriği (Yurtsever ve Olgun 2003).

Madde	Miktar
Mısır unu	104 g
Şeker	94 g
Maya	19 g
Agar agar	5 g
dH ₂ O	1020 mL
Asit karışımı	6 mL

Çizelge 2.3 Lewis besininde kullanılan asit karışımının içeriği (Yurtsever ve Olgun 2003).

Madde	Miktar (mL)
Orthophosforik asit	83
Propionik asit	836
dH ₂ O	1081

Drosophila çalışılan farklı araştırma laboratuvarlarında kullanılan besin ortamları da farklı olabilmektedir. Genellikle mısır unu, toz şeker, toz maya, agar, distile su (dH₂O) ve asit karışımını içeren Lewis besini tercih edilmektedir (Graf vd. 1992).

Çalışma da kullanılan *Drosophila* besini hazırlanırken asit karışımı hariç tüm malzemeler hassas terazide tartılıp distile su mezür ile ölçülerek eklenir. Tüm malzemeler homojenize bir şekilde karıştırılır, kısık ateş üzerine alınır iyice kaynayana ve yoğunlaşana kadar sürekli karıştırmaya devam edilir. Kaynama sonrası karıştırılarak pişirme işlemine 1-2 dakika daha devam edilir. Pişirme işlemi tamamlanıp pişirme kabı ateş üzerinden alınır. Hazırlanan pişmiş karışıma, besinin kontamine olmasını önlemek amacıyla önceden hazırlanmış propionik asit karışımından mikropipetle 6 mL eklenir ve besin içerisinde homojen bir şekilde dağılana kadar karıştırılır. Hazırlanan *Drosophila* besini sıcak bir halde katılaşmadan daha önce steril edilen 200 mL’lik kültür şişelerine her birinde düzgün olarak 1-1.5 cm kalınlıkta besin olacak şekilde dökülür. Besin döküldükten sonra kültür şişeleri filtre kâğıdı ile kapatılır ve şişede oluşan buhar uzaklaştırılır. Şişelerin ağzı steril sünger ile kapatılır ve kullanım için hazır hale getirilir.

Drosophila hazır besini de *D. melanogaster* araştırmalarında sineklerin larval evrede uygulanacak kimyasalın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılması şeklinde kullanılan farklı bir besindir. 4.5 gr hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) [Formula 4-24 ® (Carolina Biological Supply Co. Burlington, NC, ABD)] falkon içerisinde, derişimleri hazırlanmış kimyasal maddenin 9 mL’si ıslatılır.

2.2.3 Kullanılan Hatların Genetik Yapısı

Comet ve davranış deneyleri için *D. melanogaster*’in Oregon-R+ hattı (yabanıl soyu), Smart için de flare (*flr*³) ve multiple wing hair (*mwh*) mutant soyları kullanılmıştır.

Smart’da kullanılan mutant soylar;

-Dişi bireyler (♀): *flr³ / ln (3LR) TM3, ri p^P sep l (3) 89Aa bx^{34S} e^S Bd^S*; Bu soy flare (*flr³*) mutasyonunu taşımaktadır. *flr³* marker (belirleyici) geni, üçüncü kromozomda sentromere (3-38.8) yakın bir lokusta yer almaktadır ve kanat kıllarının şeklini etkileyen resesif bir mutasyondur (Şekil 2.11).

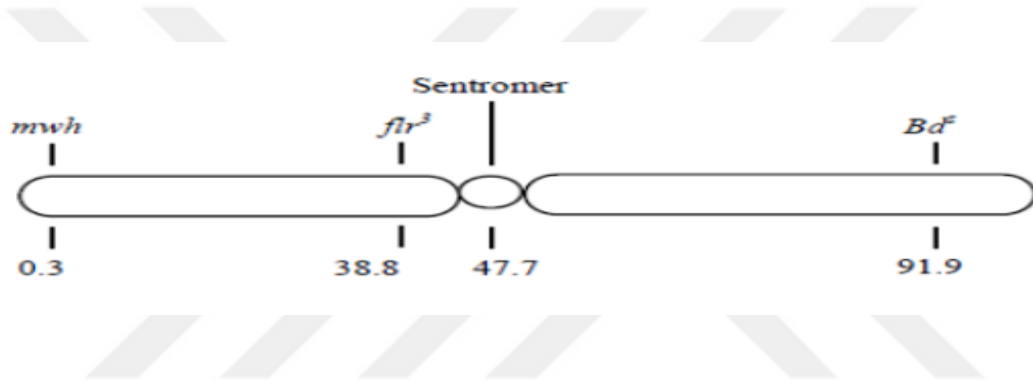
flr³ geni homozigot resesif durumda embriyonik letaliteye neden olur ve ergin sinek oluşamaz. Embriyonik evrede letal etkinin ortadan kalkması için *flr³* mutant bireylerde *beaded-serrat (Bd^S)* genini taşıyan ve çoklu inversiyonlar geçirmiş TM3 dengeleyici kromozomu kullanılmaktadır. Yani bu kromozomda dominant bir mutasyon olan *Bd^S* geni heterozigot tutularak bireylerin hayatta kalması sağlanır. TM3 dengeleyici kromozomunun rekombinasyonu baskılaması olası rekombinojenik ve/veya mutajenik etkinin birbirinden ayırt edilmesini de sağlamaktadır (Graf vd. 1998). *flr³*'ün bilinen üç mutant aleli de homozigot ve zigotik letaldir. Ancak kanat imaginal disklerdeki homozigot hücreler yaşayıp gelişerek mutant kanat hücrelerini oluşturur ve kanatlarının uç kısımları testere dişi şeklinde olan serrat kanatlı bireyler meydana gelir. *Bd^S* genini bulunduran TM3 dengeleyici kromozomuna sahip ergin bireyler normal kanatlı bireylerden kanatlarının kenarlarının kesikli ve testere görünümlü olmasıyla ayırt edilir (Şekil 2.12). *D. melanogaster flr³* bireylerin fenotipinde kanat uçları oval bir yapıdadır kanat trikomları ise normal, uzun ve düz iken, mutasyon halinde kıllar kısalmış kalın ve düzgün olmayan, koyu renkli balon şeklinde veya nokta görünümlüdür (Graf vd. 1984, Graf ve Vanschaik 1992, Rincon ve Graf 1995, Kaya 2000, Marcos ve Carmona 2013).

Normal kanatlar hem rekombinasyon hem de mutasyon sonucu oluşan mutant klonları içerir, serrat kanatlar (*mwh/TM3, Bd^S*) dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılamasıyla gerçekleşen mutasyon sonucu oluşan klonları içerir. Bu nedenle kanat Smart testi değerlendirme aşamasında, kanatlar morfolojilerine göre normal (düzgün) kanatlı ve serrat kanatlılar olmak üzere gruplandırılarak kanat preparatları hazırlanır ve inceleme yapılır.

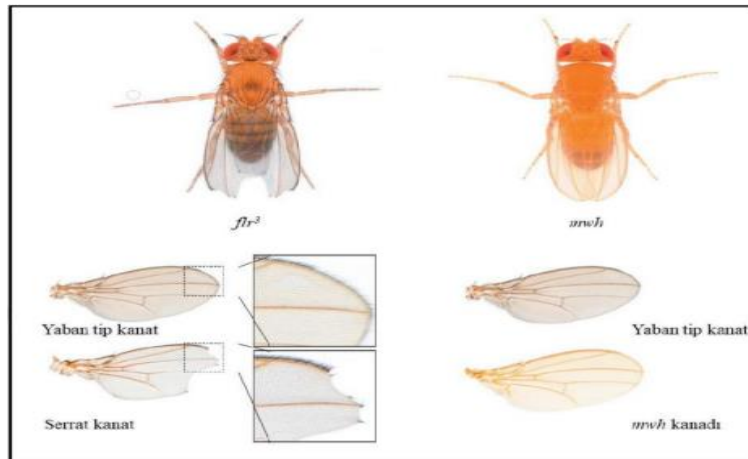
-Erkek bireyler (♂): *mwh/mwh*; Bu mutant soyun taşıdığı çoklu kanat kılı geni (*mwh*) mutasyonu resesiftir ve belirleyici diğer bir gendir. 3. kromozom üzerinde kromozomun

sol kolunun ucunda telomere (3-0.3) yakın lokasyonda taşınır (Şekil 2.11). *mwh* mutant genini homozigot olarak bulunduran sinekler yaşatılabilir ve bu durumda kanat hücrelerinde hücre başına bir trikom (kanat kılı) olması gerekirken çoklu kanat kılı oluşur, normal *Drosophila* bireylerinde ise bir kanat hücresinde bir tane trikom çıktığı görülür (Rubin ve Lewis 2000). *mwh* genini taşıyan soyun fenotipte kanat uçları yaban tip görünümündedir (Şekil 2.12), normal uzun kanatlıdır (Lindsley ve Zimm 1992).

Çalışmada kullanılan yabanıl soy (Oregon-R+) ile mutant soylar (*flr* ve *mwh*), Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda saf soylar olarak çoğaltılmaktadır.



Şekil 2.11 *Drosophila melanogaster* kanat Smart testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki lokasyonları (Kaya 2000).



Şekil 2.12 *Drosophila flr3* ve *mwh* mutantlarının kanat ve vücut yapıları (Kuşun 2022).

2.3 Lokomotor Aktivite ve Davranışların Biyolojik Önemi

Lokomotor davranış, bir türün evrimsel süreçte kazandığı adaptasyonlar sonucu farklı çevresel faktörler için gösterdiği hareket tepkileri olarak tanımlanmaktadır. *D. melanogaster*'de lokomotor aktivite çiftleşme, üreme, dispersal yetenek, strese karşı yanıt, besin bulma, alan savunması, predatörlerden kaçınma ve hayatta kalma gibi organizmanın evrimsel anlamda varlığı için önemli birçok hayvansal davranışı kapsamaktadır. Örneğin; *Drosophila* dişilerinde kanat sallama süresi eşleşme uyarımında etkilidir ve lokomotor aktivite varyasyonlarındandır. Canlının varlığını devam ettirebilmesi için lokomotor davranıştaki varyasyonlar oldukça önemlidir. Bireysel farklılıklar lokomotor aktivite ve reaktivitede, eşeyssel seçilim sonuçları meydana getirmektedir. Aktivitenin bireysel farklılıkları genetik kontrol altındadır. Lokomotor reaktivite ise yapay seçilime oldukça güçlü bir yanıt olarak *Drosophila*'da kendini göstermektedir. Reaktivite, bireyin stabil bir çevreye transferi sonrası ölçülen aktivite düzeyinin zaman içerisindeki değişimi olarak tanımlanabilir. Davranışsal özellikler için lokomotor reaktivite kalıtsallığı olabildiğince yüksektir. Lokomotor davranış, evrimsel önemi yanında birçok hastalıkla ilişkilendirilmiş, sosyal etkileşimlerden ve çevreden etkilenen oldukça kompleks bir karakterdir (Burnet vd. 1988, Gilchrist vd.1997, Jordan vd. 2006, Jordan vd. 2007).

D. melanogaster gibi model organizmalar lokomotor davranışın genetik analizini, davranışın ortaya çıkmasında etkili olan genlerin anlaşılmasını, mutasyonların etkilerinin gözlemlenmesini ve kompleks davranışların genetik yapısını incelemeyi oldukça kolaylaştırmaktadır. Model organizmalarla çalışmak kantitatif karakter lokuslarını (QTL) haritalayabilmek için oldukça önemlidir ve *Drosophila* kantitatif genetikte kullanılan ilk model organizmadır (Caligari ve Mather 1975, Mackay 2001, Ali vd. 2011). Uyku, besin alımı, açlık direnci ve alkol duyarlılığı gibi birçok karakter kantitatif karakter olarak sayılabilir (Mackay ve Huang 2018). *D.melanogaster* genomunun küçük olması, jenerasyon süresinin kısa olması, laboratuvar ortamında çaprazlama ve kendileştirme kolaylığı açısından birçok kantitatif karakterin çalışılmasına olanak sağlamaktadır (Spradling 1997). Lokomotor davranışlar canlılar arasında evrimsel olarak çoğunlukla korunduğundan model organizma *Drosophila* ile çalışmak oldukça mantıklı görülmektedir (Jordan vd. 2006).

Drosophila üzerinde gerçekleştirilen davranışsal toksisite deneyleri yaygın olarak

kullanılmakta ve kimyasal ajanların toksik etkileri değerlendirilmektedir (Kurşun vd. 2021). İnsan ve *Drosophila*'nın nörotoksik kimyasallara benzer davranışsal yanıt verdiği bilinmektedir (Janner vd. 2021). Erken gelişim evrelerinde nörotoksik maddelere kalınan maruziyet organizmaların sonraki gelişim aşamalarında davranışsal bozukluklara neden olabilmektedir (Grandjean ve Landrigan 2014). Organizmalar beslenme, yürüme, uçuş, çiftleşme gibi davranışları motor kontrol ile gerçekleştirmektedir. Uyarılar merkezi sinir sisteminden çıkar ve kaslara iletilerek motor fonksiyonlar gerçekleştirilir. Sinir hücrelerinden kas hücrelerine uyarı iletiminin sekteye uğraması organizmanın motor fonksiyonlarında bozulmalara yol açmaktadır (Manjila ve Hasan 2018). Canlıların beyinde oluşan biyokimyasal bozukluklar ve yüksek düzeyde oksidatif stres nörodavranışsal toksisiteye sebep olabilmektedir. İnsanla benzer genlerinin varlığı ve karmaşık davranışsal yetenekleri *Drosophila*'yı nörodavranışsal bozukluklar için uygun bir model haline getirmektedir (Sarkar vd. 2021). Lokomotor aksaklıklarla ilgili Huntington hastalığı, Parkinson hastalığı, depresyon, aktivite bozukluğu gibi birçok nörolojik hastalık insanda görülebilmektedir. Bu bağlamda lokomotor aktivitenin genetik analizi, insan sağlığı ve evrimsel biyoloji açısından önemli bir çalışma alanıdır (Jordan vd. 2006, Jordan vd. 2007, Ali vd. 2011).

Bir organizmanın belirli davranışları nasıl sergilediğini anlamak akıllarda oldukça önemli biyolojik bir soru işareti bırakmaya devam etmektedir. Fonksiyonel genomik teknolojilerdeki ilerlemelerle birlikte araştırmacılar artık genom çapında karmaşık davranışlarda yer alan genleri ortaya çıkarmaya çalışmaktadır. Davranışı incelemek için genomik yaklaşımları içerecek sistem düzeyinde bir ağ yaklaşımı, davranışların düzenlenmesi modülasyonunu ve davranışların düzenlenmesinde bağlamın önemini anlamamanın anahtarı olacaktır. Meyve sineği *D. melanogaster* gibi basit bir model organizmada davranışı incelemek, iyi tanımlanmış anatomi ve fizyolojinin yanı sıra ileri düzeyde moleküler genetik yaklaşımların avantajlarına sahiptir (Neville ve Goodwin 2012).

2.4 Comet Testi

Hücre DNA'sında, replikasyon mekanizmasında ve kromozomlarda meydana gelen değişiklikleri ve oluşan hasarı ifade eden tanımlar genotoksisite ya da genetik toksisite

olarak adlandırılmaktadır (Mouchet vd. 2005). Genotoksik ajanlara pestisitler, endüstriyel kimyasallar, ksenobiyotikler ve farmasötik bileşikler örnek olarak verilebilir ve bu ajanlar DNA seviyesinde baz eklemesi, baz silinmesi ve yanlış baz eşleşmesi gibi değişikliklere neden olabileceği gibi; anöploidi, mikroçekirdek oluşumu gibi kromozomal hasarlar da oluşturabilir (Umbuzeiro vd. 2017). Meydana gelen tüm bu değişimler genotoksisitenin belirteçleri olarak kabul edilmekte olup, genotoksisite testleri ile belirlenebilmektedir (Mouchet vd. 2005). Bu testler kimyasal maddelerin güvenlik değerlendirilmesinin yapılmasını sağlayarak, ulusal ve uluslararası yasalara bağlı olarak tüm canlıların ve çevre sağlığının korunmasını amaçlamaktadır. Genotoksik potansiyeli araştırılan bir ajanın öncelikle *in vitro* analiz testleri gerçekleştirilerek temel değerlendirme çalışması yapılır ve bunu takiben *in vivo* hayvan testleri ile çalışmalar devam eder (Corvi ve Madia 2017).

In vitro genotoksisite testleri gen ve kromozomal hasarları belirleyen testleri içermekle birlikte bu testlerin dezavantajı organizmalardaki absorpsiyon, dağılım ve kimyasalların atılımının değerlendirilmesinde yetersiz olmasıdır. Bu sebeple model organizmalarda gerçekleştirilen *in vivo* genotoksisite testleri oldukça önemlidir. Bu bağlamda tez çalışmasında *D. melanogaster* üzerinde comet testi yapılmıştır.

Comet, genetik materyalde oluşan tahribat ile tahribat düzeyinin ve genotoksisitenin araştırılmasında oldukça önemli bir tekniktir. Günümüzde genotoksik etkilerin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan ve “tek hücre jel elektroforezi” olarak da ifade edilen Comet yöntemi gün geçtikçe çalışmalarda daha da çok uygulanan bir test tekniği haline gelmiştir. Comet testi genetik toksikoloji, yaşlanma ve moleküler epidemiyoloji gibi daha birçok alanda kullanılmaya devam etmektedir (Martin vd. 1993, İpek 2022).

DNA hasarı, fiziksel ve genotoksik ajanlara ya da endojen faktörlere maruz kalma sonucunda meydana gelen, DNA’nın genomik yapısında ortaya çıkan kimyasal değişiklikleri içeren bir terimdir (Bankoglu vd. 2021). Farklı sebeplerle DNA bütünlüğünün bozulduğu bu gibi durumlarda, genotoksisite testlerinden biri olan Comet testi ile DNA hasarı belirlenebilmektedir (Gajski vd. 2021). DNA hasarının hücre düzeyinde belirlenebildiği bir test sistemi olan Comet’in, hızlı, çok yönlü, güvenilir,

düşük maliyetli ve hassas bir yöntem olması diğer genotoksisite testlerinden farkını ortaya çıkaran özellikleridir (Moller 2018, Gajski vd. 2021).

2.5 Smart Testi

Drosophila kanat Smart testi *Drosophila*'nın belirlenmiş özellikleri dikkate alınarak Graf vd. (1984) tarafından uygulanmış ve geliştirilmiş olup, çeşitli kimyasal ajanların rekombinojenik ve mutajenik aktivitelerini belirleyebilen bu yöntemde *D. melanogaster* Meigen'in *mwh* ve *flr*³ mutant ırklarının çaprazlanmasıyla oluşan heterozigot larvaları kullanılmaktadır (Bernards ve Hariharan 2001). Smart tekniği kullanılarak günümüze kadar birçok maddenin genotoksik, antigenotoksik, rekombinojenik ve mutajenik etkileri tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Smart yönteminin memeli *in vivo* ve mikroorganizmal *in vitro* genotoksisite testleri arasında bir bağlantı sağladığını ortaya koymuştur (Frei ve Würzler 1996). Göz benek ve kanat benek olmak üzere iki farklı şekilde uygulanan Smart testi heterozigot larvaların imajinal disk hücrelerinden birinde nokta mutasyon, ayrılmama, delesyon ve rekombinasyon gibi genetik bir değişiklik olursa, oğul hücrelere aktararak mutant hücre grupları olan benekler ergin bireyin gözlerinde veya kanatlarında ortaya çıkmaktadır. Farklı kimyasal ajanlara maruz bırakılan sineklerde ortaya çıkan beneklerin frekansı uygulanan ajanın genotoksik aktivitesi ile ilgili sayısal sonuçlar verirken, benek oluşumunda rol oynayan mutasyon çeşitlerini beneklerin tipi ortaya çıkarmaktadır (Henderson 2004). Smart yöntemi gıda, tekstil ve mobilya sanayi gibi güncel uygulamalarda kullanılan kimyasal maddeler, tıbbi ilaçlar, sanayi ve çevresel atıklar ile zirai mücadelede kullanılan ajanlar gibi birçok maddenin genotoksisitesini belirlemek amacıyla yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Bu testin diğer testlere göre avantajı ekonomik, hızlı ve güvenilir olması, tek bir jenerasyon sonunda verilerin elde edilebilmesi, tek bir sinek kanadı ile çok sayıda hücrenin analizini sağlaması ve genotoksik etkinin fenotipte yansımalarının kolaylıkla gözlenebilmesi sayılabilir (Yeşilada 2001, Çetinkaya 2016)

2.6 Önceki Çalışmalar

DAPA ile daha önce yapılmış herhangi bir davranış toksisite çalışması bulunmamakla beraber diğer SGLT2 inhibitörleri ve antidiyabetik ajanlar ile ilgili literatürde farklı

model organizmalar üzerinde değişik lokomotor aktiviteler ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Örneğin Mohammed vd. (2024) Rotenon kaynaklı Parkinson hastalığında bir SGLT2 inhibitörü Empagliflozin'in nöroprotektif etkisinin değerlendirilmesini amaçladığı çalışmalarında Rotenon'un, rotarod performans testinde sıçanların lokomotor aktivitesini ve tutulma süresini azaltırken iniş gecikme süresini uzattığını, öte yandan Empagliflozin'in bu davranış değişikliklerini düzelttiğini gözlemlemişler ve elde ettiği sonuçlar histolojik inceleme ve sağlam nöronların sayısı ile doğrulanmıştır.

Jayarathne vd. (2022) bir SGLT2 inhibitörü olan antidiyabet ilacı Kanagliflozin tedavisinin cinsiyete özgü nöroprotektif etkilerini araştırmak amacıyla farklı yaş gruplarındaki dişi ve erkek farelere Kanagliflozin uygulamışlardır. Kanagliflozin tedavisinin yaşlı erkek farelerde insülin duyarlılığını artırdığını, ayrıca 30 aylık erkek farelerin keşif ve lokomotor aktivitelerini iyileştirdiğini ancak dişi farelerde iyileşme görülmediğini ortaya koymuşlardır ve nörodejeneratif hastalıkların potansiyel tedavisi için Kanagliflozin uygulanmasını önermişlerdir.

Parkinson hastalığı, en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Diabetes mellitus, kanda yüksek düzeyde glikoz bulunmasıyla karakterize edilen bir metabolik hastalıktır. Son epidemiyolojik çalışmalar her iki hastalık arasındaki bağlantıyı vurgulamıştır; hatta Diabetes mellitus'un PH için bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. Bu hastalıkların olası ilişkisini daha fazla araştırmak için Sanz vd. (2022) DJ-1β geninin (insan DJ-1 ortologu) etkisizleştirilmesine dayanan bir *Drosophila* parkinson hastalığı modelini, diyetle indüklenen *Drosophila* modelini ve fareleri kullanarak sineklerin yüksek şeker içeren bir ortamla ve farelerin yüksek yağlı bir diyetle beslenmesiyle T2DM modellerini elde etmişlerdir. Her iki sinek modelinin de diğerlerinin yanı sıra karbonhidrat homeostazisindeki değişiklikler, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu veya motor kusurları gibi ortak fenotipler sergilediği sonucuna ulaşmışlardır.

Catterson vd. (2010) yaptıkları çalışmada otomatik davranış izleme, kılcal beslenme tahlili ve farmakolojik tedaviler kullanarak, diyet mayası ve sükrozun *Drosophila*'nın uyku-uyanıklık davranışı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Diyet mayasının, erkeklerde uykudan uyanmayı teşvik ederek ve dişilerde lokomotor aktivite sürelerini kısaltarak

sineklerin uyku-uyanıklık davranışını düzelttiğini, ayrıca diyetteki sakkaroz konsantrasyonunu artırarak, günlük toplam sakkaroz alımı üzerinde ya da uyarılma üzerinde herhangi bir etki yaratmadığını, ancak erkeklerin ve kadınların aktif kalma süresini uzattığını gözlemlemişlerdir. Diyetteki daha yüksek sakkarozun, dişi sineklerin değil, erkek sineklerin toplam uykularının azalmasına neden olduğunu, oksidatif fosforilasyonu inhibe eden bir ilaç olan Metformin'in, sinekleri besleyerek lokomotor aktiviteyi azalttığını ancak uykunun herhangi bir yönünü etkilemediğini ortaya koymuşlardır.

Pioglitazon, etkili ve uzun süreli glisemik kontrol sağlayan insülin duyarlaştırıcı bir diyabet ilacıdır. İnsülin ve İnsülin Büyüme Faktörü benzeri sinyal yolları, nematodlarda, böceklerde ve memelilerde iyi bilinen uzun ömürlü yolaklardır. Bilindiği kadarıyla *Drosophila*'da bu yolu hedef alan ilaçların yaşlanma karşıtı özelliklerini değerlendiren sistematik bir farmakolojik çalışma bulunmamaktadır. Jafari vd. (2007) *Drosophila*'da bu bileşiklerin yaşlanma karşıtı bir rol oynadığını gösteren yayınlanmış bir veri olmamasına rağmen, bunların umut verici farmakolojik profillerinin mortaliteyi azaltabileceğini varsaymışlar ve yaptıkları çalışmada *Drosophila*'da insülin sinyal yolunu hedef alabilecek dört bileşiğin yaşlanma karşıtı özelliklerini değerlendirmişlerdir. Pioglitazonun yaşlanma karşıtı özellikler gösterdiğini tespit etmişlerdir.

DAPA ile daha önce yapılmış herhangi bir Comet testi bulunmamaktadır, bu bağlamda çalışmamızda elde edilen veriler literatüre ilk kez kazandırılmıştır. Bunun dışında diğer SGLT inhibitörleri ve antidiyabetik ajanlarla yapılmış DNA hasarı belirleme çalışmaları mevcuttur. Örneğin Tokajuk vd. (2015) yaptıkları çalışmada, insan lenfositlerinde 10 nM ve insan kolon adenokarsinom hücrelerinde (HT29) 0,5-1 nM minimum insan insülin konsantrasyonunun, tedaviden 24 saat sonra *in vitro* DNA hasarı ve MN düzeylerinde artışa yol açtığı ortaya koymuşlardır. Özel klinik çalışmalardan elde edilen veriler, insülin veya analoglarını kullanan hastalarda kanser riskinin arttığına dikkat çekmektedir. Othman vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ilk kez patofizyolojik insülin konsantrasyonlarının, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi yoluyla kolon hücrelerinde ve insan periferik lenfositlerinde DNA hasarını tetikleme yeteneğini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada insan kolon adenokarsinomu hücreleri (HT29), standart

protokollerde 5 nM insülin ile tedavi sonrasında kuyruklu yıldız tahlili ve mikronükleus frekans analizi kullanılarak DNA hasarında önemli bir artış gösterdiğini rapor etmişlerdir. Amador vd. (2012) Metformin'in genotoksitesini Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde, CHO-K1'de kromozom anormallikleri ve Comet testi ile, farelerde de mikronükleus testi ile araştırmışlar ve *in vitro* testlerde 114.4 ve 572 µg/mL konsantrasyonlarını kullanarak her iki konsantrasyonda da 24 saatlik inkübasyonun ardından Comet testi sonuçlarına göre DNA hasarı tespit etmişlerdir. Ancak buna tezat oluşturacak bir çalışma ise *in vitro* insan lenfosit kültürü ile çalışılmış ve bu ilacın 72 saat sonunda Comet testinde herhangi bir genotoksik etkiye veya artan oksidatif strese neden olmadığı saptanmıştır (Malek vd. 2015). Bedir vd. (2008) yılında yaptıkları çalışmada ise yine bir SGLT2 inhibitörü olan Pioglitazone'un genotoksitesini Comet testi ile araştırmışlar ve 10, 20 ve 40 mg/kg olmak üzere 3 farklı dozun tümünde de kontrole kıyasla lenfositlerde ve hepatositlerde DNA hasarı düzeyinde doza bağlı önemli bir artış olduğunu saptamışlardır. Yine Bedir vd. (2006) yaptıkları çalışmada bir SGLT2 inhibitörü olan Rosiglitazone'nun genotoksitesini araştırmak için 0.5, 1 ve 2 mg/kg olmak üzere 3 farklı doz kullanarak Sprague-Dawley sıçanların periferik kan hücrelerinde ve hepatositleri üzerinde Comet testi uygulamışlar ve tüm dozlarda kontrole kıyasla hepatositlerde DNA hasarı düzeyinde doza bağlı anlamlı artış, lenfositlerde ise yalnızca son iki yüksek dozda hasar tespit etmişlerdir.

DAPA ile daha önce yapılmış herhangi bir Smart testi bulunmamaktadır bu bağlamda çalışmamızda elde edilen veriler literatüre ilk kez kazandırılmıştır. Yine diğer SGLT2 inhibitörleri ile ilgili de herhangi bir smart çalışmasına rastlanmamıştır. Bunların dışında ise farklı antidiyabetikler ile sınırlı smart çalışması bulunmaktadır. Oliveira vd. (2017) antidiyabetik bir ilaç olan Metformin ile birlikte antikanser ilaç olan Doksorubisin ile yapmış oldukları çalışmada, tek başına Metformin'in farklı konsantrasyonlarının (2,5, 5, 10, 25 veya 50 mM) mutajenite, rekombinojenite ve karsinojenite açısından incelemişler ve Metformin'in kullanılan dozlarının tek başına herhangi bir mutasyon veya rekombinasyona neden olmadığını rapor etmişlerdir. Gürbüz vd. (2014) yaptıkları çalışmada, tip 2 diabetes mellitusta yaygın olarak kullanılan iki sülfonilüre olan glimepirid ve glipizid, *Drosophila* smart testi ile genotoksitesini araştırmış, glimepirid ve glipizidin özellikle homolog somatik rekombinasyona bağlı olan genotoksite

gösterdiğini rapor etmişlerdir. Glimepirid 25 µg'lık doz uygulamasında, glipizid ise 25 ve 50 µg'lık doz uygulamalarında pozitif genotoksisite göstermiştir. Bu çalışma sonuçları tez çalışmamızın son uygulama dozu olan 0.9 mM'lık DAPA uygulaması ile paralellik göstermiştir. Horiya vd. (1996) *Drosophila* ile yaptıkları wing spot testinde 7 tümör promotörü (BHA, BHT, klofibrat, DEHP, dietilstilbestrol, fenobarbital ve sodyum sakarin) ve 2 tümör dışı promotor (insülin ve kanamisin) olmak üzere farklı maddeleri değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar bu maddelerin 3 saatlik tedavi ile oluşturulan kanat lekelerinin frekansları üzerinde indirgeyici etkileri olabileceği varsaymışlar, benzen hariç 7 promotörün 6'sı indirgeyici etkisinin olduğunu ancak 2 tümör dışı promotörün herhangi bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan 2 tümör dışı promotörden biri olan insülin antidiyabetik bir ajandır ve MMC ile indüklenen wing spotlarda herhangi bir düzeltici aktivite göstermemiştir.

DAPA ve SGLT2 inhibitörleriyle daha önce yapılmış az sayıda çalışma mevcut olup, yapılan diğer çalışmalar ise şunlardır: Reilly vd. (2014) yaptıkları çalışma ile DAPA'nın Sprague Dawley cinsi sıçanların periferik kan kültürlerinde 25, 100, 150 ve 200 mg/kg olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda kromozom aberasyonlarını incelemişler ve uygulamadan 24 saat sonra herhangi bir etkiye rastlamamışlardır. Yine aynı çalışmada sıçanların kemik iliği hücrelerinde 350, 700 ve 1050 mg/kg dozlarında mikronükleus testi uygulamışlar ve yine herhangi bir etkiye rastlamamışlardır.

Bogdanffy vd. (2014) yaptıkları çalışmada SGLT2 inhibitörü olan Empagliflozin erkek ve dişi Wistar cinsi ratlarda 100, 300, 1000 ve 2000 mg/kg konsantrasyonlarda mikronükleus testi ile çalışmış ve herhangi bir etkiye rastlamamışlardır. Yine diğer SGLT2 inhibitörleri ile farklı model organizmalar üzerinde değişik genotoksisite testleriyle yapılan bazı çalışmalarda da bu ajanların genotoksik hasar oluşturmadığı tespit edilmiştir (Smith vd. 2017, Int. Kyn. 7).

3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışma kapsamında kanda insülin seviyesinin düzenlenmesinde kullanılan DAPA'nın farklı konsantrasyonları *D. melanogaster* larvalarına uygulanmış, davranış deneyleri ile DAPA'nın davranışsal toksisitesi, Comet ve Smart test yöntemleriyle de DAPA'nın genotoksik ve sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

Davranış toksisitesini araştırmak için DAPA'nın 0.1 mM, 1 mM, 5 mM ve 10 mM'lik konsantrasyonları Instant Medium hazır besiyerine uygulanmış, 72±4 saatlik yabanıl tip (*Oregon R+*) *D. melanogaster* larvaları hazırlanan DAPA'lı besiyerlerine 24 saat maruz bırakılarak larval ağırlık, larval hareket, pupa oluşturma başarısı, pupa pozisyonu, pupadan çıkış başarısı, ergin birey ağırlığı ve negatif jeotaksis deneyleri gerçekleştirilmiştir (Kurşun vd. 2021).

DNA hasarını tespit etmek amacıyla Singh vd. (1988) tarafından geliştirilmiş olan Comet yöntemi uygulanmış, *Drosophila*'nın yabanıl tip (*Oregon R+*) 72±4 saatlik larvaları Instant Medium hazır besiyerine uygulanan 0.1 mM, 1 mM, 5 mM ve 10 mM'lik DAPA konsantrasyonlarına 24 saat bırakılarak 96±4 saatlik bu larvaların hemositleri Irving vd. (2005) metodu baz alınarak izole edilmiş ve DNA hasarı araştırılmıştır.

DAPA'nın genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla Graf vd. (1984)'nin geliştirdiği Smart tekniği kullanılmıştır. 72±4 saatlik *D. melanogaster mwh/flr³* transheterezigot larvalar 0.225 mM, 0.45 mM ve 0.9 mM olmak üzere üç farklı DAPA konsantrasyonuna maruz bırakılmış, imajinal disk hücrelerinde oluşan değişimlerin ergin birey kanat fenotipinde mutant klon oluşturma genotoksik etkinin değerlendirilmesini sağlamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında uygulanan üç farklı teknik davranış deneyleri, Comet yöntemi ve Smart tekniğinin uygulama basamakları materyal metot bölümünde ayrı başlıklar altında detaylı olarak açıklanmıştır. Deneyler 25±1 °C sıcaklık ve %60 bağıl nemde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortam koşullarında gerçekleştirilmiştir.

3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Binoküler Mikroskop (Olympus, Japan)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- CO₂ İnkübatörü (Panasonic, Japan)
- Elektroforez (Thermo Scientific EC 1000-90, USA)
- Floresan Mikroskop (Olympus, Japan)
- Hassas Terazi (Sartorius, Germany)
- Otoklav (Jeio tech, Korea)
- pH metre (Hanna Instruments, Romania)
- Saf Su Cihazı (GFL 2102, Germany)
- Santrifüj (Hettich, Germany)
- Sıcak Su Banyosu (Mettler WNB10, Germany)
- Stereo Mikroskop (Nikon SMZ645)
- Vortex (IKA, USA)

3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışı

Bu çalışmada davranış toksisitesi deneyleri için kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Davranış deneylerinde kullanılan test materyalleri (Kurşun vd. 2021).

Kimyasal	Kullanım alanı
Agar (Sigma-Aldrich, Germany)	<i>D. melanogaster</i> kültürlerinin çoğaltılması aşamasında besiyeri hazırlanmasında ve larval hareketin gözlemlenmesi aşamasında kullanılır.
Eter (Sigma-Aldrich, Germany)	Ergin bireylerin ağırlık ölçümü aşamasında ergin <i>Drosophila</i> bireylerini bayıltmak için kullanılır.
Distile Su	<i>D. melanogaster</i> kültürlerinin çoğaltılması aşamasında besiyeri hazırlanmasında kullanılır.

Bu çalışmada Smart testi için kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 *Drosophila melanogaster* kanat Smart testinde kullanılan kimyasallar (Kaya 2000).

Kimyasal	Kullanım alanı
Agar (Sigma-Aldrich, Germany)	<i>D. melanogaster</i> kültürlerinin çoğaltılması aşamasında besiyeri hazırlamada kullanılır.
Eter (Sigma-Aldrich, Germany)	Ergin bireylerin toplanması aşamasında ergin <i>Drosophila</i> bireylerini bayıltmada kullanılır.
Gliserol (Sigma-Aldrich, Germany)	Faure solüsyonunu hazırlamada kullanılır.
Etil Alkol (Sigma-Aldrich, Germany)	Bençlerin sterilizasyonunu sağlamak için ve kanatları incelenecek ergin bireyleri saklama aşamasında kullanılır.
Gum arabic	Faure solüsyonunu hazırlamada kullanılır.
Kloral hidrat (Sigma-Aldrich, Germany)	Faure solüsyonunu hazırlamada kullanılır.

Smart testinde kullanılan Faure solüsyonunun hazırlanışı Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Faure Solüsyonunun Hazırlanması (Kaygısız 2016).

Kimyasal	Miktar
dH ₂ O	50 mL
Gliserol	20 mL
Gum arabic	30 g
Kloral hidrat	50 g

Hassas terazi ve mezür yardımıyla ölçülen maddeler karıştırılarak elde edilen faure solüsyonu kapalı bir kap içerisine alınıp çalışma aşamasında kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edildi.

Bu çalışmada Comet testi için kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Comet testinde kullanılan kimyasallar (İşlek 2023).

Kimyasal	Kullanım alanı
DMSO (Dimetil sülfoksit) (Sigma, China)	Lizing solüsyonunu hazırlama aşamasında kullanılır.
EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (Sigma, USA)	DNA zincirinin uzamasında gerekli olan magnezyumu bağlayarak DNA zincirlerinin uzamasına engel olur. Elektroforez tamponu ile liziz solüsyonunu hazırlanma aşamasında kullanılır.
Etidyum Bromür (Vivantis, USA)	DNA’ların floresans mikroskop altında görünür olmasını sağlamak için kullanılır.
Etil Alkol (Sigma-Aldrich, Germany)	Bençlerin sterilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılır.
HCl (Hidroklorik Asit) (Sigma, USA)	Elektroforez solüsyonunu (tamponunu) hazırlama aşamasında kullanılır.
LMA (Low Melting Agarose) (Düşük erime noktalı agaroz) (Sigma, USA)	DNA kırıklarının inceleneceği preparatları kaplama ve hücrelerin tutunmasını sağlamak amacıyla kullanılır.
NaCl (Sigma-Aldrich, Germany)	Liziz tamponunu hazırlamada kullanılır. DNA’nın nötralize olmasına yardım eder. Hücre duvarını geçip proteinlerin hücre duvarından ayrılmasını sağlar.
NaOH (Sodyum hidroksit) (AppliChem, Germany)	Elektroforez tamponunu hazırlama aşamasında kullanılır.
NMA (Normal Melting Agarose) (Normal erime noktalı agaroz) (Sigma, USA)	DNA kırıklarının inceleneceği preparatları kaplanma ve hücrelerin tutunmasını sağlamak amacıyla kullanılır.
PBS (Phosphate Buffered Saline) (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) (Sigma, Germany)	Hemositleri ayırmak, hücreleri seyreltip arındırmak için kullanılır.
Feniltiyöüre (Sigma-Aldrich, Germany)	Hemositleri ayırmak, hücreleri seyreltip arındırmak için kullanılır.
Tripan Blue Solüsyonu (Sigma, USA)	Canlı hücreleri tespit etmek amacıyla kullanılır.
dH ₂ O (Distile su)	Alkalinin etkisini nötrleştirmek amacıyla preparatların yıkanmasında kullanılır.

Çizelge 3.4 (Devam) Comet testinde kullanılan kimyasallar (İşlek 2023).

Kimyasal	Kullanım alanı
Trisma Base (Sigma, USA)	Liziz ve nötralizasyon tamponunu hazırlama aşamasında kullanılır.
Triton X-100 (Sigma, USA)	Proteinler arası bağları ve lipidler arasındaki bağları bozarak DNA'nın hücre içeriğinden izole olmasına yardım eder. Lizing solüsyonunu hazırlanma aşamasında kullanılır.

3.2.1 Comet Testinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Bu çalışmada Comet testi için kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Çizelge 3.5-Çizelge 3.13'de verilmiştir.

Çizelge 3.5 Düşük erime noktalı agaroz (LMA) çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
PBS	2.0 mL
LMA	0.015 g

0.015 g LMA hassas terazide tartılarak cam tüp içerisine alındı, 10 kat seyreltilen 2 mL PBS cam tüpe eklendi ve % 0.8'lik çözelti elde edildi. Şeffaf bir LMA çözeltisi elde edilene kadar cam tüp bek alevinde kaynatıldı. LMA'nın bulunduğu tüp kullanım esnasında sıcak su bulunan beher içerisinde bekletildi.

Çizelge 3.6 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar (g)
EDTA	0.185
NaOH	0.6

NaOH ve EDTA hassas terazide tartılarak bir behere alındı ve üzerine son hacim 500 mL'ye tamamlanacak şekilde dH₂O ilave edildi. HCl damlatılarak elektroforez tamponun pH derecesi 13.2 değerine ayarlandı. Damlatma işlemi pH değerinin hızlı bir şekilde değişmemesi için yavaş ve aralıklı sürelerle yapıldı. Hazırlanan tampon çözelti bir şişeye alındı ve çalışmada kullanılabileceği kadar +4°C'de saklandı.

Çizelge 3.7 Etidyum bromür çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar (g)
EtBr	0.01

0.01 g etidyum bromür hassas terazide tartılarak bir behere alındı ve üzerine son hacim 50 mL olacak şekilde dH₂O eklendi, dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldı (Etidyum bromür kanserojen bir madde olduğu için cilt ile temas etmemelidir). Hazırlanan stok çözelti +4 °C’de saklandı, çalışmada kullanılırken 10 kat seyreltildi.

Çizelge 3.8 %70’lik etil alkol çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar (mL)
Etil alkol	67.2

%96’lık etil alkol mezürle 67.2 mL olacak şekilde ölçüldü ve üzerine son hacim 100 mL olacak şekilde dH₂O eklendi.

Çizelge 3.9 Liziz çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
EDTA	18.6 g
NaCl	73 g
Trizma baz	0.66 g

18.6 g EDTA, 73 g NaCl ve 0.66 g trizma baz hassas terazide tartılarak bir behere alındı, üzerine 500 mL dH₂O eklenerek karıştırıldı. Yavaş bir şekilde NaOH damlatılarak pH derecesi 10 olarak ayarlandı. Hazırlanan liziz çözeltisi bir şişeye alındı ve çalışmada kullanılana kadar +4°C’de muhafaza edildi.

Çizelge 3.10 Liziz çözeltisinden lizing çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar (mL)
DMSO	5
Triton X-100	5

+4°C’de muhafaza edilen liziz çözeltisi çalışmanın yapılacağı gün çıkarıldı. 500 mL liziz çözeltisinden 10 mL alınarak atıldı, yerine 5 mL DMSO ve 5 mL Triton X-100 eklendi

ve pipetaj yöntemiyle karıştırıldı.

Çizelge 3.11 Normal erime noktalı agaroz (NMA) çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
PBS	3 mL
NMA	0.03 g

0.03 g NMA hassas terazide tartılıp cam deney tüpüne alındı. Daha sonra üzerine 10 kat seyreltilmiş 3 mL PBS eklendi ve %1’lik NMA çözeltisi elde edildi (10 kat seyreltilmiş PBS çözeltisi, 1mL PBS üzerine 9 mL dH₂O eklenerek hazırlandı). NMA ile PBS karışımı çözüldükten sonra bunzen beki alevinde agarozun daha iyi tutunması için kaynayana kadar ısıtıldı ve şeffaf bir NMA çözeltisi elde edildi. NMA’nın bulunduğu tüp hemen soğumaması için kullanım esnasında sıcak su bulunan beher içerisinde bekletildi.

%1’lik NMA çözeltisinden mikropipetle 160 µL alınarak ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılmış lamaların üzerine bir defada bırakıldı, yatay tutulan pipetin ucu ile zemin/katman oluşturmak için lam üzerine yayıldı ve oda sıcaklığında (25 °C) kururken havayla temas etmemesi için çalıştırılmayan inkübatöre bırakıldı.

Çizelge 3.12 Nötralizasyon çözeltisi hazırlama.

Kimyasal	Miktar (g)
Trizma baz	29.1

29.1 g Trizma baz tartıldı ve bir behere alındı, üzerine son hacim 600 mL olacak şekilde dH₂O eklendi ve karıştırıldı. Çözeltinin pH derecesi HCl damlatılarak 7.5 olacak şekilde pH metre yardımıyla sabitlendi. HCl damlatma işlemi yavaş ve aralıklı sürelerle yapıldı. Çözelti bir şişeye alındı çalışmada kullanılabilecek kadar + 4 °C’de muhafaza edildi.

Çizelge 3.13 Feniltiyoüre çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
Feniltiyoüre	0.07 g
PBS	100 mL

Hassas terazide 0.07 g feniltiyoüre tartıldı ve bir şişeye alındı, üzerine 10 kat seyreltilmiş

100 mL PBS eklendi, şişenin ağzı kapatılarak yavaş dairesel hareketlerle karıştırıldı ve çalışmada kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edildi.

3.3 *Drosophila melanogaster*’de Lokomotor Aktivite Davranış Deneylerinin Uygulanması

Çalışma kapsamında DAPA’nın davranışsal toksisitesini araştırmak amacıyla tüm davranış deneyleri için yabanıl tip (*Oregon R+*) *D. melanogaster* bireyleri kullanılmıştır. Yumurta toplama işlemi gerçekleştirildikten sonra 3. instar evrede (72±4 saatlik larvalar) DAPA uygulaması belirlenen konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir. Uygulama esnasında 4.5 g *Drosophila* instant medium hazır besin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan DAPA kimyasalının 9 mL’si ile ıslatılarak maruziyet ortamı hazırlanmıştır. Davranış deneyleri uygulama esnasında 0.1, 1, 5, 10 mM DAPA konsantrasyonlarından üç tekrarlı ve negatif kontrol için dH₂O olmak üzere 13 farklı deney grubu hazırlanmıştır. DAPA’ya maruziyet öncesi 72±4 saatlik larvaların bulunduğu şişeler çok az musluk suyu ile çalkalanarak ince gözenekli bir süzgeç yardımıyla her düzenek için 50 larva seçilip hazırlanan deney gruplarına dağıtılmıştır.

3.3.1 Davranış Deneylerinde Uygulanacak Dozların Hazırlanması

Davranış deneylerinde uygulanacak konsantrasyonlar DAPA’nın molekül ağırlığından yola çıkılarak çözelti hazırlama yöntemiyle belirlenmiştir. 20 mg DAPA 18.6 mL dH₂O ile çözdürülerek 10 mM’lık stok çözelti elde edilmiş ve dilüsyon yöntemiyle diğer 5, 1, 0.1 mM’lık uygulama konsantrasyonları hazırlanmıştır.

3.3.2 Larval Ağırlık ve Larval Hareket Ölçümü Uygulama Aşamaları

Larval ağırlık ölçümü aşamasında Linford vd. (2013), larval hareket ölçümünde Dhar vd. (2020) uygulama esasları dikkate alınmış ve uygulama esnasında Kurşun vd. (2021) çalışma esaslarından da yararlanılmıştır. Kimyasal uygulaması yapılmadan önce seçilip tartılan 50’şer larva 24 saatlik DAPA maruziyeti sonrası ince gözenekli süzgeç yardımıyla seçilip hassas terazide tekrar tartılmıştır.

Larval hareket ölçümü için petriler %2’lik agar ile kaplanarak kullanılmıştır. Her konsantrasyon için 10 larva seçilmiş ve her larva petri ortasına yerleştirilerek milimetrik

kâğıt ile 1 dakika boyunca kat ettiği uzunluk ölçülmüştür.

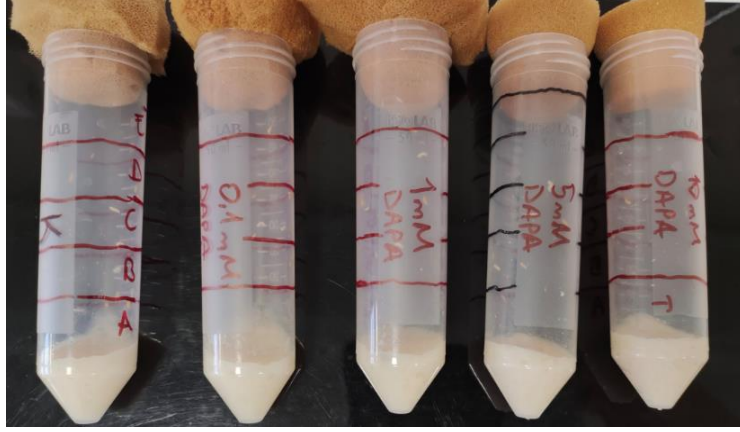
3.3.3 Pupa Oluşturma Başarısının Ölçümü

Pupa oluşturma başarısı ölçümü Liu vd. (2020) çalışma esasları dikkate alınarak yapılmıştır. Ölçüm gerçekleştirilirken, belirtilen şekilde seçilen 50'şer larva kimyasalların bulunduğu düzeneklere bırakılmıştır. Düzeneklerdeki derişimlere kronik olarak maruz bırakılan *Drosophila* larvalarının pupa evresine geçtiğinden emin olunup pupalar sayılarak not edilmiştir. Düzeneklere bırakılan 50'şer larvanın kaçının pupa oluşturduğu tespit edilip pupadan çıkan bireyler sayılmıştır ve pupadan çıkış yüzdesi $(\text{ergin sayısı}/50) \times \%100$ formülü ile hesaplanarak DAPA'nın pupa oluşturma başarısına etkisi ölçülmüştür. Formülde yer alan 50 sayısı kimyasala maruz bırakılan larva sayısını ifade etmektedir.

3.3.4 Pupa Pozisyon Ölçümü ve Negatif Jeotaksis Deneyi

Pupa pozisyon ölçümü ve negatif jeotaksis deneyleri için ortak falkonlar kullanılmıştır. Pupa pozisyon ölçümü uygulamalarında Fauzi vd. (2020), negatif jeotaksis deneylerinde ise Manjila vd. (2018)'nin esaslarından yararlanılmıştır.

Uygulama için kullanılan falkonlar besin yüzeyinden (BY) itibaren aşağıdan yukarıya sırasıyla A, B, C, D ve E olmak üzere, toplamda eşit aralıklarda 5 farklı bölgeye ayrılmış (Resim 3.1) ve bu bölgeler aracılığıyla, düzeneklere bırakılan 50'şer larvanın DAPA maruziyeti sonrası oluşturduğu pupaların yüksekliği tespit edilmiştir. Kullanılan 50 ml'lik falkon tüpler her bölgenin eşit aralıklarla ayrılmasını kolaylaştırmıştır.



Resim 3.1 Pupa pozisyon ölçümünün gösterimi.

Negatif jeotaksis deneyinde, pupa pozisyon ölçümü yapılan bireylerin ergin hale gelinceye kadar DAPA'ya maruziyeti devam etmiştir ve gelişimlerini tamamlamayı başarabilen bireyler kullanılmıştır. Ergin sinekler düzeneklerden uzaklaştırılarak 10 cm uzunluğundaki 50 mL'lik boş falkon tüplere alınmıştır. Falkonlara 30'ar ergin birey aktarım yöntemiyle aktarılmıştır ve üzerlerine başka boş falkon tüpler kapatılarak tüm sineklerin tüp tabanına inmesi ve aynı noktadan başlaması sağlanarak 10 saniye süre içerisinde 10 cm yüksekliği aşabilen sinekler not edilip deney tamamlanmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.2 Negatif jeotaksis deneyinde 10 cm yüksekliği aşabilen bireylerin gösterimi.

3.3.5 Ergin Birey Oluşturma Başarısı ve Ergin Birey Ağırlık Ölçümü

Çalışmanın bu aşamasında Liu vd. (2020) uygulama esaslarından yararlanılmıştır ve her iki ölçüm için ortak tüpler kullanılmıştır. 72 ± 4 saatlik 50 larva seçilerek deney düzeneklerine bırakılmış, oluşan pupalar sayılıp kaydedilmiş ve gelişimlerini tamamlayana kadar DAPA maruziyeti devam etmiştir. Ergin birey oluşumu tamamlandıktan sonra eterle bayıltılıp dişi ve erkek bireyler sayılarak not edilmiştir. 50 adet larvadan oluşan pupa sayısı ve bu pupalardan çıkabilen ergin birey sayısı ile yüzde hesabı yapılarak ergin birey oluşturma başarısı ölçülmüştür.

Ergin birey ağırlık ölçümü eterle bayıltılan bireylerden 10 dişi ve 10 erkek birey seçilerek hassas terazide tartılması şeklinde gerçekleştirilmiş ve deneyler üç tekrarlı yapılmıştır.

3.4 Comet Testinin Uygulanması

Comet test yöntemi bilgisayar yazılımında görsel skorlama aracılığıyla hasar görmüş hücrelerin otomatik ölçümüne dayanmaktadır. Hasarı en az olan hücreye 0, hasarı en çok bulunan hücreye 4 puan verilerek görsel skorlama gerçekleştirilir. Kısaca hücre hasarı değerlendirilirken 0 ile 4 arasında skorlama yapılır (Collins vd. 1995). Otomatik ölçümler için geliştirilmiş farklı ölçüm yazılım programları tercih edilebilmektedir. Yazılımlar hasar gören hücreyle ilgili 30'dan fazla parametrenin hızlı bir şekilde ölçülebilmesini sağlamaktadır (Kumaravel vd. 2009). Comet yöntemiyle elde edilen verilerin değerlendirilmesinde kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu sıklıkla tercih edilen ölçüm parametreleridir (Moller vd. 2020). Comet prosedürü uygulanarak meydana gelen hücre çekirdeğinin Comet programlarında baş ve kuyruk bölgeleri tanımlanarak kuyruk uzunluğu piksel boyutunda ölçülür ve mikrona dönüştürülür. Baş ve kuyruk bölgelerinin ışık yoğunluğu verileri farklı Comet parametrelerinin değerlendirilmesinde de kullanılabilir (Kumaravel vd. 2009). Kuyruk momenti parametresi, kuyruk uzunluğu ve kuyrukta yer alan toplam DNA fraksiyonunun bir ürünü şeklinde tanımlanabilir. Kuyruk momenti değerinin hesaplanması, kuyruktaki DNA yüzdesinin ve kuyruk uzunluğunun çarpımı yoluyla Comet yazılımları sayesinde otomatik olarak gerçekleştirilmektedir (Mozaffarieh vd. 2008, Moller vd. 2014).

Çalışma kapsamında Comet testi ile *D. melanogaster* hemositlerinde DAPA'nın genotoksik etkisi araştırılmıştır. Uygulamada *Drosophila*'nın *flr*³ ve *mwh* mutant soylarına kıyasla daha yüksek sitokrom P450 (CYP) düzeyine sahip ve DDT'ye (diklorodifeniltrikloroetan) dirençli DNA tamir mekanizmasına sahip yabanıl soy *Oregon R+* hattı bireylerinin (Özata 2006) çaprazlanmasıyla meydana gelen 3. instar evre (72±4 saatlik) larvalar 24 saat DAPA maruziyetine bırakılmış ve sonrasında 96±4 saatlik larvalar Irving vd. (2005) metoduna göre elde edilmiş, izole edilen larvalar, Singh vd. (1988) Comet testi prosedürüne göre larva hemositlerinde primer DNA hasar düzeyi belirlenmiştir.

3.4.1 Comet Testi Uygulama Basamakları

Comet testi için 4.5 g *Drosophila* instant medium hazır besin 0.1, 1, 5 ve 10 mM'lık derişimlere sahip DAPA'nın 9 mL'si ile ısıtılarak maruziyet ortamı hazırlanmış olup, 3 tekrarlı ve negatif kontrol için dH₂O olmak üzere 13 farklı deney grubu hazırlanmıştır. Comet çalışması esnasında uygulanacak DAPA konsantrasyonları davranış deneyleri doz hazırlama aşamasında olduğu gibi belirlenip hazırlanmıştır.

Testin uygulama basamakları aşağıda sırasıyla verilmiştir:

- *D. melanogaster* yabanıl soy *Oregon R+* hattından 8 saat yumurta toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplanan yumurtalar 72±4 saatlik yani 3. instar evreye ulaştığında larvaların bulunduğu şişeler çok az musluk suyu ile çalkalanmış ince gözenekli bir süzgeç yardımıyla her düzenek için 50 larva seçilip DAPA derişimleri ve dH₂O ile hazırlanan 13 deney grubuna aktarılmış ve 24 saat DAPA maruziyeti sağlanmıştır.
- Comet testinde kullanılacak çözeltiler bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde bir gün öncesinde hazırlanmıştır.
- 24 saatlik kimyasala maruz bırakma sonrası 96±4 saatlik olan *Drosophila Oregon R+* larvaların bulunduğu deney tüplerinin her birine ayrı ayrı musluk suyu eklenerek dikkatli bir şekilde çalkalanıp, ince bir süzgeç gerilen tepside seçilen larvalar dH₂O ile yıkanmıştır ve petri kaplara alınmıştır.

- Petri kabına alınan larvalar %5'lik sodyum hipoklorid çözeltisinde 1-2 dakika bekletilerek steril edilmiş kurutma kâğıdı ile kurutulup hemosit izolasyonu için hazır hale getirilmiştir.
- 1 adet çukur lama pipet yardımıyla 110 µl %0.7'lik feniltiyoüre damlatılarak solüsyon içerisinde *Drosophila* larvalarının kütikula tabakaları ince uçlu pensler yardımıyla ayrılarak hemolenf ve hemositleri izole edilmiştir. Hemositlerin bulunduğu solüsyon pipetle alınarak 1.5 mL'lik ependorflara bırakılmıştır.
- Her uygulama grubu için ayrı ayrı izole edilmiş hemositlerin bulunduğu ependorflar, 15 dakika önce hazırlanmış santrifüj cihazında +4°C'de 10 dakika 1300 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant pipet yardımıyla atılarak 10 kat seyreltilmiş 50 µl soğuk PBS solüsyonu eklenip vortekslenmiştir.
- Süspanse edilen hemositlerden 80-100 µl pipetle alınıp üzerine 120 µl LMA eklenerek pipetaj yöntemiyle karıştırılmıştır. Bir gün önceden NMA ile kaplanan lamaların üzerine pipet yardımıyla jelle zarar vermemeye dikkat ederek lamın rodajına doğru soldan sağa tek çizgi şeklinde bırakılmıştır ve üzeri 24x60 mm'lik lamel 45 derece açı ile içerisinde hava kabarcığı olmayacak şekilde kapatılmıştır.
- Hazırlanan preparatlar donmamasına dikkat edilerek 5-10 dakika soğuk plaka üzerinde bekletilmiş ve lameller agaroz jelle zarar vermeden lama paralel bir şekilde ayrılmıştır.
- Lamalar 3. katman olarak tekrar 80 µl LMA ile kaplanmıştır ve üzeri 24x60 mm'lik lamelle 45 derece açı yaparak hava kabarcığı oluşturmada kapatılıp 10 dakika soğuk plaka üzerinde bekletilerek lameller jelle zarar vermeden ayrılmıştır ve elde edilen preparatlar kurutma kâğıdına dizilmiştir.
- İki agaroz jel katman arasına hedef hücrelerin tutunması sağlanarak hazırlanan preparatlar, ışık almayan şaleye yerleştirilmiş ve deneyin yapılacağı gün hazırlanan lizing solüsyonu şaleye yavaş yavaş eklenmiştir. Şalenin kapağı kapatılarak buzdolabında 1-1.5 saat bekletilmiştir. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra şaleden çıkarılan preparatlar dikkatli bir şekilde alınıp kurutma kâğıdına bırakılmıştır.
- Lizing solüsyonunda bir saat bekletme amacı, hücre membranlarının parçalanması ve çekirdek zarının erimesi sonucu hücresel içerik/DNA'nın iki agaroz jel arasında serbest kalmasını sağlamaktır. Hücresel içerik/DNA serbest kaldığı için ve DNA'nın

ışığa duyarlılığı nedeniyle ek zincir kırıkları oluşmaması amacıyla, liziz aşaması ve sonraki basamaklar karanlık/loş ortamda gerçekleştirilmiştir.

- Elektroforez cihazı ısınmaması için buz tankı üzerinde bekletilirken içerisine +4°C buzdolabında muhafaza edilen elektroforez tamponu eklenmiştir. Cihaz 25 volt 300 miliamper ayarında çalıştırılarak liziz işlemi sonrası kurutma kağıdında bekletilen preparatlar rodajlı kısımdan dikkatli bir şekilde tutulup elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 25 dakika buzdolabında beklemeye bırakılmıştır.
- 25 dakika sonra elektroforez tankının güç kaynağı kapatılıp preparatlar kurutma kağıdına bırakılmıştır.
- Preparatlar ışık almayan şale içerisine yerleştirilmiş ve üzerine pH=7.5, +4°C nötralizasyon çözeltisi eklenerek kapağı kapatılıp 5 dakika +4°C buzdolabında beklemeye bırakılmış ve bu işlem 2 kez daha tekrar edilmiştir. Şale buzdolabından çıkarılmış preparat sabitleyici aparat alınarak içerisindeki solüsyon dökülüp yerine +4°C dH₂O eklenmiş, şaleye tekrar yerleştirilerek buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda buzdolabından alınan preparatlar kurutma kağıdına dizilmiştir.
- Preparatlar, önceden hazır edilmiş EtBr çözeltisinden pipetle 750 µl bir ependorfa alınıp üzerine 500 µl dH₂O eklenerek pipetaj yapılmıştır. Ependorftan pipetle 60 µl alınarak preparatlara soldan sağa doğru temas etmeden ve hava kabarcığı oluşturmada tek çizgi halinde damlatılarak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Preparatın üzeri 24x60 mm lamelle 45 derece açıyla kapatılmıştır. EtBr ile boyanmış preparatlar buzdolabında bekletilmiştir. Buzdolabından 20 dakika sonra çıkarılan preparatlar oda sıcaklığında (25°C) 2-3 dakika bekletilip sayıma hazır edilmiştir. Boyama işleminden kısa bir süre sonra renk verme özelliği kaybedileceğinden preparatlar 4 saat içerisinde floresan mikroskop altında incelenmelidir (Martin vd. 1993, Fairbairn vd. 1995, Rojas vd. 1999).

3.5 Smart Testinin Uygulanması

Smart testi uygulanma aşamasında DAPA'nın genotoksitesinin araştırılması için 40'ar adet *D. melanogaster mwh/mwh* erkek bireyleri ve *flr³ /TM3, Bd^S* genetik yapılı virjin dişi bireyler çaprazlanarak 3. instar evrede (72±4 saatlik) transheterozigot larvalar elde edilip belirlenen konsantrasyonlarda DAPA uygulaması ile deney gerçekleştirilmiştir. 4.5

g *Drosophila* instant medium besine farklı derişimlerde hazırlanan DAPA kimyasalından 9 mL eklenip ısıtılarak maruziyet ortamı hazırlanmıştır. 3. instar evredeki *mwh/flr³* larvalar kimyasal ortamında beslenip ergin hale geçtikten sonra kanatlarındaki mutasyon belirlenmiştir.

Smart testi uygulamasında 0.225, 0.45 ve 0.9 mM’lık DAPA konsantrasyonlarından 3 tekrarlı ve negatif kontrol için dH₂O olmak üzere 10 farklı deney grubu hazırlanmıştır. Çalışmada Graf vd. (1996) uygulamaları dikkate alınıp uygulama aşamalarında Dayanıklı (2014)’nın açıklayıcı şema ve resimlerinden yararlanılmıştır.

3.5.1 Smart Testinde Uygulanacak Dozların Hazırlanması

Davranış deneylerinde elde edilen verilerden yararlanılarak DAPA’nın çalışma konsantrasyonları LD₅₀ (%50 letal doz) değeri 0.45 mM, ½ LD₅₀ değeri 0.225 mM ve 2x LD₅₀ değeri 0.9 mM olarak belirlendi. 10 mg DAPA 10.3 mL dH₂O ile çözdürülerek elde edilen 4.5 mM stok çözeltiden Smart testinde uygulanacak üç farklı konsantrasyon hazırlandı.

3.5.2 Smart Testi Uygulama Basamakları

Smart test yöntemi, uygulama zamanı ve süresi bakımından uygulama esnasında farklılıklar gösterebilmektedir (Graf vd. 1984, Guzman-Rincon vd. 2001). Graf (1995)’ın yapmış olduğu uygulamada *D. melanogaster*’in kanat hücrelerindeki mutant klon frekansları ve mutant klon indüksiyon süresinin yanısıra tekli klonların boyutu arasında bir korelasyon bulunduğu, genç larvalarda sadece az sayıda fakat çok büyük klonlar oluşturulurken, yaşlı larvalarda frekansların önemli ölçüde arttığı ancak boyutların daha küçük olduğu sonucuna varmıştır. Ulaştığı sonuçlardan yola çıkarak Smart testinde kimyasala maruziyet için larvaların optimal yaşının 72 saat olduğunu tespit etmiştir. Graf (1995)’ın elde ettiği sonuçlardan yola çıkılarak, Smart testinde DAPA maruziyeti 72 ± 4 saatlik larvalara uygulanmıştır.

Smart testi Graf vd. (1984) ile Marcos ve Carmona (2013)’nın çalışma esasları dikkate alınarak uygulanmıştır. Yöntemin uygulanmasında *flr³* ve *mwh* mutant *Drosophila*

soylarının bulunduğu ortamdan ergin sineklerin toplanıp 3. instar transheterezigot larvaları elde edilmesi sırasıyla aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- *D. melanogaster* mutant flare ergin bireyleri pupadan çıkışı takip edilerek 4 saat aralıklarla toplandı ve aktarım yöntemiyle boş şişelere alındı, eterli bir pamuk ile şişenin ağzı kısa süre kapatıldı ve ergin bireyler bayıltıldı (Resim 3.3). Pupadan çıkan erginlerin 4 saat aralıklarla toplanma nedeni virjin dişi flare bireyleri döllenmeden seçebilmektir. Dişi bireyler pupadan çıktıktan yaklaşık 5-6 saat sonra eşeyssel olgunluğa ulaşırken erkek bireyler pupadan çıktığında eşeyssel olgunluktadır.
- Bayıltılan bireyler boş petriye alınarak her uygulama düzeneği için 40'ar tane virjin dişi *flr³* bireyleri seçildi ve çaprazlama yapılacak kültür şişesine alındı.
- *D. melanogaster mwh* ergin bireyleri aralıklı sürelerle kültür şişesinden alınarak boş bir şişeye aktarılacak eterli bir pamuk ile şişenin ağzı kısa süre kapatıldı ve ergin bireyler bayıltıldı. 40'ar erkek *mwh* bireyi seçilerek (Resim 3.4) virjin dişi flare bireylerinin bulunduğu çaprazlama şişelerine bırakıldı (Resim 3.5).



Resim 3.3 *flr³* bireylerin eterle bayıltılmasının gösterimi.



Resim 3.4 *mwh* erkek birey seçiminin gösterimi.

- *mwh* erkek bireyler seçilirken üreme verimliliğini artırmak amacıyla ortalama 2-7 günlük ergin bireyler tercih edildi.



Resim 3.5 *mwh/flr³* çaprazlama şişelerinin gösterimi.

- Çaprazlama şişelerindeki 40'ar adet *flr³/TM3*, *Bd^S* dişi virgin ve *mwh/mwh* erkek ergin bireyler 48 saat boyunca döllenme ve embriyogenezin meydana gelmesi için kültür ortamında bekletildi ve 48 saat sonra taze besiyerine aktarıldı, 8 saat yumurta toplama işlemi gerçekleştirilerek (Resim 3.6) erginler ortamdan alındı. 72 ± 4 saat sonunda 3. instar evrenin başlangıcında transheterezigot larvalar elde edildi. 3. instar

evredeki larvaların kültür şişeleri musluk suyu ile yıkanarak ince gözenekli süzgeç gerilmiş bir tepside larvaların zarar görmemesine dikkat edilerek seçimi gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.6 Yumurta bırakan ergin bireylerin gösterimi.

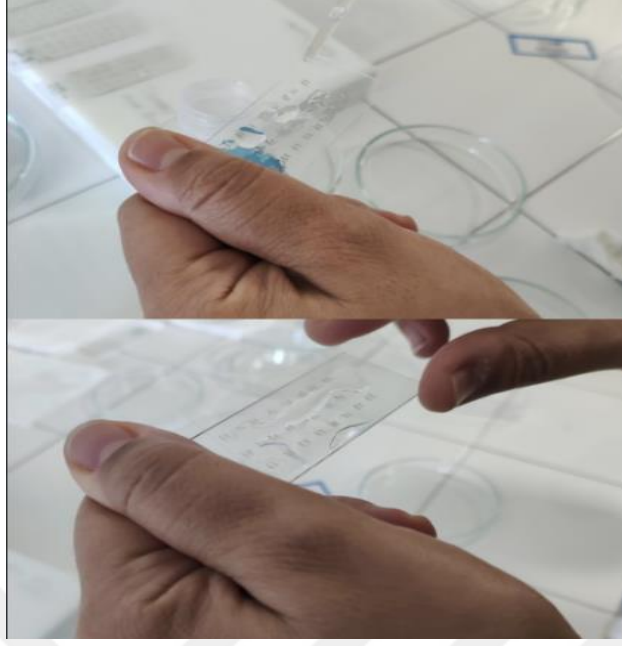
- DAPA uygulaması aşamasında her falkon tüpe 4.5 gr *Drosophila* Instant Medium eklenerek 0.225, 0.45 ve 0.9 mM'lik derişimlerinin her biri için 3'er falkon hazırlanmıştır. *Drosophila* Instant Medium DAPA'nın farklı konsantrasyonlarının 9 mL'si ile ıslatılmıştır. Negatif kontrol grubu için dH₂O kullanılmıştır.
- Belirtilen konsantrasyonlarda DAPA ile ıslatılan falkon tüplere seçilen transheterozigot larvalardan 2 mikrospatül aktarılmış ve ergin birey hale geçene kadar kültür odasında kimyasala maruz bırakılmışlardır (Resim 3.7).
- Ergin *D. melanogaster* bireyleri elde edildiğinde eter yardımıyla bayıltılarak toplanmış, %70'lik etil alkol bulunan tüplere aktarılıp kanat preparatlarının hazırlanmasına kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.
- +4°C de %70'lik etil alkolde bekletilen transheterozigot ergin bireylerden normal kanatlı olanlar seçilerek kuru ve temiz bir petriye alınmıştır.
- dH₂O ile alkolden arındırılan sinekler damlalıkla 1 damla faure solüsyonu eklenen çukur lama sivri uçlu pens yardımıyla alınıp lam, stereo binoküler mikroskop altına bırakılarak ergin bireyin kanatları pens ve bistüri yardımıyla kanat bütünlüğüne zarar

vermeden tek tek gövdeden ayrılmıştır. Kanatlardan biri zarar gördüğü takdirde diğer kanat da istatistiksel hesaba dahil edilmemiştir.



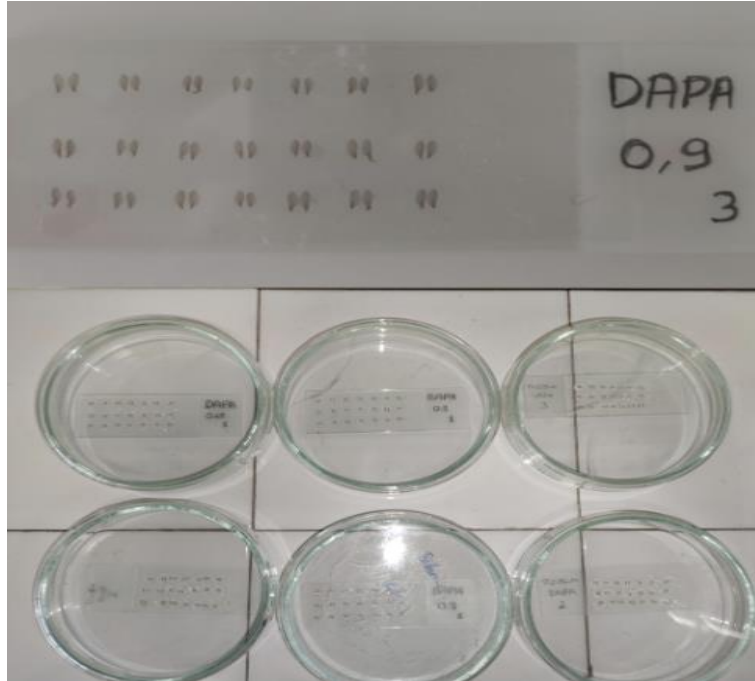
Resim 3.7 DAPA maruziyetine bırakılan transheterozigot larvalar.

- Çalışılan DAPA konsantrasyonu rodajlı lama kurşun kalem ile kodlanmıştır. Kanatlar gövdeden ayrılarak çiftler halinde yan yana düzgün bir şekilde, her lama 24 çift (toplam 48 kanat), 8 çift yatay ve 3 dikey sıra olacak şekilde dizilmiştir. Kanatların bulunduğu lamalar boş petrilere alınarak kapağı kapatılıp tozsuz bir ortamda 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra lama damlalık yardımıyla kanatlara temas etmeden tek çizgi halinde soldan sağa doğru hava kabarcığı oluşmayacak şekilde faure solüsyonu damlatılmıştır (Resim 3.8).



Resim 3.8 Faure solüsyonu damlatma ve lameli kapatma.

- 24x60 mm'lik lamel lamin üzerine 45 derecelik açı ile hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde kapatılmıştır. Elde edilen preparatların yanlarından kurutma kağıdı yardımıyla faure solüsyonunun fazlası alınmıştır. Hazırlanan preparatların üzerine ağırlık olarak petri kabı bırakılıp bu şekilde 2 gün bekletilmiştir (Resim 3.9).

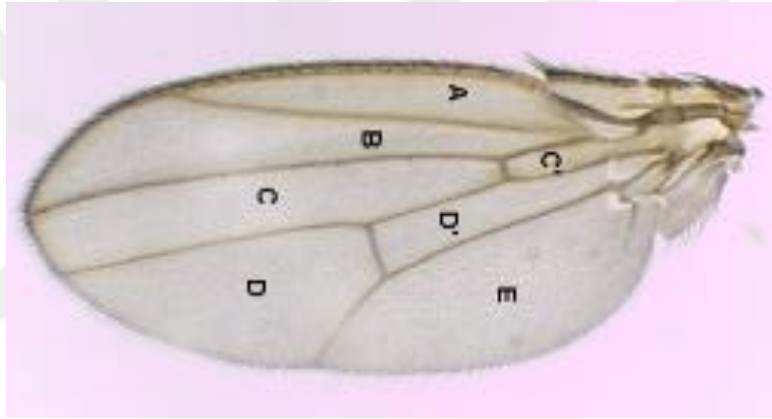


Resim 3.9 Hazırlanan kanat preparatları.

3.5.3 Kanat Preparatlarının Analizi

Kanat preparatlarındaki mutant klonların incelenmesi ışık mikroskobu ile 40X büyütmede yapılmıştır. İnceleme ve analizi kolaylaştırmak amacıyla kanatlar A, B, C, C', D, D', E olmak üzere 7 sektöre ayrılmıştır (Resim 3.10) ve bu sektörlerin her iki yüzü incelenerek klonlar kaydedilmiştir (Kaya vd. 2000).

Her sektördeki klon sayısı, sektörün adı yazılıp parantez içinde virgülden önce *mwh* klonları virgülden sonra *flr*³ klonları olacak şekilde belirtilmiştir. A (*mwh* klon sayısı, *flr*³ klon sayısı) gibi.



Resim 3.10 *Drosophila melanogaster* kanat sektörlerinin gösterimi.

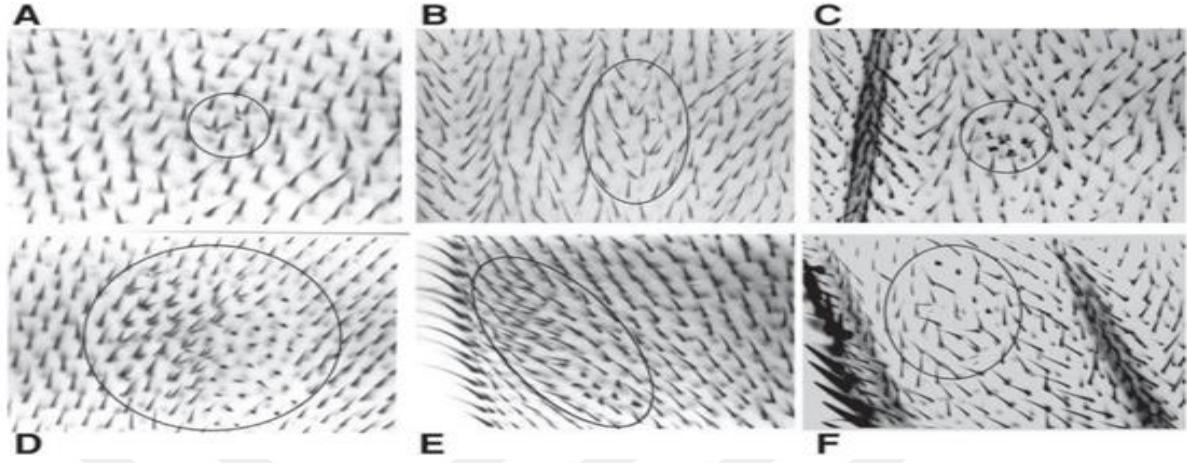
Mutant klonların analizi üç farklı katagoride yapılmaktadır (Şekil 3.1).

Büyük tek tip klon: Koyu renkli balon şeklinde ya da düzgün olmayan kalın kısalmış nokta görünümlü *flr*³ klonlarından 4 ve 4'ten fazla, *mwh* klonu 3 ve 3'ten fazla ise büyük tek tip klon olarak değerlendirilmektedir. Tek başına bulunan ve sayısı 4'ten az olan *flr*³ klonlarının varyasyon aracılığıyla oluşma olasılığı yüksektir ve klon değerlendirmesine dahil edilmemesi önerilmektedir (Szabad vd. 1983). 4'ten az sayıda bulunan *flr*³ klonları analiz esnasında sayılmamıştır.

Küçük tek tip klon: *mwh* hücrelerinde 1 ya da 2 adet klonun bir arada bulunması küçük tek tip klon olarak değerlendirilmektedir.

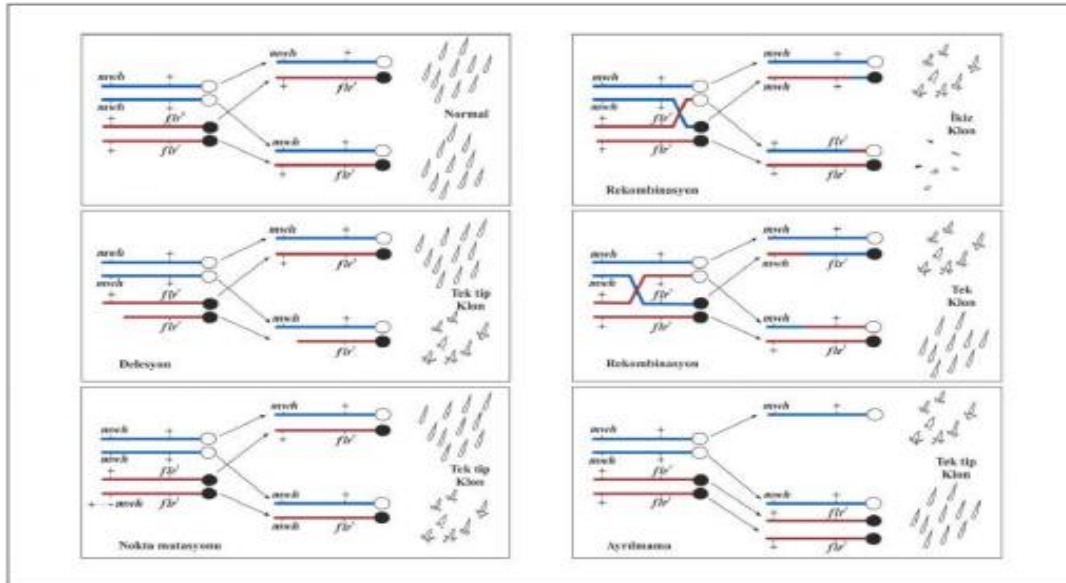
İkiz klon: *flr*³ ve *mwh* klonlarının yan yana bulunması durumunda ikiz klonlar

oluşmaktadır (Graf vd. 1984).



Şekil 3.1 *Drosophila melanogaster*'e ait klon türleri: (A) 2 *mwh* içeren küçük tek tip klon, (B) 5 *mwh* içeren büyük tek tip klon, (C) 6 *flr*³ içeren büyük tek tip klon, (D) 30 *flr*³ ve 30 *mwh* içeren ikiz klon, (E) 8 *flr*³ ve 14 *mwh* içeren ikiz klon, (F) 4 *flr*³ ve 4 *mwh* içeren ikiz klon (Henderson 2003).

Büyük tek tip, küçük tek tip ve ikiz klonların Smart testinde oluşum yolları Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Tek tip ve ikiz klonların oluşumunun gösterimi (Guzman-Rincon vd. 2001).

3.5.4 Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması

Herhangi bir kimyasalın genotoksisitesini Smart yöntemiyle belirlemek için gerçekleştirilen kronik uygulamalarda, her hücre ve hücre bölünmesinde ortalama indüksiyon frekansı aşağıda belirtilen denklem ile hesaplanmaktadır (Szabad vd. 1983).

$$f = \frac{n}{N \times C} \times 10^5$$

Formülde yalnızca *mwh* fenotipli klonlar dikkate alındığında; “f” *mwh* klonlarının indüksiyon ortalama frekansı, “n” gözlenen toplam *mwh* klon sayısını, “N” analiz edilen kanat sayısı ve “C” bir kanat üzerinde incelenebilecek hücre sayısını ifade etmektedir. Bir kanat üzerinde incelenebilecek hücre sayısı ortalama 24.400 olarak belirtilmiştir (Frei ve Würger 1996).

3.6 İstatistiksel Analiz

Larval hareket, larval ve ergin birey ağırlıklarına ait verilerin istatistiksel değerlendirmeleri SPSS 20 Paket Programında One-way ANOVA (Dunnet) testi ile yapılmıştır. Pupadan çıkış başarısı, pupa oluşturma ve negatif jeotaksis uygulamalarından elde edilen veriler SPSS 20 Programında One-way ANOVA (Kruskal-Wallis) testi ile belirlenmiştir. Pupa pozisyon durumu verileri ise SPSS 20 Paket Programı üzerinden ki kare testi ile değerlendirilmiştir. *D.melanogaster* yabanıl soy *Oregon R+* hattına DAPA uygulanarak gerçekleştirilen Comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi IBM SPSS 20 paket programında yer alan varyans analizi (ANOVA) kullanılarak Dunnet Çoklu Karşılaştırma Testi ($p \leq 0.05$) ile gerçekleştirilmiştir. Smart testi ile üç farklı DAPA konsantrasyonundan elde edilen veriler MICROSTA programı ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Davranış Toksisitesi

4.1.1 Larval Ağırlık Ölçümü

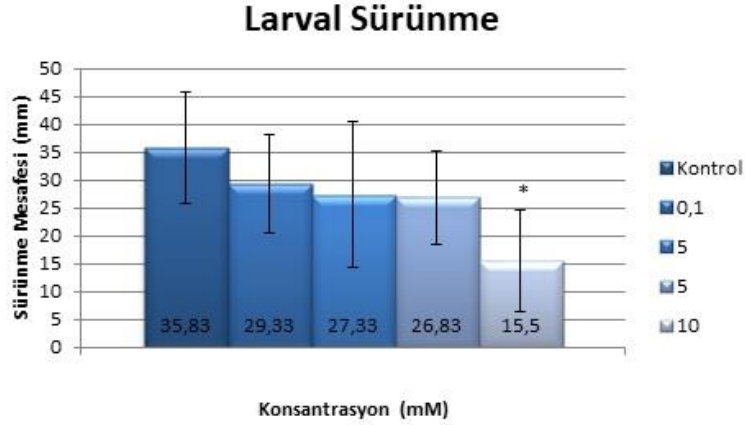
D. melanogaster larvalarının 24 saatlik DAPA maruziyeti sonucunda larval ağırlık kontrol grubuna kıyasla tüm uygulama gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak azalmış ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir. 1, 5 ve 10 mM’lık konsantrasyonlardaki azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. 0.1 mM’lık uygulamada ise larval ağırlık kontrol grubuna göre azalma göstermiş ancak bu azalma istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemiştir. En düşük larval ağırlık 10 mM’lık konsantrasyonda 44.975 ± 5.78 mg olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.1 DAPA konsantrasyonlarına göre larval ağırlık dağılımı.

4.1.2 Larval Sürünme

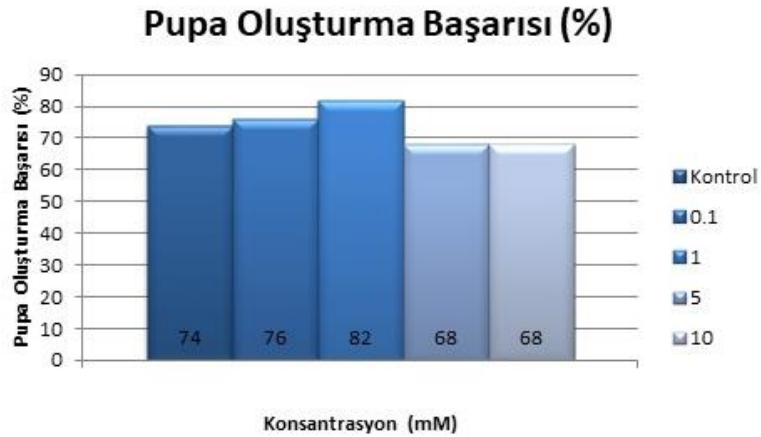
DAPA maruziyeti sonucunda larval hareket uygulama gruplarının tümünde larval sürünme hızı kontrol grubunun altında değerler göstermiştir ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Larval hareketteki bu azalmalardan sadece 10 mM’lık doz uygulamasında elde edilen 15.5 ± 9.22 mm’lik ölçüm istatistiksel olarak anlam ifade etmiştir. Her ne kadar istatistiksel olarak bir anlam ifade etmese de 1 ve 5 mM’lık uygulamalar birbirine yakın bir değer göstermiş ve kontrol grubundan daha az hareket tespit edilmiştir. 0.1 mM’lık uygulama grubu 29.33 ± 8.75 mm’lik hareketle kontrol grubuna en yakın değer olmuştur.



Şekil 4.2 DAPA konsantrasyonlarına göre larval sürünme.

4.1.3 Pupa Oluşturma Başarısı

Pupa oluşturma başarısının ölçülmesi sonucunda distile su uygulaması için kullanılan larvaların yüzde %74'nün pupa oluşturabildiği, fakat 5 ve 10 mM'lık DAPA uygulama gruplarında pupa oluşturma başarısının %68'lere gerilediği tespit edilmiştir (Şekil 4.3). 0.1 mM'lık uygulama grubunda pupa oluşturma başarısı kontrol grubuna kıyasla %2, 1 mM'lık uygulamada ise %8 oranında bir artış göstermiştir. Ancak pupa oluşturma başarısındaki oluşan bu artış ya da azalışların istatistiksel olarak bir anlam göstermediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.3 DAPA konsantrasyonlarına göre pupa oluşturma başarısı.

4.1.4 Ergin Birey Oluşturma Başarısı

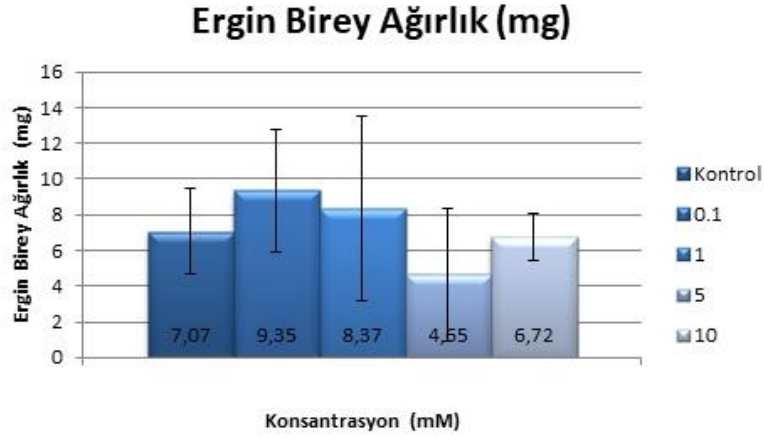
Ergin birey oluşturma başarısının ölçülmesi sonucunda distile su uygulaması için kullanılan larvaların yüzde %60'ının pupa oluşturabildiği, fakat 0.1 ve 1 mM'lık DAPA uygulama gruplarında ergin birey oluşturma başarısının %56 olduğu tespit edilmiştir. 5 ve 10 mM'lık uygulama gruplarında ergin birey oluşturma başarısı sırasıyla %36 ve %34 olup, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 DAPA konsantrasyonlarına göre ergin birey oluşturma başarısı.

4.1.5 Ergin Birey Ağırlık Ölçümü

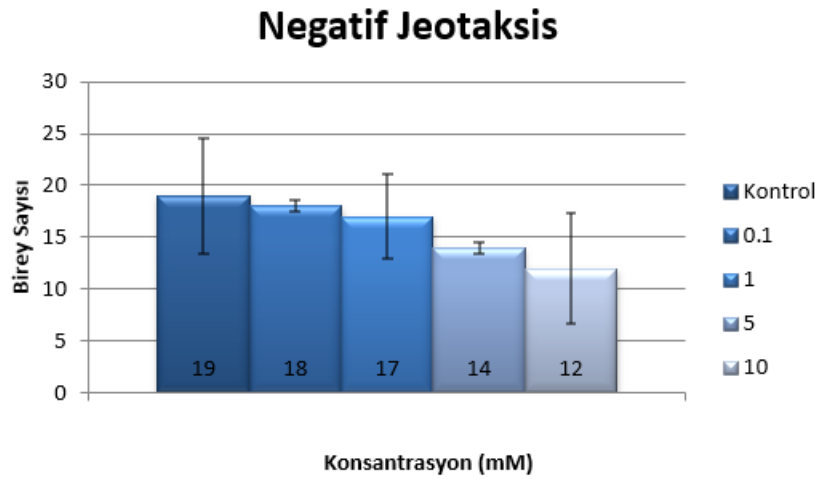
Ergin birey ağırlık ölçümü için gerçekleştirilen uygulamada her bir konsantrasyon grubu için 10 dişi ve 10 erkek olmak üzere toplam 20 birey tartılmış, 3 tekrar grubunun ortalaması alınarak veriler elde edilmiş ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında ergin bireylerin ağırlıklarında azalma ve artışlar meydana gelmiş, ancak bu değişimler istatistiksel açıdan bir önem göstermemiştir. 0.1 ve 1 mM'lık uygulamada elde edilen ortalama veriler kontrol grubundan daha yüksek olurken, 5 ve 10 mM'lık uygulamada ise ağırlık ortalamaları kontrol grubunun altında kalmıştır.



Şekil 4.5 DAPA konsantrasyonlarına göre ergin bireylerin ağırlık ilişkisi.

4.1.6 Negatif Jeotaksis Ölçümü

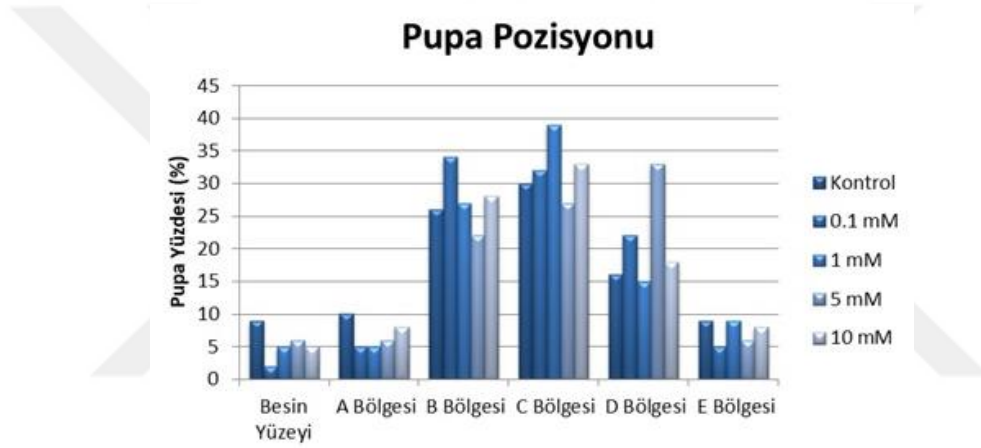
Negatif jeotaksis deneyi sonucunda 30 örnekten 10 sn'de 10 cm'lik mesafeyi aşan örneklerin sayısını gösteren veriler Şekil 4.6'da gösterilmiştir. DAPA'nın tüm konsantrasyonlarına maruz bırakılan larvaların erginlerinde kontrol grubuna kıyasla uçuş hareketleri bakımından bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiş ve 10 mM'luk uygulamada 12 ± 5.29 olarak elde edilen birey sayısındaki azalmanın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 DAPA konsantrasyonlarına göre negatif jeotaksis sonuçları.

4.1.7 Pupa Pozisyon Ölçümü

Pupa pozisyon ölçümü sonuçları Fauzi vd. (2020)'nin çalışmasında belirttiği kriterler dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Yapılan ki-kare analiz sonucuna göre konsantrasyonlar ile oluşan pupa yükseklikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Tüm uygulama gruplarında pupa pozisyonu B, C, D bölgesinde yoğunluk göstermiştir. Uygulama dozlarındaki farklılık pupa pozisyonu oluşumunda kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği için DAPA uygulamasının pupa pozisyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 DAPA konsantrasyonlarına göre pupa pozisyon yüzdeleri.

4.2 Comet Testi Sonuçları

72±4 saatlik *D. melanogaster*'in *Oregon R+* genetik soyundan larvaların, DAPA'nın farklı konsantrasyonlarını (0.1, 1, 5 ve 10 mM) içeren besiyerine 24 saat maruz bırakılması ile gelişen 96±4 saatlik larvaların hemositlerinin izole edilerek uygulanan kimyasalın genotoksik etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır, uygulama sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilip Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Dapagliflozin uygulamasında Comet testi ile DNA Hasarının tespiti.

Uygulama (mM)	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Kontrol	2.33 $\pm$ 0.58 ^a
Pozitif Kontrol	18.2 $\pm$ 3.40 ^d
0.1	2.67 $\pm$ 0.58 ^a
1	3.67 $\pm$ 1.15 ^{ab}
5	5.00 $\pm$ 0.01 ^b
10	10.0 $\pm$ 2.00 ^c

Sütunlardaki farklı harfler $p < 0.05$ düzeyinde önemli, Pozitif kontrol: etil metan sülfonat (EMS), Kontrol: distile su

DAPA'nın 1, 5, 10 mM'lık dozları kontrol grubu ile kıyaslandığında doza bağlı artış göstermiş ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak bu artışlar pozitif kontrol grubu olan EMS'den daha düşük bulunmuştur. En yüksek DNA hasarı 10 $\pm$ 2.00 değeri ile 10 mM'lık, en az DNA hasarı ise 2.67 $\pm$ 0.58 ile 0.1 mM'lık uygulamada belirlenmiştir.

4.3 Smart Testi Sonuçları

Smart testi ile genotoksik özellikleri değerlendirilen DAPA uygulamalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir. DAPA'nın genotoksik etkileri değerlendirilirken her bir konsantrasyon için normal kanatlı bireylerden kanat preparatları hazırlandı. Kontrol grubu olan distile su uygulamasında preparatı yapılan 40 kanatta 9 adet tek tip klon, 1 adet büyük tek tip klon olmak üzere toplam 10 adet klon belirlendi. Ayrıca toplam *mwh* klon sayısı ise 10 adet olarak bulundu. Bu uygulamada klon indüksiyon frekansı 0.27 olarak bulundu.

Çizelge 4.2 DAPA konsantrasyonlarının etkisinin Smart testi sonuçları.

Deney Grupları (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük Tek Tip Klonlar (1-2 cells; m =2)			Büyük Tek Tip Klonlar (>2 cells; m = 5)			İkiz Klonlar (m=5)			Toplam mwh Klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)		
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.
Distile su	40	9	(0.22)		1	(0.02)		0	(0.00)		10	(0.25)		11	(0.27)	
1 mM EMS (72h)	30	65	(2.16)	*	25	(0.83)	*	6	(0.20)	*	90	(3.00)	*	96	(3.20)	*
Dapagliflozin (mM)																
0.225	40	15	(0.37)		9	(0.22)		1	(0.02)		25	(0.62)		26	(0.65)	
0.45	40	22	(0.55)		8	(0.20)		0	(0.00)		30	(0.75)		30	(0.75)	
0.9	40	36	(0.90)	*	6	(0.15)	*	0	(0.00)		42	(1.05)	*	42	(1.05)	*

Fr: frekans; D: istatistiksel sonuçlar; EMS: etil metan sülfonat *: pozitif; m: çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

72 saatlik üçüncü evre trans-heterezigot larvaları DAPA'nın üç farklı konsantrasyonuna (0.225, 0.45, 0.9 mM) maruz bırakıldı. Tüm uygulama grupları arasında 0.9 mM'lık uygulamada küçük tek tip klon, büyük tek tip klon ve toplam mwh klonlarındaki frekans artışları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ayrıca toplam klon indüksiyon frekansında doz artışına bağlı olarak belirli oranda bir artış gözlenmiş olup, bu artışın 0.9 mM'lık uygulamada istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. 0.225 ve 0.45 mM'lık uygulama gruplarında ise küçük tek tip klon, büyük tek tip klon ve toplam mwh klonlarında da indüksiyon artışları söz konusu olmasına rağmen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

DAPA dünyada onaylanan ilk SGLT2 inhibitörü olup ilk kez Kasım 2012’de Amerika’da kullanılmaya başlanmıştır. FDA’nın Endokrinoloji ve Metabolik İlaç Danışma Komitesi tarafından meme ve mesane kanseri vakalarının yanısıra klinik araştırmalarda karaciğer hasarına neden olduğuna yönelik şüpheler nedeniyle piyasadan kaldırılmış, bu endişelerin açıklığa kavuşturulması ile 2 yıl sonra tip 2 diyabetes mellitus hastalarında glisemik kontrol için FDA tarafından yeniden piyasaya sunulmuştur (Bilgin 2019). Her ne kadar ilaç şu anda kullanımda olsa da farklı model organizmalar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ilacın güvenilirliği açısından oldukça önemlidir. Bu çalışma ile tip 2 diyabetes mellitus hastalığında yaygın kullanım alanı bulması nedeniyle ilacın farklı dozlarının *D. melanogaster* üzerindeki davranış toksisitesi ve DNA hasarının araştırılması amaçlanmıştır.

D. melanogaster’in proteinlerinin yarısının memeli proteinleri ile benzer dizilim göstermesi sebebiyle son yıllarda yapılan çalışmalar, çeşitli memeli hastalıklarında *D. melanogaster*’in model organizma olarak kullanılmasını desteklemektedir. Yapılan *Drosophila* genom dizi analizleri, insan hastalıklarında belirlenen genlerin %60’ından fazlasının *Drosophila* ortoloğu olduğunu göstermiştir. Böylelikle; insan hastalıklarında amplifikasyon, delesyon veya mutasyon sebebiyle değişime uğrayan yaklaşık 287 civarında gen *Drosophila* ortologudur (Potter vd. 2000).

Çeşitli kimyasalların, yeni sentezlenen ürünlerin, tedavi amaçlı kullanılan tıbbi ilaçların toksik etkilerinin değerlendirilmesinde farklı model organizmalar üzerinde çeşitli davranış test sistemleri kullanılmaktadır. Bu testlerden elde edilen veriler, özellikle temel araştırmalarda olmak üzere tüm alanlarda farklı maddelerin etkilerinin özgül, hassas ve güvenilir bir şekilde değerlendirilmesinde oldukça önemlidir. Aynı zamanda davranış değişiklikleri, toksisite değerlendirmelerinde kimyasal maruziyetinin başlıca ölçülebilir göstergelerinden biridir. Bu nedenle, pupa oluşumu ve pupa çıkış başarısı, pupa pozisyonu, larval ağırlık ve sürünme testleri gibi birçok farklı deney, *D. melanogaster*’de davranışsal toksisiteyi belirlemek için yaygın olarak uygulanmaktadır (Kurşun vd. 2021, Cigerci vd. 2023). Herhangi bir SGLT2 inhibitörü ile ilgili olarak *D. melanogaster* ile yapılmış davranış toksisitesi çalışması bulunmamaktadır. Bu bakımdan bu çalışma

DAPA ile ilgili davranış toksisitesi verilerin literatüre ilk kez kazandırılmasını sağlamıştır. Her ne kadar SGLT2 inhibitörleri ile ilgili *D. melanogaster*'de davranış toksisite çalışması mevcut değilse de Orhan (2013) yaptığı çalışmada bazı antidepressanların davranış toksisitesini çalışmış ve farklı parametreleri değerlendirmesiyle sonuç olarak, Sertralin, Fluoksetin ve Sitalopramın antidepressanlarının yabani tip *D. melanogaster Canton-S* soyunda, larval sürecin uzamasına neden olarak gelişim biyolojisi üzerine olumsuz etkileri olduğunu göstermiştir.

Son yıllardaki çalışmalar, sentetik gıda boyaları, gıda katkı maddeleri, kozmetik ürünler ve farmasötik bileşikler gibi birçok kimyasalın canlıların gelişimi ve aynı zamanda üreme sistemlerinde bozukluklar oluşturabileceğini ortaya koymuştur. Farmasötik bileşikler, özellikle ilaç ve etken maddeleri kapsar ve DAPA da tip 2 diyabetin tedavisinde yaygın olarak kullanılan farmasötik bir ajandır. Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre; *D. melanogaster* larvalarının 24 saatlik DAPA maruziyeti sonucunda larval ağırlık kontrol grubuna kıyasla tüm uygulama gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak azalmıştır. Bu durum DAPA maruziyetinin beslenme üzerinde olumsuz etki gösterdiğini ispatlamaktadır. Benzer şekilde tip 2 diyabetes mellitus hastalarında DAPA kullanımı sırasında kilo kaybının yaşandığı bilinmektedir.

Çoğu canlının, yaşamları boyunca kendi ağırlıklarını koruyarak, kas güçlerini bu duruma göre ayarlamak zorunda olduğu bilinmektedir (Knight 2017). Yapılan çalışmalar sıçanların kas yoğunluklarını değiştirebildikleri, bunu kas kasılmasını ve kuvvet çıkışını düzenleyen troponin kompleksinin bir bileşeni olan Troponin T'nin alternatif formlarını üreterek yaptıklarını göstermiştir. *D. melanogaster*'de de sıçanlara benzer şekilde Troponin T formlarının üretiminin arttığı ve bunun sonucunda da sineklerin bacak kaslarının daha güçlü hale geldiği saptanmıştır (Schilder ve Raynor 2017). Ergin birey ağırlık ölçümünde kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında ergin bireylerin ağırlıklarında azalma ve artışlar meydana gelmiş ancak bu değişimler istatistiksel açıdan bir önem göstermemiştir. DAPA maruziyetine bağlı olarak Troponin T üretim mekanizması üzerinde farklı etkileri olması sebebiyle ağırlıklarda bu azalma ve artışların gözlemlendiği düşünülmektedir.

Negatif jeotaksis deneyi sonucunda DAPA'nın tüm konsantrasyonlarına maruz bırakılan larvaların erginlerinde kontrol grubuna kıyasla uçuş hareketleri bakımından bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiş ve 10 mM'lık uygulamada azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. *D. melanogaster*'in hareket kabiliyetlerinin sınındığı negatif jeotaksis deneyi sonucunda kontrol grubuna göre uçuş hareketlerinde bir azalma meydana gelmesi kas güçlerinin de azaldığını göstermektedir ve bu durumun ağırlık azalması sebebiyle olduğunu düşündürmektedir. Fakat bu durumun daha iyi anlaşılabilmesi için moleküler düzeyde Troponin T formlarının transkripsiyonunun azalışının incelenmesi ve buna bağlı olarak kas gelişiminin aydınlatılması gerekmektedir.

Larval hareket ise uygulama gruplarının tümünde kontrol grubunun altında değerler göstermiştir. Larval hareketteki bu azalmalardan sadece 10 mM'lık doz uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Larva hareketleri nöronlardan oluşan bir ağ tarafından kontrol edilmektedir ve larvalar sürünürken kısa duraklamalarla peristaltik hareketler yapmaktadırlar. Bu mekanizma motor nöronlar, duyu geri bildirim ve sinir ağının merkezi örüntüsü tarafından kontrol edilmektedir. Dolayısıyla DAPA'nın 10 mM'lık doz uygulamasının bu sistem üzerinde olumsuz etki gösterdiği düşünülmektedir.

Pupa oluşturma başarısının ölçülmesi sonucunda distile su uygulaması için kullanılan larvaların yüzde %74'nün pupa oluşturabildiği fakat 5 ve 10 mM'lık DAPA uygulama gruplarında pupa oluşturma başarısının %68'lere gerilediği tespit edilmiştir.

Ergin birey oluşturma başarısının ölçülmesi sonucunda distile su uygulaması için kullanılan larvaların yüzde %60'nın pupa oluşturabildiği fakat 0.1 ve 1 mM'lık DAPA uygulama gruplarında ergin birey oluşturma başarısının %56 olduğu tespit edilmiştir. 5 ve 10 mM'lık uygulama gruplarında ergin birey oluşturma başarısı sırasıyla %36 ve %34 olup, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Pupanın yüksekliği yerçekimine bağlı oluşan tepkisel bir hareket olarak kabul edilmektedir. Ayrıca pupanın konumu, beslenme sonrası larval hareket aşamasında organizmanın sahip olduğu enerjiyi yansıtmaktadır, bu nedenle pupa konumu larvaların

ergin birey olmadan önce geçirdikleri dönemde enerji tüketimini olumsuz etkileyen farklı olguları inceleyen araştırmalar için temel davranış parametresi olarak kabul edilmektedir (Fauzi vd. 2020). Yaptığımız çalışmada pupa pozisyon ölçümünde DAPA uygulamasının pupa pozisyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiş olup, larvaların ergin birey olmadan önce geçirdikleri dönemde enerji tüketimi üzerinde olumsuz bir etki yaratmadığı söylenebilir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda *D. melanogaster*'in bazı beslenme davranışları, kas gelişimi ve sinirsel iletim gibi davranış parametreleri meyve sineklerinin moleküler bakımdan memeli sistemleri ile olan yüksek benzerlikleri sebebiyle oldukça önemlidir. Ancak DAPA'nın davranışsal bozuklukları etkileme potansiyelinin daha iyi anlaşılabilmesi için moleküler düzeyde de çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Comet testi tek hücre jel elektroforez yöntemi olarak bilinmekte olup, ökaryatik hücrelerde DNA hasarlarını tespit etmek için yaygın olarak kullanılan güvenilir, hızlı, kolay ve hassas bir yöntemdir. Bu testin temel prensibi kimyasal ve fiziksel ajanların neden olduğu sitotoksik ve genotoksik hasarın canlı hücrelerde meydana getirdiği etkiyi tespit etmektir (Dayanıklı 2014, Ciğerci vd. 2022). Comet testi tek hücre süspansiyonu olarak elde edilebilen her hücre tipinde düşük DNA hasarını tespit edebildiğinden hassas ve güvenilir olup farklı hücre tipleriyle çalışılabilmektedir. *D. melanogaster* hemositleri ve memelilerin kanındaki lenfositler aynı role sahip olup hemosit izolasyonu oldukça basittir ve hemositlerin toksik maddelere duyarlılığı oldukça yüksektir (Hersperger vd. 2023). Bu çalışmada Comet testi ile DAPA'nın 0.1, 1, 5, 10 mM'lık dozları çalışılmış ve genotoksik hasar doza bağlı artış göstermiştir. Ayrıca son üç uygulama dozundaki bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. DAPA etken maddesi ile ilgili olarak daha önce *D. melanogaster* hemositlerinde yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır, dolayısıyla elde edilen bu veriler literatüre ilk kez kazandırılmıştır. Bazı SGLT2 inhibitörleri üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar mevcut olup, bu çalışmalar genellikle diyabetik deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmiş ve diyabet hastalığının oluşturduğu DNA hasarının ilaç kullanımı ile azaltılmasına yönelik sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin Attia vd. (2024) diyabetik fare modelinde somatik hücrelerdeki

genetik ve epigenetik değişiklikleri araştırmış ve antidiyabetik ilaç DAPA'ya birden fazla maruz kalmanın bu değişiklikleri etkileyip etkilemediğini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda DAPA ile tedavi edilen diyabetik hayvanlarda, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanlara kıyasla DNA hasarının oluşumunda önemli bir azalma görölmüştür. Yine Alshamrani vd. (2023) SGLT2 inhibitörü olan Saksagliptin ve DAPA etkilerini bir erkek fare modelinde gonadlar üzerinde sperm Comet testi ile incelemişler ve çalışmanın sonucuna göre ilaç uygulanmayan diabetik farelerde DNA hasarında bir artış gözlenmiş olup iki farklı ilaç tedavisinde DAPA, sperm sayısı ve hareketliliğindeki azalmayı daha da kötüleştiren Saksagliptin'in aksine, DNA hasarını kontrol değerlerine yakın hale getirmiştir. Ayrıca Choi vd. (2023) glioblastoma LN229, U118MG ve LN18 hücre hatları üzerinde SGLT2 inhibitörlerinden olan Kanagliflozin, DAPA ve Empagliflozinin farklı dozlarını 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulamışlar ve DNA hasarını bazı belirteçler (fosfo-ATM ve gama-H2AX) ile değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda üç farklı etken madde ile SGLT2 inhibitörü, LN229, U118MG ve LN18 GBM hücre hatlarında hücre çoğalmasını azaltmış ve tek başına Kanagliflozin tedavisinin, glioblastoma hücrelerinde DNA hasarı sinyallemesini artırdığını tespit etmişlerdir. Göröldüğü gibi yapılan bu çalışmalarda değişik test sistemleriyle çeşitli SGLT2 inhibitörlerinin DNA hasarını indükleyip indüklemediği araştırılmış, elde edilen veriler DNA hasarını indüklemediği yönünde olmuştur. Bu alışma sonuçları ile kıyaslandığında yaptığımız çalışmada DAPA'nın, *D. melanogaster* hemositlerinde DNA hasarını indüklediğine yönelik bulgular elde edilmiştir. Bu farklılığın sebebinin diğer çalışmalarda daha çok tip 2 diyabetin indüklediği DNA hasarına odaklanılması ve SGLT2 inhibitörleri yoluyla tedavi edilen deney hayvan gruplarında hücresel oksidatif stresin azalmasına bağlı olarak DNA hasarının azaldığı ve bu nedenle kontrol grubuna yakın değerler elde edildiği için bu şekilde yorumlandığı yönünde olmuştur.

Tarımda kullanılan zirai ajanlar, tekstil, gıda ve mobilya sanayi gibi güncel uygulamalarda kullanılan farklı kimyasal maddeler, çevresel atıklar ve hastalık tedavisinde kullanılan tıbbi ilaçlar gibi çeşitli maddelerin genotoksisitelerini belirlemek için *D. melanogaster*'de Smart testi de kullanılmaktadır. *Drosophila* imajinal diskleri özelleşmiş epitel hücre keseleri olup biyolojik özellikleri bakımından birçok memeli hücresi ile benzerlik göstermekte ve bu diskler ergin bireylerde pek çok ana yapıyı

oluşturmaktadır. İmajinal diskler larval evrede tek hücreli yapısından çoğalarak spesifik morfolojiye sahip olgun diskleri meydana getirerek ergin bireylerde farklılaşırlar. Farklılaşan ve çoğalan bu özelleşmiş epitel hücreleri diploid yapıda olup memeli hücrelerindeki benzer şekilde G1, S, G2 ve M safhalarını içeren hücre döngüsüne sahiptirler ve bu benzerlik sadece genel organizasyon seviyesiyle sınırlı olmayıp moleküler seviyede de benzerlik göstermektedir. Hücre döngüsünde görev yapan siklin ve siklin bağımlı kinazlar *Drosophila* ve memeliler arasında yüksek oranda korunum göstermektedir (Potter vd. 2000). *D. melanogaster*'in imajinal disklerinden faydalanılarak yapılan bir test sistemi olan Smart, göz benek testi ve kanat benek testi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu testin esas nokta mutasyon, kromozomlarda ayrılmama, delesyon ve rekombinasyon gibi birçok genetik değişikliğin belirlenmesine dayanmaktadır (Graf 1995). Mitozla çoğalan imajinal disk hücreleri birinci larva evresinde yaklaşık 50-100 civarındayken, üçüncü larva evresinde 24.400'e ulaşmaktadır (Graf vd. 1992). Bu evrede uygulanan herhangi bir madde imajinal disk hücrelerinin genotipini etkileyerek bu etkisini ergin sineklerin kanatlarında ve gözlerinde fenotipik olarak yansıtmaktadır (Turna 2012).

Smart testi için bu çalışmada *D. melanogaster*'in 72 saatlik üçüncü evre transheterozigot larvaları DAPA'nın üç farklı konsantrasyonuna (0.225, 0.45, 0.9 mM) maruz bırakılmıştır. Tüm uygulama grupları arasında 0.9 mM'lık uygulamada küçük tek tip klon, büyük tek tip klon ve toplam *mwh* klonlarındaki frekans artışları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca toplam klon indüksiyon frekansı da doz artışına bağlı olarak belirli oranda bir artış göstermiş olup bu artışın da 0.9 mM'lık uygulamada istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. DAPA etken maddesi ve diğer SGLT2 inhibitörleri ile ilgili olarak daha önce *D. melanogaster* ile yapılmış herhangi bir Smart çalışması bulunmamaktadır, dolayısıyla bu çalışma ile elde edilen veriler literatüre ilk kez kazandırılmıştır. Ancak tip 2 diyabette kullanılan farklı ilaçlar ile ilgili mevcut bir çalışma bulunmakta olup Gürbüz vd. (2014) tip 2 diabetes mellitus'ta yaygın olarak kullanılan iki sülfonilüre glimepirid ve glipizid ile *D. melanogaster*'de Smart testi yapmışlar ve glimepirid ile glipizidin özellikle homolog somatik rekombinasyona bağlı genotoksisite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacıların yaptıkları çalışma ile bu tez çalışmasının 0.9 mM'lık DAPA uygulamasında benzer sonuç görülmüş olup literatürle uyumluluk

göstermiştir. Yine Oliveira vd. (2017) bir antidiyabetik ilaç olan Metformin'in genotoksik potansiyelini hem tek başına hem de Doksorubisin ile kombine ederek Smart testi ile değerlendirmişler ve Metformin'in tek başına mutasyon veya rekombinasyona neden olmadığını saptamışlardır. Ayrıca Köksal (2015) yaptığı çalışmada, Ketamin ve Rokuronyum bromür isimli iki anestezi ilacı ile Smart testi yapmış ve elde edilen verilerde, Ketamin'in 250 µg/mL ve üzerindeki dozlarda genellikle mitotik rekombinasyon kaynaklı genotoksisiteye neden olduğunu, ancak Rokuronyum bromür'ün standart çaprazlamada herhangi bir mutajenik ve/veya rekombinojenik etki göstermediğini tespit etmiştir. Yine Çadircı vd. (2019) DAPA'nın primer insan tam kan hücre kültürlerinde *in vitro* sitotoksisite, genotoksisite potansiyeli ve antioksidan/oksidan aktivitesini değerlendirmiş ve çalışma sonucunda DAPA'nın insan kan hücre kültürlerinde sitotoksik ve genotoksik potansiyele sahip olmadığını ve antioksidan aktivitenin artmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma sonuçları tez çalışmamızın ilk iki dozu (0.225, 045 mM) ile uyumlu bulunmuş ancak 0.9 mM'lık doz açısından farklılık göstermiştir.

Günümüzde hastalık tedavisi için kullanılan tıbbi ilaçların toksik, mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin belirlenmesi hayati önem taşımakta ve son yıllarda halen güncel çalışma konuları arasında yer almaktadır. Bu maddelerin metabolize edilmesiyle meydana gelen farklı metabolitlerinin de potansiyel genotoksik etkiye sahip olabileceği göz ardı edilmemelidir. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde bu maddeler üzerinde yapılan genotoksik çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmüş ve bu nedenle bu tez çalışmasında Smart yöntemini kullanarak üzerinde çok az çalışma olan DAPA'nın genotoksisitesi belirlenmeye çalışılmıştır.

Sonuç olarak yapılan bu tez çalışmasıyla DAPA'nın potansiyel genotoksik etkilerinin araştırılması için Comet, Smart ve *D. melanogaster* ile davranış toksisitesi deneyleri yapılmış ve her bir test sisteminde farklı dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olan değişimler elde edilmiştir. Bazı dozlarda ise değişimler olsa bile istatistiksel olarak herhangi bir anlam ifade etmediği tespit edilmiştir. Yaygın kullanım alanına sahip olan DAPA'nın daha önceki yıllarda güvenilirlik açısından piyasadan bir kez kaldırılmış ve sonrasında piyasaya tekrar sürülmüş olması, bu farmasötik ajanın farklı etkilerinin

ortaya çıkarılması noktasında değişik test sistemleri ile değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda meydana gelen bu değişikliklerin tam mekanizmasının aydınlatılabilmesi için moleküler teknikler ile desteklenmesi gerekli olup DAPA ile ilişkili bu test sistemleri ile elde edilen verilerin literatüre ilk kez kazandırılmış olması bu çalışmanın önemini artırıp, temel bir çalışma niteliği taşımaktadır.



6. KAYNAKLAR

- Akahane K, Inoue T, Yokoyama A, Yaguchi A, Ojima K, Kiguchi S, vd., 2015, Efficacy of Mitiglinide Combined with Dapagliflozin in Streptozotocinnicotinamide-induced Type 2 Diabetic Rats and in Zucker Fatty rats, *Drug research*, 65(08), 416-421.
- Alaraby M, Hernandez A, Annangi B, Demir E, Bach J, Rubio L, vd., 2015, Antioxidant and Antigenotoxic Properties of CeO₂ NPs and Cerium Sulphate: Studies with *Drosophila melanogaster* as a Promising *in vivo* Model, *Nanotoxicology*, 9: 749-759.
- Alaraby M, Annangi B, Marcos R, Hernández A, 2016, *Drosophila melanogaster* as a Suitable *in vivo* Model to Determine Potential Side Effects of Nanomaterials: A review, *Journal Of Toxicology and Environmental Health, Part B, VoL.19, No.2*, 65-104.
- Aldaz S, Escudero L M, Freeman M, 2010, Live Imaging of *Drosophila* Imaginal Disc Development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32): 14217-14222.
- Ali Y O, Escala W, Ruan K, Zhai R G, 2011, Assaying Locomotor, Learning, and Memory Deficits in *Drosophila* Models of Neurodegeneration, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (49):e2504-e.
- Allocca M, Zola S, Bellosta P, 2018, The fruit fly, *Drosophila melanogaster*: the Making of a Model (Part I). In: Perveen FK, (eds). *Drosophila melanogaster*: Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics, Rijeka, Croatia: InTech;2018:113- 130.
- Alshamrani A A, Al-Hamamah M A, Albekairi N A, Attia M S M, Ahmad S F, Assiri M A, vd., 2023, Impacts of the DPP-4 Inhibitor Saxagliptin and SGLT-2 Inhibitor Dapagliflozin on the Gonads of Diabetic Mice, *Biomedicines*, 11, 2674.
- Amador R R, Longo J P, Lacava Z G, Dórea J G, Santos M F M A, 2012, Metformin (dimethylbiguanide) Induced DNA Damage in Mammalian Cells, *Genet Mol Biol*, 35(1):153–158.
- Astrand A, Wingren C, Benjamin A, Tregoning J S, Garnett J P, Groves H, vd., 2017,

- Dapagliflozin-Lowered Blood Glucose Reduces Respiratory Pseudomonas Aeruginosa Infection in Diabetic Mice, British Journal of Pharmacology, 174(9), 836- 847.
- Ashburner M, 1989, *Drosophila* a Laboratory Handbook, ISBN: 9780879693213, Cold Spring Harbor Press, New York, 689 p.
- Attia S M, Albekairi N A, Alshamrani A A, Ahmad S F, Almutairi F, Attia M S M, vd., 2024, Dapagliflozin Suppresses Diabetes-Induced Oxidative DNA Damage and Hypermethylation in Mouse Somatic Cells, Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 896, 503765.
- Bachli G, 2017, The Database on Taxonomy of Drosophilidae, TaxoDros, (taxodros.uzh.cs).
- Baenas N, Wagner A E, 2019, *Drosophila melanogaster* as an Alternative Model Organism in Nutrigenomics, Genes Nutr, 2019;14:1-11.
- Bahçeci Z, 2010, Genetik, Öğrenci Kitabevi Yayınları, 328 s, Kırşehir.
- Bağcı G, Bağcı H, Bozcuk A N, 1990, Minimum Sıcaklık Dalgalanmalarının Ömür Uzunluğuna Etkisi, Doğa-Turkish Journal of Biology, 15: 1-8.
- Bankoglu E E, Schuele C, Stopper H, 2021, Cell Survival After DNA Damage in the Comet assay, Archives of Toxicology, 95 (12): 3803–3813.
- Bedir A, Aliyazicioglu Y, Kahraman H, Yurdakul Z, Uysal M, Suvaci D E, Okuyucu A, vd., 2006, Genotoxicity in Rats Treated with the Antidiabetic Agent Rosiglitazone, Environ Mol Mutagen, 47(9):718–724.
- Bedir A, Aliyazicioglu Y, Bilgici B, Yurdakul Z, Uysal M, Suvaci D E, vd., 2008, Assessment of Genotoxicity in Rats Treated with the Antidiabetic Agent Pioglitazone, Environ Mol Mutagen, 49(3):185–191.
- Bernards A, Hariharan I K, 2001, Of flies and Men–Studying Human Disease in *Drosophila*, Current Opinion in Genetics Development, 11 (3): 274-278.
- Bersoff-Matcha S J, Chamberlain C, Cao C, Kortepeter C, Chong W H, 2019, Fournier Gangrene Associated With Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors: A Review of Spontaneous Postmarketing Cases, Ann Intern Med, 170(11): 764-769.

- Bilgin D, 2019, Obez Tip 2 Diyabetlilerde Tedaviye Dapagliflozin ve Dapagliflozin ile Birlikte Eksenatid Eklenmesinin Glisemik Kontrol ve Vücut Kitle İndeksi Üzerine Etkisinin Araştırılması, İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, 167 s, İstanbul.
- Billgera M, Kirkb J, Changc J, Bédardd A, Attallad B, Hailed S, vd., 2019, A Study in a Rat Initiation-Promotion Bladder Tumour Model Demonstrated no Promoter/Progressor Potential of Dapagliflozin Regulatory, Toxicology and Pharmacology, Volume 103, Pages 166-173.
- Bogdanffy M S, Stachlewitz R F, van Tongeren S, Knight B, Sharp D E, Ku W, vd., 2014, Nonclinical Safety of the Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Empagliflozin, Int J Toxicol, 33(6):436–449.
- Burnet B, Burnet L, Connolly K, Williamson N, 1988, A Genetic Analysis of Locomotor Activity in *Drosophila melanogaster*, Heredity, vol. 61, no. 1. pp. 111- 119.
- Caligari P, Mather K, 1975, Genotype-environment interaction III. Interactions in *Drosophila melanogaster*, Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences, vol. 191, no. 1104, pp. 387-411.
- Catterson J H, Knowles-Barley S, James K, Heck M M S, Harmar A J, Hartley P S, 2010, Dietary Modulation of *Drosophila* Sleep-Wake Behaviour, PLoS ONE, Volume 5, Issue 8, e12062.
- Chen T H, Lin C C, Meng P J, 2014. Zinc Oxide Nanoparticles Alter Hatching and Larval Activity in Zebrafish (*Danio rerio*), Journal of Hazardous Materials, 277, 134-140.
- Choi S, Tao M, R. Agnes R, Jeffrey J, Traugher Jr B J, Muzic R, 2023, Sodium-Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibition Induces DNA Damage and Radiosensitization in Glioblastoma Cell Lines, International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics ,2477 Volume 117, Issue 2, Supplement, E223.
- Chyb S, Gompel N, 2013, Atlas of *Drosophila* Morphology: Wild-type and Classical Mutants, ISBN: 978-0-12-384688-4, Academic Press, (e-book), 3-7.
- Ciğerci İ H, Taşcan T, Muddassir M A, 2022, Genotoxic assessment of Oxadiazon and Pendimethalin Herbicides on *Eisenia Hortensis* by Comet and Micronucleus Tests, Pakistan Journal of Agricultural Sciences, Vol 59, Issue 2, p207.

- Ciğerci İ H, Liman R, İstifli E S, Akyl D, Özkara A, Bonciu E, vd., 2023, Cyto-Genotoxic and Behavioral Effects of Flubendiamide in *Allium cepa* Root Cells, *Drosophila melanogaster* and Molecular Docking Studies, International Journal of Molecular Sciences, 24(2),1565.
- Clark A M, Rockstein M, 1964, Aging in Insects, The Physiology of Insecta, Vol 1.
- Collins A R, Ma A G, Duthie S J, 1995, The Kinetics of Repair of Oxidative DNA Damage (Strand Breaks and Oxidised Pyrimidines) in Human Cells, Mutat Res, 336(1): 69-77.
- Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, vd., 1997, Comet assay in Human Biomonitoring Studies: Reliability, Validation, and Applications, Environmental and Molecular Mutagenesis, Volume30, Issue2, Pages 139-146.
- Corvi R, Madia F, 2017, *In vitro* Genotoxicity Testing–Can the Performance be Enhanced?, Food and Chemical Toxicology, 106: 600–608.
- Çadırcı K, Tozlu Ö Ö, Türkez H, 2019, İnsan Kan Hücre Kültürü Üzerinde Dapagliflozin’in *in vitro* Sitotoksiste, Genotoksiste ve Oksidatif Hasar Potansiyeli, Turk J Biochem, 44(5): 692–698.
- Çetinkaya A Y, 2016, Bazı Gıda Katkı Maddelerinin *Drosophila melanogaster*’de Yaptığı Genotoksitenin SMART Testi ile Saptanması ve Bu DNA Hasarlarına Karşı Bazı Bitki Özütlerinin Etkileri, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 95 s, Edirne.
- Dayanıklı S, 2014, Gıda Katkı Maddesi Ferrolaktat (E585)’in *Drosophila melanogaster*’de Yaptığı Genotoksit Etkilerin SMART Testi VE COMET Assay Yöntemiyle Belirlenmesi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 123 s, Edirne.
- Desouza C V, Gupta N, Patel A, 2015, Cardiometabolic Effects of a New Class of Antidiabetic Agents, Clin Ther, 37(6): 1178-1194.
- Dhar G, Mukherjee S, Nayak N, Sahu S, Bag J, Rout R, vd., 2020, Fundamental Approaches to Screen Abnormalities in *Drosophila*, Springer Protocols, 223-251.

- Dimova D K, Dyson N J, 2005, The E2F Transcriptional Network: old Acquaintances with New Faces, *Oncogene* 24, 2810–2826.
- Duran C, Kutlu O, 2014, A New Alternative In The Treatment Of Type 2 Diabetes: Sodiumglucose Co-Transporter-2 Inhibitors, *Selcuk Medical Journal*, Vol. 30.
- Faillie J L, 2017, Pharmacological Aspects of the Safety of gliflozins, *Pharmacological Research*, Volume 118, Pages 71-81.
- Fairbairna D, Peggy L, Oliveb K, O'Neill L, 1995, The Comet Assay: A Comprehensive Review, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Volume 339, Issue 1, Pages 37-59.
- Fauzi A, Zubaidah S, Susanto H, 2020, The Study of Larva and Adult Behaviour of *Drosophila melanogaster*: Do Strains Affect Behavior? AIP Conference Proceedings, 2231, 040014.
- Ferrannini E, 2010, Sodium–Glucose Transporter-2 Inhibition as an Antidiabetic Therapy, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 25, Issue 7, Pages 2041–2043.
- Fioretto P, Del Prato S, Buse J B, Goldenberg R, Giorgino F, Reyner D, vd., 2018, Efficacy and Safety of Dapagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes and Moderate Renal Impairment (Chronic Kidney Disease Stage 3A): The DERIVE Study, *Diabetes Obes Metab*, 20(11): 2532-2540.
- Flagg R O, 1988, *Carolina Drosophila Manual*, Publisher, Carolina Biological Supply Company, 31 pages.
- Foley P A, Luckinbill L S, 2001, The Effects of Selection for Larval Behavior on Adult Life-History Features in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, 55 (12): 2493-2502.
- Fortini M, Bonini N M, 2000, Modeling Human Neurodegenerative Diseases in *Drosophila*: on a Wing and a Prayer, *Trends in Genetics*, 16 (4): 161-167.
- Frei H, Würzler F E, 1996, Induction of Somatic Mutation and Recombination by Four Inhibitors of Eukaryotic Topoisomerases Assayed in the Wing Spot Test of *Drosophila melanogaster*, *Mutagenesis*, 11: 315-325.

- Gajski G, Ravlic S, Godschalk R, Collins A, Dusinska M, Brunborg G, 2021, Application of the Comet assay for the Evaluation of DNA Damage in Mature Sperm. Mutation Research- Reviews in Mutation Research, 788: 108398.
- Garcia-Bellido A, Merriam J R, 1971, Parameters of the Wings Imaginal Discdevelopment of *Drosophila melanogaster*, Developmental Biology, 24: 61-87.
- Gerich J E, 2010, Role of the Kidney in Normal Glucose Homeostasis and in the Hyperglycemia of Diabetes Mellitus: Therapeutic Implications, Diabet Med, 27: 136- 142.
- Gilchrist G W, Huey R B, Partridge L, 1997, Thermal Sensitivity of *Drosophila melanogaster*: Evolutionary Responses of Adults and Eggs to Laboratory Natural Selection at Different Temperatures, Physiological Zoology, vol. 70, no. 4. pp. 403- 414.
- Gonzalez C, 2013, *Drosophila melanogaster*: a Model and Tool to Investigate Malignancy and Identify new therapeutics, Nature Rev,13:172-183.
- Graf U, Würgler F E, Katz A J, Frei H, Juon H, Hall C B, vd.,1984. Somatic Mutation Test in *Drosophila melanogaster*, Environmental and Molecular Mutagenesis, 6: 153-188.
- Graf U, Van S N, Würgler F E, 1992, *Drosophila* Genetics, A Pratical Course, Springer-Verlag Press, 0 387 57327 9, New York, pp. 236.
- Graf U, Singer D, 1992, Genotoxicity Testing of Promutagens in the Wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, Rev Int Contam Ambient, 8(1): 15-27.
- Graf U, Vanschaik N, 1992, Improved High Bioactivation Cross for the Wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, Mutation Research, 271(1): 59-67.
- Graf U, 1995, Analysis of the Relationship Between Age of Larvae at Mutagen Treatment and Frequency and Size of Spots for the Wing Somatic Mutation and Recombination test in *Drosophila melanogaster*, Experimentia, 51: 168-173.

- Graf U, Würgler F E, 1996, The Somatic White-Ivory Eye Spot Test Does Not Detect the Same Spectrum of Genotoxic Events as the Wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, Environ, Mol. Mutagen, 27: 219-226.
- Graf U, Abraham S K, Guzmán-Rincón J, Würgler F E, 1998, Antigenotoxicity Studies in *Drosophila melanogaster*, Mutation Research, 402: 203-209.
- Grandjean P, Landrigan P J, 2014, Neurobehavioural Effects of Developmental Toxicity, Lancet Neurol, c 13, sy 3, ss. 330-338.
- Guzman-Rincon J, Ramirez-Victoria P, Benitez L, 2001, Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila* Used for Biomonitoring of Environmental Pollutants, Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2: A Handbook, 56: 221-237
- Gürbüzel M, Çapoğlu I, Kızılet H, Halıcı Z, Özçiçek F, Demirtas L, 2014, Genotoxic Evaluation of Two Oral Antidiabetic Agents in the *Drosophila* Wing Spot Test, Toxicology Industrial Health, 30: 376-383.
- Halimi S, Verges B 2014, Adverse Effects and Safety of SGLT-2 Inhibitors, Diabetes Metab, 40(6 Suppl 1): S28-34.
- Hamouda N N, Sydorenko V, Qureshi M A, Alkaabi J M, Oz M, Howarth F C, 2015, Dapagliflozin Reduces the Amplitude of Shortening and Ca^{2+} Transient in Ventricular Myocytes from Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, Molecular and cellular biochemistry, 400(1-2), 57-68.
- Henderson D S, 2003, *Drosophila* Cytogenetics Protocols, Humana Totowa, 468, New Jersey.
- Henderson D S, 2004, *Drosophila* Cytogenetic Protocols, Humana Press, p 389, Totowa, New Jersey.
- Hersperger F, Kastl M, Paeschke K, Kierdorf K, 2023, Hemocyte Nuclei Isolation from Adult *Drosophila melanogaster* for snRNA-seq, In Tissue-Resident Macrophages: Methods and Protocols (pp. 71-79), New York, NY: Springer US.
- Horiya Y, Hayashi K, Hirata H, 1996, The Possibility of Developing a Tumor Promoter

Assay System Using *Drosophila*, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 359:3, 203-204.

Idris I, Donnelly R, 2009, Sodium-Glucose Co-transporter-2 Inhibitors: an Emerging Newclass of Oral Antidiabetic Drug, Diabetes Obes Metab, 11: 79-88.

Irving P, Ubeda J M, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, vd., 2005, New Insights Into *Drosophila* Larval Haemocyte Functions Through Genome-Wide Analysis, Cell Microbiol, 7: pp. 335-350.

İpek S, 2022, Komet Yöntemi ile 3T3 Hücre Hattında Pozitif Kontrollerin Karşılaştırılması ve Optimizasyonu, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 82 s, Ankara.

İşlek D, 2023, Çinko oksit Nanopartiküllerinin Yeşil Sentezi Karakterizasyonu Sitotoksitesitesi ve Antimikrobiyal Aktivitesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 81 s, Afyonkarahisar.

Jabbour S, Seufert J, Scheen A, Bailey C J, Karup C, Langkilde A M, 2018, Dapagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Pooled Analysis of Safety Data From Phase IIb/III Clinical Trials, Diabetes Obes Metab, 20(3): 620-628.

Jafari M, Khodayari B, Felgner J, Bussel I, Rose M R, Mueller L D, 2007, Pioglitazone: an Anti-diabetic Compound with Anti-aging Properties, Biogerontology, 8(6):639-51.

Janner D E, Gomes N S, Poetini M R, Poletto K H, Musachio E A S, Almeida F P, vd., 2021, Oxidative Stress and Decreased Dopamine Levels Induced by Imidacloprid Exposure Cause Behavioral Changes in a Neurodevelopmental Disorder Model in *Drosophila melanogaster*, Neurotoxicology, c. 85, ss. 79-89.

Jayarathne H S M, Debarba L K, Jaboro J J, Ginsburg B C, Miller R A, Sadagurski M, 2022, Neuroprotective Effects of Canagliflozin: Lessons from Aged Genetically Diverse UM-HET3 Mice, Aging Cell, 21(7):e13653.

Joannides C N, Mangiafico S P, Waters M F, Lamont, B J, Andrikopoulos S, 2017, Dapagliflozin Improves Insulin Resistance and Glucose Intolerance in a Novel Transgenic Rat Model of Chronic Glucose Overproduction and Glucose Toxicity, Diabetes Obesity and Metabolism, 19(8), 1135-1146.

- Jordan K W, Morgan T J, Mackay T F, 2006, Quantitative trait loci for locomotor behavior in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 174(1):271-84.
- Jordan K W, Carbone M A, Yamamoto A, Morgan T J, Mackay T F, 2007, Quantitative genomics of locomotor behavior in *Drosophila melanogaster*, *Genome biology*, 8(8):R172.
- Karaca B, 2020, Dapagliflozin'in Tekrarlanan Maruziyet Durumunda Reprodüktif ve Kardiyotoksik Etki Potansiyeli ve Mekanizmasının Aydınlatılması, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 106 s, İstanbul.
- Kaya B, 2000, Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* Hatlarında Mutajenik ve Rekombinojenik Etkilerinin Araştırılması, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 134 s, Antalya.
- Kaya B, Yanıkoğlu A, Creus A, Marcos R, 2000, Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test, *Mutation Research*, 465: 77-84.
- Kaygısız Ş, 2016, Farklı Boyutlardaki Fe₂O₃ Nanopartiküllerinin Genotoksik Potansiyellerinin *Drosophila melanogaster* Somatik Hücreleri ve Allium Test Yöntemi ile Araştırılması, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 72 s, Afyonkarahisar.
- Keller A, 2007, *Drosophila melanogaster*'s History as a Human Commensal, *Current Biology*, Volume 17, Issue 3, Pages R77-R81.
- Klaude M, Ericson S, Nygren J, Ahnstrom G, 1996, The Comet Assay Mechanisms and Technical Considerations, *Mutation Research*, 363: 89-96.
- Knight K, 2017, Fruit Flies Strengthen Leg Muscles When They Gain Weight, *Journal of Experimental Biology*, 220, 3399-3401.
- Köksal P M, 2015, *Drosophila* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) Yöntemiyle Bazı Anestezik Ajanların Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 66s, Erzincan.
- Kumar S, 2020, Study on History Fitness and Life Cycle of *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*), *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2 (1): 123-129

- Kumaravel T S, Vilhar B, Faux S P, Jha A N, 2009, Comet Assay Measurements: a Perspective, *Cell Biol Toxicol*, 25(1): 53-64.
- Kurşun A, Yalçın B, Güneş M, Tagorti G, Kaya B, 2021, MgO Nanopartiküllerinin *Drosophila melanogaster* Üzerindeki Davranışsal Toksisitesinin Değerlendirilmesi, *AKÜ FEMÜBİD* 21, 061002 (1283-1294).
- Kurşun A, 2022, *Drosophila melanogaster*'de Demir Bazlı Metalik-Manyetik Nanopartiküllerin Etkilerinin Araştırılması, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 63 s, Antalya.
- Lee Y J, Han H J, 2007, Regulatory Mechanisms of Na⁺/Glucose Cotransporters in Renal Proximal Tubule Cells, *Kidney International*, Volume 72, Supplement 106, Pages S27-S35
- Lewis E B, 1960, A New Standard Food Medium, *Drosophila* Information Service, 34: 118-119.
- Lin H W, Tseng C H, 2014, A Review on the Relationship between SGLT2 Inhibitors and Cancer, *Int J Endocrinol*, Article ID 719578.
- Lindsley D L, Zimm G G, 1992, The Genome of *Drosophila melanogaster*, Academic Press, 1160 pages, California.
- Linford N J, Bilgir C, Ro J Pletcher S D, 2013, Measurement of Lifespan in *Drosophila melanogaster*, *Journal of Visualized Experiments*, 71.
- Lints F A, Lints C V, 1971, Influence of Preimaginal Environment on Fecundity and Aging in *Drosophila melanogaster* Hybrids-II. Preimaginal Temperature, *Experimental Gerontology*, 6: 417-426.
- Liu X Y, Vinson D, Abt D, Hurt R H, Rand D M, 2009, Differential Toxicity of Carbon Nanomaterials in *Drosophila*: Larval Dietary Uptake Is Benign, but Adult Exposure Causes Locomotor Impairment and Mortality, *Environmental Science & Technology*, 43(16): 6357-6363.
- Liu Z, Xun H, 2013, Lipid Metabolism in *Drosophila*: Development and Disease, *Acta Biochim Biophys Sin*, 45(1): 44
- Liu Z, Shang J, Yan L, Wei T, Xiang L, Wang H L, vd., 2020, Oxidative Stress Caused

- by Lead (Pb) Induces Iron Deficiency in *Drosophila melanogaster*, *Chemosphere*, 243.
- Ljunggren O, Bolinder J, Johansson L, Wilding J, Langkilde A M, Sjostrom C D, vd., 2012, Dapagliflozin has no Effect on Markers of Bone Formation and Resorption or Bone Mineral Density in Patients with Inadequately Controlled Type 2 Diabetes Mellitus on Metformin, *Diabetes Obes Metab*, 14(11): 990-999.
- Lloyd T E, Taylor J P, 2010, Flightless Flies: *Drosophila* Models of Neuromuscular Disease, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1184 (1): 2-4.
- Macdonald F R, Peel J E, Jones H B, Mayers R M, Westgate L, Whaley J M, vd., 2010, The Novel Sodium Glucose Transporter 2 Inhibitor Dapagliflozin Sustains Pancreatic Function and Preserves Islet Morphology in Obese, Diabetic Rats, *Diabetes Obesity and Metabolism*, 12(11), 1004-1012.
- Mackay T F, 2001, The Genetic Architecture of Quantitative Traits, *Annual review of genetics*, vol. 35, no. 1. pp. 303-339.
- Mackay T F, Huang W, 2018, Charting the genotype–phenotype map: lessons from the *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, vol. 7, no. 1. p. e289.
- Malek H A, Hassanin A, Aziz H A, Dahtory F E, 2015, *In vitro* Assessment of the Mutagenic Effect of Metformin, *J Chem Pharm Res*, 7(6):879–886.
- Manjila S B, Hasan G, 2018, Flight and Climbing Assay for Assessing Motor Functions in *Drosophila*, *Bio-Protoc.*, c. 8, sy 5, s. e2742.
- Marcos R, Carmona E R, 2013, The Wing-Spot and the Comet Tests as Useful Assays Detecting Genotoxicity in *Drosophila*, *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols*, 1044: 417-427.
- Margaritis L H, Manta A K, Kokkaliaris K D, Schiza D, Alimisis K, Barkas G, vd., 2014, *Drosophila* Oogenesis as a Bio-Marker Responding to EMF Sources, *Electromagnetic Biology and Medicine*, 33 (3): 165-189.
- Markow T A, 2015, The Natural History of Model Organisms: The Secret Lives of *Drosophila* Flies, *Elife*, 4:1-9.

- Marsenic O, 2009, Glucose Control by the Kidney: an Emerging Target in Diabetes, American Journal of Kidney Diseases, 53(5), 875-883.
- Martin V J M, Green M H L, Schmezer P, Zobel B L P, de Meo M P, Collins A, 1993, The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 288, Issue 1, Pages 47-63.
- McCullough P A, Kluger A Y, Tecson K M, Barbin C M, Lee A Y, Lerma E V, vd., 2018, Inhibition of the Sodium-proton Antiporter (exchanger) is a Plausible Mechanism of Potential Benefit and Harm for Drugs Designed to Block Sodium Glucose co-transporter 2, Reviews in Cardiovascular Medicine, 19(2).
- McGurk L, Berson A, Bonini N M, 2015, *Drosophila* as *in vivo* Model for Human Neurodegenerative disease, Genetics.201:377- 402.
- Mcintyre G S, Gooding R H, 2000, Effects of Maternal Age on Larval Competitiveness in House Flies. Heredity, 85 (5): 480-489.
- Mohammed N N, Tadros M G, George M Y, 2024, Empagliflozin Repurposing in Parkinson's Disease; Modulation of Oxidative Stress, Neuroinflammation, AMPK/SIRT-1/PGC-1 α , and wnt/ β -Catenin Pathways, Inflammopharmacology, 32(1):777-794.
- Moller P, Danielsen P H, Karotki D G, Jantzen K, Roursgaard M, Klingberg H, vd., 2014, Oxidative Stress and Inflammation Generated DNA Damage by Exposure to Air Pollution Particles, Mutat Res., 762:133-66.
- Moller P, 2018, The Comet assay: Ready for 30 more Years, Mutagenesis, 33(1): 1– 7.
- Moller P, Azqueta A, Boutet-Robinet E, Koppen G, Bonassi S, Milic M, vd., 2020, Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): Recommendations for Describing Comet assay Procedures and Results, Nat Protoc, 15(12): 3817-3826.
- Moreno M A, Farr C L, Kaguni L S, Garesse R, 2007, *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Biology, Methods Mol Biol, volume 372:33-49.

- Mouchet F, Gauthier L, Mailhes C, Ferrier V, Devaux A, 2005, Comparative Study of the Comet assay and the Micronucleus Test in Amphibian Larvae (*Xenopus laevis*) Using Benzo(a)pyrene, Ethyl Methanesulfonate and Methyl methanesulfonate: Establishment of a Positive Control in the Amphibian Comet assay, *Environmental Toxicology*, 20(1): 74–84.
- Mozaffarieh M, Schoetzau A, Sauter M, Grieshaber M, Orgul S, Golubnitschaja O, vd., 2008, Comet assay Analysis of Single-stranded DNA Breaks in Circulating Leukocytes of Glaucoma Patients, *Mol Vis*, 14: 1584-1588.
- Neal B, Perkovic V, Mahaffey K W, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondur N, vd., 2017, Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes, *N Engl J Med*, 377: 644-657.
- Neville M, Goodwin S F, 2012, Genome-Wide Approaches to Understanding Behaviour in *Drosophila melanogaster*, *Briefings in Functional Genomics*, Volume 11, Issue 5, Pages 395–404.
- Oliveira V C, Constante S A R, Orsolin P C, Nepomuceno J C, Rezende A A A, Spanó M A, 2017, Modulatory effects of Metformin on Mutagenicity and Epithelial Tumor Incidence in Doxorubicin-Treated *Drosophila melanogaster*, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 106, Part A, Pages 283-291.
- Orhan A, 2013, *Drosophila melanogaster*'de Gelişim Biyolojisi Üzerine Bazı Antidepresanların Etkilerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 78 s, Ankara.
- Othman E M, Leyh A, Stopper H, 2013, Insulin Mediated DNA Damage in Mammalian Colon Cells and Human lymphocytes *in vitro*, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volumes 745–746, Pages 34-39.
- Özata L, 2006, Bazı Tekstil Boyalarının *Drosophila melanogaster* Üzerinde Toksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, İnönü Üniversitesi, Fen ilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 102 s, Malatya.
- Pandey U B, Nichols C D, 2011, Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery, *Pharmacological reviews*, 63 (2): 411-436.

- Park E, Kang M H, 2004, Smoking and High Plasma Triglyceride Levels as Risk Factors for Oxidative DNA Damage in the Korean Population, *Annals Of Nutri And Metabolism*, 48: 36-42.
- Pérez G L, Albarrán O G, Megía M C, 2010, Type 2 Sodium-Glucose Cotransporter (SGLT2) Inhibitors: From Familial Renal Glucosuria to the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus, Vol. 30, Issue, 6, *Nefrologia*, pages 599-714.
- Philbert M A, 2010, *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*, McQueen, C.A., Elsevier Science, 337-350.
- Potter C J, Turenchalk G S, Xu T, 2000, *Drosophila* in Cancer Research, *TIG*, 16(1): 33-39.
- Ptaszynska A, Cohen S M, Messing E M, Reilly T P, Johnsson E, Johnsson K ,2015, Assessing Bladder Cancer Risk in Type 2 Diabetes Clinical Trials: the Dapagliflozin Drug Development Program as a 'Case Study', *Diabetes Ther*, 6(3): 357-375.
- Qiu R, Balis D, Xie J, Davies M J, Desai M, Meininger G, 2017, Longer-Term Safety and Tolerability of Canagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes: a Pooled Analysis, *Curr Med Res Opin*, 33(3): 553-562.
- Raschi E, Parisotto M, Forcesi E, la Placa M, Marchesini G, de Ponti F, vd., 2017, Adverse Events with Sodium-Glucose co-transporter-2 Inhibitors: A global Analysis of International Spontaneous Reporting Systems, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 27(12): 1098-1107.
- Reilly T P, Graziano M J, Janovitz E B, Dorr T E, Fairchild C, Lee F, vd., 2014, Carcinogenicity Risk Assessment Supports the Chronic Safety of Dapagliflozin, an Inhibitor of Sodium–Glucose co-transporter 2, In the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus, *Diabetes Therapy*, 5(1), 73-96.
- Reiter L T, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E, 2001, A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*, *Genome Res*, 11: 1114-1125
- Rincon J G, Graf U, 1995, *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a Biomonitor, Plenum Press, New York, pp 169-179.

- Roberts D B, 2006, *Drosophila melanogaster*: The Model Organism, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121 (2): 93-103.
- Rojas E, Lopez M C, Valverde M, 1999, Single Cell Gel Electrophoresis Assay: Methodology And Applications, *Journal of Chromatography B*, 722: pp.225-254.
- Rosenstock J, Vico M, Wei L, Salsali A, List J F, 2012, Effects of Dapagliflozin, an SGLT2 Inhibitor, on HbA(1c), Body Weight, and Hypoglycemia Risk in Patient With Type 2 Diabetes Inadequately Controlled on Pioglitazone Monotherapy, *Diabetes Care*, 35:1473-8.
- Rothwell S W, Deal C C, Pinto J, Wright D G, 1993, Affinity Purification and Subcellular Localization of Lysosomes in Human Neutrophils, *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 53, Issue 4, Pages 372–380.
- Rubin G M, Lewis E B, 2000, A Brief History of *Drosophila*'s Contributions to Genome Research, *Science*, 287, 2216-2217.
- Rudrapatna V A, Ross L C, Tirtha K D, 2012, *Drosophila* Cancer Models, *Developmental Dynamics*, 241 (1): 107-118.
- Sanz F J, Solana-Manrique C, Lilao-Garzón J, Brito-Casillas Y, Muñoz-Descalzo S, Nuria Paricio, 2022, Exploring the link Between Parkinson's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus in *Drosophila*, *FASEB J*, 36(8):e22432.
- Sardas S, Izdes S, Ozcagli E, Kanbak O, Kadioğlu E, 2006. The Role of Antioxidant Supplementation in Occupational Exposure to Waste Anaesthetic Gases, *International Archives Of Occupational And Environmental Health*, Volume 80, pages154-159.
- Sarkar A, Mahendran T S, Meenakshisundaram A, Christopher R V, Dan P, Sundararajan V, vd., 2021, Role of Cerium Oxide Nanoparticles in Improving Oxidative Stress and Developmental Delays in *Drosophila melanogaster* as an *in-vivo* Model for Bisphenol a Toxicity, *Chemosphere*, c. 284, s. 131363.
- Schilder R J, Raynor M, 2017, Molecular Plasticity and Functional Enhancements of Leg Muscles in Response to Hypergravity in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*, *The Company of Biologists*, 220, 3508-3518.
- Sestini E A, Carlson J C, Allsopp R, 1991, The Effects of Ambient Temperature on Life

- Span, Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, and Phospholipase A2 Activity in *Drosophila melanogaster*, *Experimental Gerontology*, 26 (4): 385-395.
- Siddique H R, Chowdhuri D K, Saxena D K, Dhawan A, 2005, Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* Model for Genotoxicity Assessment Using Modified Alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, vol 20 (4): 285-290.
- Singh N P, Mc Coy M T, Tice R R, Schneider E L, 1988, A Simple Technique For quantitation of Low levels of DNA Damage in Individual Cells, *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.
- Smith G L, Bunker C B, Dinneen M D, 1998, Fournier's Gangrene, *Br J Urol*, 81(3): 347-355.
- Smith J D, Huang Z, Escobar P A, Foppiano P, Maw H, Loging W, vd., 2017, A Predominant Oxidative Renal Metabolite of Empagliflozin in Male Mice Is Cytotoxic in Mouse Renal Tubular Cells but not Genotoxic. *Int J Toxicol*, 36(6):440–448.
- Spradling A C, 1997, Fly pushing: The theory and Practice of *Drosophila* Genetics: by Ralph J. Greenspan Cold Spring Harbor Laboratory Press, 155 pages, ISBN 0 87969 492 0, ed: Elsevier Current Trends.
- Stephenson R, Metcalfe N H, 2013, *Drosophila melanogaster*: a Fly Through its History and Current Use, *The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 43(1), 70-75.
- St Johnston D, Volhard C N, 1992, The Origin of Pattern and Polarity in the *Drosophila* Embryo, *Cell*, 68,201-219.
- Stocker H, Gallant P, 2008, Getting Started: an Overview on Raising and Handling *Drosophila*, *Methods Mol Biol*, 420: 27-44.
- Szabad J, Soos I, Polgar G, Hejja G, 1983, Testing the Mutagenicity of Malondialdehyde and Formaldehyde by the *Drosophila* Mosaic and the Sex-Linked Recessive Lethal Tests, *Mutation Research*, 113:117-133.
- Taylor S I, Blau J E, Rother K I, 2015, Possible Adverse Effects of SGLT2 Inhibitors on Bone, *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(1): 8-10.
- Tokajuk A, Krzyżanowska-Grycel E, Tokajuk A, Grycel S, Sadowska A, Car H, 2015,

- Antidiabetic Drugs and Risk of Cancer, *Pharmacol Rep.*, 67(6):1240–1250.
- Triplitt C L, 2012, Understanding the Kidneys' Role in Blood Glucose Regulation, *Am J Manag Care*, 18: 11-16.
- Truong L, Saili K S, Miller J M, Hutchison J E, Tanguay R L, 2012, Persistent Adult Zebrafish Behavioral Deficits Results from Acute Embryonic Exposure to Gold Nanoparticles, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(2), 269-274.
- Turna F, 2012, Resveratrol'ün *Drosophila melanogaster*'de Antigenotoksik Etkilerinin Araştırılması, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, 63 s, Antalya.
- Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED) Obezite-Lipid metabolizması-Hipertansiyon Çalışma Grubu 5. Lipid Metabolizması ve Bozuklukları Eğitim Kursu, 2016, Başkent Üniversitesi Kışla Yerleşkesi Konferans Salonu Adana (Doctoral dissertation, Başkent Üniversitesi).
- Umbuzeiro G D A, Heringa M, Zeiger E, 2017, *In Vitro* Genotoxicity Testing: Significance and Use in Environmental Monitoring, In *Adv Biochem Eng Biotechnol* 157: 59–80.
- Vecchio G, 2015, A Fruit Fly in the Nanoworld: Once Again *Drosophila* Contributes to Environment and Human Health, *Nanotoxicology*, 9 (2): 135-137.
- White Jr J R, 2010, Apple Trees to Sodium Glucose Co-transporter Inhibitors: a Review of SGLT2 Inhibition, *Clinical Diabetes*, 28(1), 5-10.
- Wright E M, 2001, Renal Na⁺-Glucose Cotransporters, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 280(1), F10-F18.
- Wright E M, Turk E, 2004, The Sodium/Glucose Cotransport Family SLC5, The ABC of Solute Carriers, Volume 447, pages 510–518.
- Wright E M, Hirayama B A, Loo D F, 2007, Active Sugar Transport in Health and Disease, Department of Physiology, The David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles CA 90095-1751.
- Yamaguchi M, Yoshida H, 2018, *Drosophila* as a Model Organism, *Drosophila Models*

for Human Diseases, 1076: 1-10.

- Yeşilada E, 2001, Genotoxicity Testing of Some Metals in the *Drosophila* Wing Somatic Mutation and Recombination Test, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 66, 464-469.
- Yurtsever S, Olgun G, 2003, Genetik Laboratuvar Klavuzu, No:56, Trakya Üniv. Rektörlüğü Yayınları, 66 s, Edirne.
- Zambrowicz B, Freiman J, Brown P M, Frazier K S, Turnage A, Bronner J, vd., 2012, LX4211, a Dual SGLT1/SGLT2 Inhibitor, Improved Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes in a Randomized, Placebo Controlled Trial, Clin Pharmacol Ther, 92(2):158- 69.
- Zhang J, Schulze K L, Hiesinger P R, Suyama K, Wang S, Fish M, vd., 2007, Thirty-One Flavors of *Drosophila* Rab Proteins, Genetics 176, 1307–1322.
- Zimmering S, Cruces M P, Pimentel E, Arceo C, Carroasco G, Olvera O, 1997, On the Recovery of Single Spots with the *flr* Phenotype in the Wing Spot Test in *Drosophila*, Mutation Research, 379: 77-82.
- Zinman B, Wanner C, Lachin J M Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, vd., 2015, Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes and Mortality in Type 2 Diabetes, N Engl J Med., 373: 2117–2128

İnternet Kaynakları

1-<https://www.astrazeneca.com.tr/content/dam/az-tr/medicine/PDF/Forziga-10-mg-KT.pdf>, 13.10.2023

2-[https://www.astrazeneca.com.tr/content/dam/az-tr/medicine/PDF/Forziga%205-mg-KT_02102020%20\(1\).pdf](https://www.astrazeneca.com.tr/content/dam/az-tr/medicine/PDF/Forziga%205-mg-KT_02102020%20(1).pdf), 8.12.2023

3-<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-revises-labels-sgl2-inhibitors-diabetes-include-warnings-about-too-much-acid-blood-and-serious#:~:text=FDA%20has%20added%20warnings%20about,and%20serious%20urinary%20tract%20infections>, 21.10.2023

4- <https://www.medscape.com/viewarticle/882425?form=fpf>, 25.10.2023.

5-<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-warns-about-rare-occurrences-serious-infection-genital-area-sgl2-inhibitors-diabetes>, 21.10.2023

6- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dapagliflozin>, 11.01.2024

7-

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUK EwiWj_bZpqzrAhVukIsKHcXYAngQFjABegQIARAB&url=https%3A%2F%2Fwww.ema.europa.eu%2Fdocuments%2Fassessment-report%2Finvokana-eparpublic-assessmentreport_en.pdf&usg=AOvVaw1VbOa--peFCGjDAZ8xdrcQ, 16.01.2024