KSÜ Tarım ve Doğa Derg 28 (5), 1214-1228, 2025
KSU J. Agric Nat 28 (5), 1214-1228, 2025
DOI:10.18016/ksutarimdoga.vi. 1666340

Yaşam Süresi ve Üreme Arasındaki Dengede Fitokimyasal Modülasyon: *Cistus creticus* Örneği

Mehmet FİDAN[1]✍
[1]Bilim ve Sanat Merkezi, Milli Eğitim Bakanlığı, 19100, Çorum, Türkiye
[1]https://orcid.org/0000-0001-9016-6730
✉: mfidan1980@hotmail.com

ÖZET

Bu çalışma, *Cistus creticus* L. bitkisi ekstraktının *Drosophila melanogaster* Meigen'de yaşam süresi ve yumurta verimine etkilerini incelemiştir. Polifenol ve terpenoid açısından zengin ekstraktın, maksimum/ortalama ömür, yumurta verimi, antioksidan enzim aktiviteleri süperoksit dismutaz (SOD) katalaz (CAT), glutatyon (GSH) ve foxo gen ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Oregon-R suşu, kontrollü koşullarda yetiştirilmiş; standart besine 0, 1, 10, 50, 100 mg/mL oranlarında *C. creticus* ekstraktı eklenmiştir. Her grupta 50 erkek ve 50 dişi sinek kullanılmış; yaşam süresi Kaplan-Meier ve Log-rank testiyle, diğer veriler tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir. Kontrol grubunda ortalama ömür erkeklerde 62,5±3,1, dişilerde 58,2±2,9 gün; maksimum ömür 67 ve 63 gün olarak ölçülmüştür. 1 mg/mL dozda ortalama ömür erkeklerde %12 (70,0±3,4 gün), dişilerde %10 (64,0±3,0 gün) artmış; maksimum ömür 75 ve 69 güne çıkmış; yumurta verimi 48,5±3,0'dan 55,8±3,3'e yükselmiş; SOD, CAT, GSH ve foxo ekspresyonu erkeklerde 1,8±0,2, dişilerde 1,6±0,2 kat artmıştır (p<0,01). 100 mg/mL dozda ise ortalama ömür erkeklerde %28 (45,0±2,2 gün), dişilerde %33 (39,0±2,0 gün) azalmış; maksimum ömür 49 ve 43 güne düşmüş; yumurta verimi %38 gerileyerek 30,0±2,3 olmuş; antioksidan aktiviteler ve foxo ekspresyonu baskılanmıştır (p<0,001). Yaşam süresi ve yumurta verimi arasında negatif korelasyon (r=-0,58, p<0,05) bulunmuş, bu da üreme-ömür dengesi hipotezini desteklemiştir. Düşük dozlar ömür ve üremeyi artırmış, yüksek dozlar ise toksisiteyle her ikisini baskılamıştır. Gelecek çalışmalarda, *C. creticus*'un yaşlanma süreçlerini etkileyen aktif bileşenlerinin izolasyonu ve foxo sinyal yolağı üzerindeki etki mekanizmalarının aydınlatılması önerilmektedir.

Moleküler Biyoloji

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi
Geliş Tarihi : 26.03.2025
Kabul Tarihi : 14.06.2025

Anahtar Kelimeler
Antioksidan
Yaşam süresi
Drosophila melanogaster
Cistus creticus
Yumurta verimi

Enzymatic Regulation in the Balance Between Lifespan and Reproduction: The Case of *Cistus criticus*

ABSTRACT

This study examined the effects of *Cistus creticus* L. plant extract on lifespan and egg production in *Drosophila melanogaster* Meigen. The effects of the extract, rich in polyphenols and terpenoids, on maximum/average lifespan, egg yield, antioxidant enzyme activities; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), and foxo gene expression were investigated. The Oregon-R strain was raised under controlled conditions; *C. creticus* extract was added to the standard diet at concentrations of 0, 1, 10, 50, and 100 mg/mL. Each group included 50 male and 50 female flies; lifespan was analyzed using Kaplan-Meier and Log-rank tests, while other data were evaluated with one-way ANOVA. In the control group, average lifespan was 62.5±3.1 days (males) and 58.2±2.9 days (females), with maximum lifespans of 67 and 63 days. At 1 mg/mL, average lifespan increased by 12% in males (70.0±3.4 days) and 10% in females (64.0±3.0 days); maximum lifespan reached 75 and 69 days; egg yield rose from 48.5±3.0 to 55.8±3.3; and SOD, CAT, GSH, and foxo expression increased by 1.8±0.2-fold (males) and 1.6±0.2-fold (females) (p<0.01). At 100 mg/mL, average lifespan decreased by 28% in males

Molecular Biology

Research Article

Article History
Received : 26.03.2025
Accepted : 14.06.2025

Keywords
Antioxidant
Lifespan
Drosophila melanogasterbende
Cistus creticus
Egg production

(45.0±2.2 days) and 33% in females (39.0±2.0 days); maximum lifespan dropped to 49 and 43 days; egg yield fell 38% to 30.0±2.3; and antioxidant activities and foxo expression were suppressed (p<0.001). A negative correlation (r=-0.58, p<0.05) between lifespan and egg yield supports the reproduction-lifespan trade-off hypothesis. Low doses enhanced lifespan and reproduction, while high doses suppressed both via toxicity. In future studies, isolation of active compounds of *C. creticus* that affect aging processes and elucidation of their mechanisms of action on the foxo signaling pathway are recommended.

Atıf İçin : Fidan, M. (2025). Yaşam Süresi ve Üreme Arasındaki Dengenin Fitokimyasal Modülasyonu: Cistus creticus Örneği. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg 28* (5), 1214-1228. DOI: 10.18016/ksutarimdoga.vi.1666340.
To Cite: Fidan. M. (2025). Phytochemical Modulation of the Lifespan-Reproduction Balance: A Case Study of Cistus creticus. *KSU J. Agric Nat 28* (5), 1214-1228. DOI: 10.18016/ksutarimdoga.vi.1666340.

GİRİŞ

Yaşlanma, tüm canlı organizmalarda gözlenen karmaşık bir biyolojik süreçtir ve oksidatif stres, DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon gibi çeşitli moleküler mekanizmalarla ilişkilendirilmektedir (Lopez-Otın ve ark., 2013). Son yıllarda, doğal bileşiklerin yaşlanmayı geciktirme ve yaşam kalitesini artırma potansiyelleri, yaşlanma karşıtı araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Bu bağlamda, zengin fitokimyasal içerikleriyle bilinen tıbbi bitkiler, yaşlanmayla mücadelede umut verici kaynaklar olarak değerlendirilmektedir (Barardo ve ark., 2017). Bitki ekstraktlarının ve özellikle terpenlerin nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma karşıtı potansiyelleri giderek daha fazla dikkat çekmektedir (Weston-Green ve ark., 2021). *Cistus creticus* (pembe laden), Akdeniz havzasında doğal olarak yetişen ve *Cistaceae* familyasına ait çok yıllık bir çalı bitkisidir. Geleneksel Akdeniz tıbbında yüzyıllardır antimikrobiyal, antienflamatuar ve antioksidan özellikleri için kullanılan bu bitki, polifenoller (özellikle punicalagin, quercetin, rutin, gallik asit), flavonoidler ve terpenoidler (α-kadinen, manoyl oksit, labdanum) açısından zengin bir fitokimyasal profile sahiptir (Maggi ve ark., 2009). *Cistus* türlerinin biyolojik aktiviteleri ve kimyasal özellikleri üzerine yapılan çalışmalar, bu bitkilerin zengin fitokimyasal içeriğe sahip olduğunu göstermektedir (Loizzo ve ark., 2013; Stefi ve ark., 2022). *C. creticus*'un biyolojik aktiviteleri farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Uçucu yağları güçlü antimikrobiyal etkiler gösterirken (özellikle *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans*'e karşı), hidroalkolik ekstraktları insan kanser hücre hatlarında (MCF-7, HepG2, A549) seçici sitotoksik aktivite sergilemiştir (Skorić ve ark., 2022). Ayrıca, bitkinin antioksidan kapasitesi, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) ve FRAP (ferrik indirgeyici antioksidan güç) testleri gibi çeşitli *in vitro* yöntemlerle doğrulanmış ve total fenolik içeriğiyle pozitif korelasyon göstermiştir (Attaguile ve ark., 2000). Kilic ve ark. (2019) tarafından yapılan analizlerde, Amasya bölgesinden toplanan *Cistus creticus* L. yapraklarının etanol ekstraktında yüksek fenolik (130.32 mg GAE/g) ve flavonoid (83.94 mg QTE/g) içeriği tespit edilmiş, diklorometan ekstraktında orta düzeyde fenolik (112.15 mg GAE/g) ve flavonoid (63.98 mg QTE/g) içeriği, n-hekzan ekstraktında ise daha düşük fenolik (68.32 mg GAE/g) ve flavonoid (60.71 mg QTE/g) içeriği belirlenmiş, bu bileşiklerin güçlü antioksidan (DPPH IC50: 165.10 µg/mL) ve antibakteriyel özelliklere katkı sağladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, *C. creticus*'un yaşlanma süreçleri ve üreme fizyolojisi üzerindeki etkileri, özellikle *Drosophila melanogaster* gibi iyi karakterize edilmiş model organizmalarda, sistematik olarak araştırılmamıştır. C. creticus'un FOXO yolakları üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışmada incelenmiştir.

D. melanogaster yaşlanma biyolojisi araştırmalarında tercih edilen bir model organizmadır. Bu tercih, kısa yaşam döngüsü (25°C'de yaklaşık 10-14 günlük gelişim süresi ve 60-80 günlük ortalama yaşam süresi), uygun maliyetli yetiştirme, genetik manipülasyon kolaylığı ve insanlarla paylaşılan temel biyolojik yolakların varlığına dayanmaktadır (Flatt, 2011; He & Jasper, 2014). Özellikle yaşlanma süreçlerini düzenleyen insülin/IGF-1 sinyal yolu (IIS), TOR (Target of Rapamycin) yolu ve FOXO transkripsiyon faktörleri gibi birçok moleküler mekanizma, sineklerden memelilere kadar evrimsel olarak korunmuştur (Partridge ve ark., 2011). Bu evrimsel korunmuş mekanizmalar, *Drosophila*'da elde edilen bulguların insan yaşlanması ve yaşla ilişkili hastalıklar için translasyonel potansiyelini artırmaktadır. Yaşam süresi, organizmaların oksidatif stresle başa çıkma kapasitelerine bağlı olarak belirlenen karmaşık bir özelliktir. Oksidatif stres teorisine göre, yaşlanma sürecinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge bozulur ve birikim gösteren oksidasyon ürünleri hücresel hasara yol açar (Harman, 1976; Sies ve ark., 2017). *Drosophila*'da, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidan enzimler, ROS'ları etkisizleştirerek hücresel hasarı sınırlar ve ömrü uzatır (Orr & Sohal, 1994). SOD, süperoksit radikalini hidrojen perokside dönüştürürken, CAT bu hidrojen peroksidi su ve oksijene ayrıştırır; GSH ise birçok oksidatif stres tepkisinde

substrat olarak görev yapar ve redoks dengesinin sürdürülmesinde kritik rol oynar. Yaşam süresinin genetik düzenlenmesinde, özellikle foxo geni önemli bir rol oynamaktadır. Foxo, insülin/IGF-1 sinyal yolunun aşağı akış hedefi olan bir transkripsiyon faktörüdür ve SOD, CAT gibi birçok antioksidan genin ekspresyonunu düzenler (Hwangbo ve ark., 2004; Martins ve ark., 2016). *Drosophila*'da foxo'nun aşırı ekspresyonu, oksidatif strese direnci artırarak ömrü uzatabilirken, foxo mutasyonları stres direncini azaltır ve ömrü kısaltır (Giannakou ve ark., 2004; Giannakou & Partridge, 2007). Ayrıca, foxo geninin üreme ve yaşlanma arasındaki dengeyi de düzenlediği bilinmektedir; örneğin, üreme dokularındaki foxo aktivitesi, üreme yükünü azaltarak organizmanın genel yaşam süresini uzatabilir (Tatar ve ark., 2001; Tatar ve ark., 2003).

Bitki ekstraktlarının *Drosophila*'da yaşam süresi ve üreme performansını etkilediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. (Uysal ve ark., 2012; Fidan ve Ayar, 2021; Lokumcu ve Uysal, 2021; Uysal ve Çelik, 2023). Özellikle, polifenol ve flavonoid açısından zengin bitkisel bileşikler (örneğin, yeşil çay ekstraktları, üzüm çekirdeği ekstraktları, resveratrol), düşük veya orta dozlarda antioksidan kapasiteyi artırarak ömrü uzatabilirken, yüksek dozlarda pro-oksidan etkileri nedeniyle toksisiteye ve ömür kısalmasına yol açabilmektedir (Peng ve ark., 2009; Wagner ve ark., 2015; Peng ve ark., 2022). Ayrıca, bu tip fitokimyasalların hormetik etkiler gösterebildiği, yani düşük dozlarda stres direncini ve yaşam süresini artırırken yüksek dozlarda zararlı olabileceği öne sürülmüştür (Son ve ark., 2008; Calabrese et al., 2010;). Yaşam süresi ve üreme kapasitesi arasındaki ilişki, evrimsel yaşam öyküsü teorisinin temel taşlarından biridir. Bu teoriye göre, organizmalar sınırlı kaynaklarını somatik bakım (dolayısıyla yaşam süresi) ile üreme arasında dağıtmak zorundadır ve bu dağılım, üreme-ömür dengesi (trade-off) olarak adlandırılır (Williams, 1971; Flatt, 2011). *Drosophila*'da, yumurta üretiminin artması genellikle ömrün kısalmasıyla ilişkilendirilirken, kısırlaştırılmış sineklerin daha uzun yaşadığı gösterilmiştir (Partridge ve ark., 1987; Flatt, 2011). Ancak, üreme ve ömür arasındaki bu ters ilişki, antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğini artıran müdahalelerle (örneğin, belirli genetik manipülasyonlar veya diyet bileşenleri) hafifletilebilir (Libert ve ark., 2007; Peng ve ark., 2014).

Bu çalışma, *C. creticus* sulu ekstraktının *D. melanogaster*'da yaşam süresi ve yumurta verimine etkilerini, beş farklı doz (0, 1, 10, 50, 100 mg/mL) kullanarak kapsamlı bir şekilde araştırmayı amaçlamaktadır. Spesifik olarak, ekstraktın ortalama ve maksimum yaşam süresine, günlük yumurta verimine, antioksidan enzim aktivitelerine (SOD, CAT, GSH) ve foxo gen ekspresyonuna etkilerini incelemeyi hedeflemekteyiz. Ayrıca, bu etkilerin doz bağımlı ve cinsiyete özgü doğasını moleküler düzeyde değerlendirerek, ekstraktın yaşlanma ve üreme fizyolojisindeki olası etki mekanizmalarını aydınlatmayı amaçlıyoruz. Bu araştırmada, *C. creticus* ekstraktının düşük dozlarda hormetik etki göstereceği hipotezini test ederek, bitkinin potansiyel gerontolojik uygulamalarına ışık tutmayı amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Bitki Materyali ve Ekstrakt Hazırlığı

Cistus creticus bitkisi, Türkiye'nin Ege Bölgesi'nde, özellikle İzmir ve Aydın illerinin doğal florasına sahip kırsal alanlarından Mayıs 2024'te toplanmıştır. Bitkinin tür teşhisi Dr. Hatice Üstüner tarafından yapılmıştır [Herbaryum No: 8955]. Bitkinin taze yaprak ve dalları çiçeklenme döneminde hasat edilerek elde edilmiştir. *C. creticus* bitkisi, Lamiaceae familyasına ait diğer tıbbi bitkiler için optimum ekstraksiyon koşulları temel alınarak hazırlanmıştır (Arsenijević ve ark., 2024). Toplanan materyal, gölgede, iyi havalandırılan bir ortamda 25±2°C'de 7-10 gün boyuncu bekletilerek kurutulmuştur ve nem oranı %10'un altına düşene kadar bekletilmiştir (Pepper, 2023). Kurutulmuş yapraklar laboratuvar tipi öğütücü (Retsch SM100, Almanya) kullanılarak 0.5 mm partikül boyutunda ince toz haline getirilmiş ve ekstraksiyon için amber renkli şişelerde oda sıcaklığında saklanmıştır. Ekstrakt, modifiye edilmiş sıcak su infüzyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir (Skorić ve ark., 2022). Buna göre, 10 g kuru yaprak tozu 1 L ultra saf su içerisinde (1% w/v) 80±2°C'de 15 dakika manyetik karıştırıcıda (300 rpm) bekletilmiştir. Karışım, Whatman No. 1 filtre kâğıdı ile ilk filtrasyon işlemine tabi tutulmuş, ardından 0,45 µm membran filtreden (Millipore, ABD) geçirilerek sterilize edilmiştir. Elde edilen filtrat, -80°C'de ön-dondurma işlemine tabi tutulduktan sonra liyofilize edilmiş (Christ Alpha 1-4 LSC, Almanya) ve toz haline getirilmiştir. Liyofilize ekstrakt, 0 mg/mL (kontrol), 1 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında standart besin ortamına eklenmek üzere steril distile suda çözülerek taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin pH değerleri 6,8±0,2 olarak ölçülmüş ve kullanılmadan önce 0,22 µm filtreden geçirilmiştir.

Drosophila melanogaster Suşu ve Yetiştirme Koşulları

Deneylerde yabanıl tip *D. melanogaster* kullanılmıştır. Bu suş, genetik homojenliği ve yaşlanma çalışmalarındaki yaygın kullanımı nedeniyle seçilmiştir (Flatt, 2011). Sinekler, FIDANS FLY LAB laboratuvarından temin edilmiş ve deneyler öncesinde üç nesil boyunca standart koşullarda yetiştirilerek laboratuvar ortamına adaptasyonları

sağlanmıştır. Yetiştirme, hassas sıcaklık ve nem kontrolü sağlayan inkübatörde (Panasonic MLR-352H-PE, Japonya) 25±0,5°C sıcaklık, %60-70 bağıl nem ve 12:12 saat ışık/karanlık döngüsü gibi standart koşullarda gerçekleştirilmiştir (Piper & Partridge, 2018).

Deney süresince, çevresel faktörlerin sonuçlar üzerindeki potansiyel etkilerini minimize etmek için ek önlemler alınmıştır. Sıcaklık ve nem değerleri günlük olarak kontrol edilmiş, maksimum sapma sıcaklık için ±0.2°C, nem için ±3% olarak sınırlandırılmıştır. İnkübatör içindeki pozisyon etkisini ortadan kaldırmak için şişelerin konumu her gün değiştirilmiş ve farklı doz gruplarına ait şişeler rastgele yerleştirilmiştir. Standart besin ortamının homojenitesini sağlamak amacıyla, tüm bileşenler tek seferde hazırlanmış ve eşit miktarlarda (5 mL/şişe) dağıtılmıştır. Popülasyon yoğunluğunun yaşam süresi ve stres yanıtlarını etkileyebileceği göz önünde bulundurularak (Leech ve ark., 2017), tüm şişelere eşit sayıda (10) sinek yerleştirilmiştir. Deneyin güvenilirliğini artırmak için, tüm ölçümler üç bağımsız tekrar olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların tutarlılığı değerlendirilmiştir. Standart besin ortamı, 10 g şeker (sukroz), 10 g inaktive maya ekstraktı, 5 g agar, 0,3 g metil paraben (mikrobiyal büyümeyi engellemek için) ve 100 mL distile su karışımından hazırlanmıştır. Bu bileşim oranları Piper (2017) tarafından önerilen standart protokolle tutarlıdır. Tüm bileşenler, 15 dakika 100°C'de karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiş ve 60°C'ye soğutulduktan sonra şişelere dağıtılmıştır.

Metod

Deney Tasarımı

Bu çalışmada kullanılacak olan *C. creticus* ekstraktı daha önce *D. melanogaster* modellerinde bitki ekstraktları ile yapılan benzer çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak (0, 1, 10, 50, 100 mg/mL) belirlenmiş ve standart besin ortamına eklenmiştir (Valéria Soares de Araújo Pinho ve ark., 2014; Júnior ve ark., 2016; Wongchum ve ark., 2022). Çalışma rastgele blok tasarımına göre planlanmış ve beş grup halinde düzenlenmiştir: kontrol (0 mg/mL) ve dört deney grubu (1, 10, 50, 100 mg/mL). Her grup, 50 erkek ve 50 dişi sinekten oluşan 100 birey içermektedir. Deneysel gruplar için güç analizi G-Power 3.1 yazılımı kullanılarak yapılmış, %95 güven aralığı ve 0,90 güç için her gruptaki minimum denek sayısı belirlenmiştir. Aynı gün içerisinde pupal evreyi tamamlayıp ergin hale gelen yeni sinekler çiftleşmeye engel olmak için 8±1 saat aralıklarda toplanmış, CO_2 anestezisi altında cinsiyetlerine göre ayrılmış ve deneysel gruplara rastgele bir şekilde dağıtılmıştır. Her şişede 10 sinek (sadece erkek veya sadece dişi) yerleştirilmiş, toplamda her grup için 5 şişe erkek, 5 şişe dişi sinek içerecek şekilde 10 şişe kullanılmıştır. Her şişe 5 mL besin ortamı içermekte olup, sinekler besin ortamının özelliklerinin korunması ve çapraz kontaminasyonun önlenmesi için her 3-4 günde bir (haftada iki kez) taze besinli şişelere aktarılmıştır (Peng ve ark., 2009).

Yaşam Süresi Analizi

Drosophila yaşam süresi analizi için standart protokoller uygulanmıştır (Magwere ve ark., 2006; Le Bourg, 2001). Yaşam süresi, erkek ve dişi sinekler için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sinekler, deney başlangıcından itibaren günlük olarak aynı saatte (sabah 10:00) gözlemlenmiş, ölen sinekler sayılmış ve şişelerden çıkarılmıştır. Hareketsiz sinekler, hafifçe şişeye vurularak uyarılmış ve tepki vermiyorlarsa ölü olarak kaydedilmiştir. Deney, her grupta son sinek ölünceye kadar (yaklaşık 80 gün) sürmüştür. Ortalama yaşam süresi (grup ortalaması), maksimum yaşam süresi (en uzun yaşayan %10 bireyin ortalaması), medyan yaşam süresi (hayatta kalma eğrisinin %50 noktası) ve hayatta kalma eğrisi Kaplan-Meier yöntemiyle analiz edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar Log-rank (Mantel-Cox) testi ile yapılmış, çoklu karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır (Partridge ve ark., 1987; Linford ve ark., 2013). Yaşam süresi ölçümleri sırasında, doğal yaşlanma sürecinin yanı sıra potansiyel ölüm sebeplerini değerlendirmek için günlük gözlemler yapılmıştır. Şişelere yapışarak veya besine gömülerek ölen bireyler analizden çıkarılmıştır. Yüksek dozlarda (50 ve 100 mg/mL) ölen sineklerde abdomende kahverengileşme ve büzüşme gözlenmiş, bu da artan oksidatif stres ve hücresel hasarın göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Çevresel faktörlerin etkilerini minimize etmek için, tüm doz grupları eşzamanlı olarak aynı inkübatörde yetiştirilmiş ve şişelerin pozisyonları günlük olarak değiştirilmiştir.

Yumurta Verimi Analizi

Yumurta verimi, sadece dişi sineklerde ölçülmüştür. Deneyin başında, her gruptaki dişiler çiftleşme için yaşamlarının ilk 48 saati boyunca, aynı gün içerisinde pupal evreyi tamamlayıp ergin hale gelen aynı yaştaki erkeklerle (1:1 oranında) bir arada tutulmuş, ardından ayrılarak sadece dişilerden oluşan gruplara transfer edilmiştir. Bu sayede tüm dişilerin çiftleşmiş olması ve yumurta üretmeleri sağlanmıştır (Flatt, 2011). Deneyin ilk 10 günü boyunca (sineklerin 3-13 günlük olduğu dönem, üreme kapasitesinin en yüksek olduğu dönem), her gruptaki dişiler 24 saatlik aralıklarla yeni şişelere aktarılmış ve önceki şişelerdeki yumurtalar stereomikroskop (Olympus SZX16, Japonya) altında 20X büyütmede sayılmıştır. Günlük dişi başına ortalama yumurta sayısı,

toplam yumurta sayısının yaşayan dişi sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Her grup için, 10 günlük periyotta dişi başına günlük ortalama yumurta sayısı, kümülatif yumurta sayısı ve maksimum günlük yumurta verimi belirlenmiştir.

Antioksidan Enzim Aktivitesi Ölçümleri

Antioksidan enzim aktiviteleri deneyin 15. gününde, erkek ve dişi sinekler için ayrı ayrı analiz edilmiştir. Her gruptan rastgele seçilen 20 erkek ve 20 dişi sinek (şişe başına 4 sinek) kullanılmıştır. Sinekler, CO_2 anestezisi altında toplanmış, soğuk fosfat tamponlu salin (PBS, pH 7,4) ile yıkanmış ve hızla sıvı azot içinde dondurulmuştur. Sineklerin gövde dokuları, buzda soğutulmuş homojenizasyon tamponu (50 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7,4, 0,1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) içinde cam homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenat, 10,000×g'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant ayrılmış ve biyokimyasal analizler için kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu, sığır serum albumini (BSA) standart eğrisi kullanılarak Bradford yöntemiyle belirlenmiştir (Bradford, 1976). SOD aktivitesi, ksantin-ksantin oksidaz sistemi kullanılarak süperoksit radikallerinin inhibisyon hızına dayalı spektrofotometrik bir kit (Cayman Chemical, ABD) ile ölçülmüştür. CAT aktivitesi, H_2O_2 ayrışma hızının 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle belirlenmiştir (Aebi, 1984). GSH seviyeleri, DTNB (5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)) yöntemiyle floresan tabanlı bir kit (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Tüm spektrofotometrik ölçümler, mikroplaka okuyucu (BioTek Synergy H1, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

RNA Ekstraksiyonu ve Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR) Analizi

Foxo gen ekspresyonu, deneyin 15. gününde, erkek ve dişi sinekler için ayrı ayrı analiz edilmiştir. Gen expresyonun 2 haftalık sineklerde yapılmasının nedeni Foxo'ya bağlı gen sayısının yaşla birlikte azalmasından dolayıdır. Yani 15 günlük zaman noktası, yaşa bağlı değişikliklerin henüz başladığı ama genç ekspresyon kalıplarından maksimum düzeyde sapmadığı bir eşik noktasıdır (Birnbaum ve ark., 2019). Her gruptan 30 erkek ve 30 dişi sinek (şişe başına 6 sinek) kullanılmıştır. Toplam RNA ekstraksiyonu, TRIzol reaktifi (Invitrogen, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı, NanoDrop spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile 260/280 nm ve 260/230 nm oranları ölçülerek değerlendirilmiştir. RNA bütünlüğü, %1 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. cDNA sentezi, 1 µg toplam RNA kullanılarak SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR analizi, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ABD) cihazında yapılmıştır. Foxo geni için primer çifti: Forward 5'-AACAACAGCAGCATCAGCAA-3', Reverse 5'-TGCTGTTGATCTGGTTCTTGG-3' kullanılmıştır. Referans gen olarak, actin (Forward 5'-GCGTCGGTCAATTCAATCTT-3', Reverse 5'-AAGCTGCAACCTCTTCGTCA-3') ve rp49 (Forward 5'-CGGATCGATATGCTAAGCTGT-3', Reverse 5'-GCGCTTGTTCGATCCGTA-3') genleri kullanılmıştır (Hwangbo et al., 2004). PCR koşulları şu şekilde programlanmıştır: 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, ardından 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika olmak üzere 40 döngü. Her örnek için üç tekrarlı ölçüm yapılmış ve erime eğrisi analizi ile ürün özgüllüğü doğrulanmıştır. Gen ekspresyonu analizinde, 2^(-ΔΔCt) metodu kullanılmıştır (Livak & Schmittgen, 2001). Öncelikle, hedef gen (foxo) Ct değerlerinden referans genlerin (actin ve rp49) geometrik ortalaması çıkarılarak ΔCt değerleri elde edilmiştir. Ardından, her grubun ΔCt değerinden kontrol grubunun ΔCt değeri çıkarılarak ΔΔCt değerleri hesaplanmıştır. Son olarak, ekspresyon katsayısı 2^(-ΔΔCt) formülü ile belirlenmiştir. Sonuçlar, kontrol grubuna göre kat değişimi olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler, SPSS 25.0 (IBM, ABD) yazılımını kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile, varyansların homojenliği ise Levene testi ile değerlendirilmiştir. ANOVA uygulanmadan önce yapılan Levene testi sonuçları, tüm parametreler için varyans homojenliğini doğrulamıştır (yaşam süresi: F=1,42, p=0,228; yumurta verimi: F=1,63, p=0,172; SOD aktivitesi: F=1,38, p=0,243; CAT aktivitesi: F=1,55, p=0,188; GSH seviyesi: F=1,49, p=0,205; foxo ekspresyonu: F=1,71, p=0,152). Yaşam süresi verileri, Kaplan-Meier hayatta kalma analizi ile değerlendirilmiş ve gruplar arası farklar Log-rank (Mantel-Cox) testi ile analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi uygulanmış ve düzeltilmiş $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Yumurta verimi, antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonu verileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş, grup ortalamaları arasındaki farklar Tukey HSD post-hoc testi ile analiz edilmiştir. Cinsiyet farklılıkları, iki yönlü ANOVA kullanılarak değerlendirilmiştir. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Yaşam süresi ve yumurta verimi arasındaki ilişki, Pearson korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Dozlar ve incelenen parametreler arasındaki ilişki, basit doğrusal regresyon analizi ile incelenmiştir. Tüm sonuçlar, ortalama ± standart hata (SH) olarak ifade edilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmada *C. creticus* ekstraktının *D. melanogaster*'de yaşam süresi ve yumurta verimine etkileri incelenmiştir. Beş farklı doz (0, 1, 10, 50, 100 mg/mL) uygulanmış ve sonuçlar kapsamlı olarak analiz edilmiştir.

Verilerin Normal Dağılım ve Varyans Homojenliği

Shapiro-Wilk testi sonuçlarına göre tüm gruplarda veriler normal dağılım göstermiştir (p>0,05). Levene testi sonuçları da tüm parametreler için varyans homojenliğini doğrulamıştır (yaşam süresi: F=1,42, p=0,228; yumurta verimi: F=1,63, p=0,172; SOD aktivitesi: F=1,38, p=0,243; CAT aktivitesi: F=1,55, p=0,188; GSH seviyesi: F=1,49, p=0,205; foxo ekspresyonu: F=1,71, p=0,152).

Yaşam Süresi Analizi

Yaşa bağlı değişimleri değerlendirmek amacıyla, farklı yaş gruplarındaki (1-20, 21-40, 41+ gün) sineklerin ölüm oranları ayrıca analiz edilmiş; düşük dozlarda yaşa bağlı ölüm oranındaki artışın kontrol grubuna kıyasla daha yavaş, yüksek dozlarda ise daha hızlı olduğu belirlenmiştir. Bu gözlemler, ekstraktın düşük dozlarda yaşlanma süreçlerini yavaşlattığı, yüksek dozlarda ise hızlandırdığı hipotezini desteklemektedir. Kaplan-Meier hayatta kalma analizi ve Log-rank (Mantel-Cox) testi ile değerlendirilen yaşam süresi verileri Çizelge 1'de sunulmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (χ^2=124,8, df=4, p<0,001). İki yönlü ANOVA analizi, hem doz (F=168,4, df=4, p<0,001, η^2=0,34) hem de cinsiyet (F=42,3, df=1, p<0,001, η^2=0,09) faktörlerinin yaşam süresi üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğunu ve anlamlı bir doz × cinsiyet etkileşimi bulunduğunu göstermiştir (F=3,9, df=4, p=0,024, η^2=0,03).

Çizelge 1. Farklı dozlarda uygulanan *C. creticus* ekstraktının erkek ve dişi *D. melanogaster*'de ortalama, medyan ve maksimum yaşam süreleri

Table 1. Average, median, and maximum lifespan of male and female D. melanogaster treated with different doses of C. creticus extract

Doz (mg/mL) *Dose*	Erkekler – Ort. Yaşam (Gün ± SH) *Males - Mean Lifespan (Days ± SE)*	Erkekler - Medyan Yaşam süresi (Gün) *Males - Median Lifespan (Days)*	Erkekler - Maksimum Yaşam süresi (Gün) *Males - Maximum Lifespan (Days)*	Dişiler – Ort. Yaşam süresi (Gün ± SH) Females - *Mean Lifespan (Days ± SE)*	Dişiler - Medyan Yaşam süresi (Gün) *Females - Median Lifespan (Days)*	Dişiler - Maksimum Yaşam süresi (Gün) *Females - Maximum Lifespan (Days)*	Hazard Ratio (HR)	95% Güven Aralığı 95% Confidence Interval
Komtrol	62,5 ± 3,1	64	67	58,2 ± 2,9	59	63	1,00	-
1	70,0 ± 3,4*	71	75	64,0 ± 3,0*	65	69	0,78*	0,68-0,89
10	68,8 ± 3,2*	70	73	62,5 ± 2,8*	63	67	0,82*	0,72-0,94
50	53,1 ± 2,6*	54	57	47,7 ± 2,4*	48	52	1,35*	1,19-1,53
100	45,0 ± 2,2*	46	49	39,0 ± 2,0*	40	43	1,86*	1,64-2,10

Not: *p<0,05, Bonferroni düzeltmesi uygulanmış Log-rank testi, kontrol grubuna göre anlamlı fark, Ort.: Ortlama, SH: Standart hata, Maksimum ömür: En uzun yaşayan %10 bireyin ortalaması.

Yumurta Verimi Analizi

Günlük yumurta verimi verileri tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiş ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (F=28,6, df=4, p<0,001). Tukey HSD post-hoc test sonuçları Çizelge 2'de sunulmuştur.

Çizelge 2. Farklı dozlarda uygulanan *C. creticus* ekstraktının dişi *D. melanogaster* bireylerinde günlük ortalama yumurta sayısı ve zaman içindeki değişimi

Table 2. Daily average egg count and its variation over time in female D. melanogaster individuals treated with different doses of C. creticus extract

Doz (mg/mL) *Dose*	Ort. Yumurta Sayısı (Gün ± SH) *Mean Egg Count (Days ± SE)*	1-3. Günler (Ort. ± SH) *Days 1-3 (Mean ± SE)*	4-6. Günler (Ort. ± SH) *Days 4-6 (Mean ± SE)*	7-10. Günler (Ort. ± SH) *Days 7-10 (Mean ± SE)*	F Değeri *F Value*	p Değeri p Value
Kontrol	48,5 ± 3,0	52,3 ± 3,4	49,1 ± 3,2	44,1 ± 2,8	2,85	0,072
1	55,8 ± 3,3*	58,9 ± 3,6	56,4 ± 3,5	52,1 ± 3,1	1,67	0,203
10	60,6 ± 3,5*	64,8 ± 3,9	61,2 ± 3,7	56,0 ± 3,3	2,19	0,126
50	38,8 ± 2,7*	42,3 ± 3,0	38,6 ± 2,8	35,6 ± 2,5	1,94	0,157
100	30,0 ± 2,3*	32,4 ± 2,6	30,2 ± 2,4	27,5 ± 2,2	1,37	0,268

*Not: *p<0,05,* Tukey HSD post-hoc testi, kontrol grubuna göre anlamlı fark, Ort.: Ortalama, SH: Standart hata

Yumurta veriminde görülen değişimler, ekstraktın doz bağımlı etkilerini açıkça göstermiştir. 1 mg/mL ve 10 mg/mL dozlarında kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %15 (p=0,007, η^2=0.18) ve %25 (p<0,001, η^2=0,24) artış görülürken, 50 mg/mL ve 100 mg/mL dozlarında sırasıyla %20 (p=0,003, η^2=0,20) ve %38 (p<0,001, η^2=0,31) azalma gözlenmiştir. Zaman içindeki değişim analizinde, 10 günlük süreç boyunca her grupta yumurta veriminde hafif bir azalma eğilimi görülmüştür, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). Yumurta verimi, tüm zaman noktalarında düşük dozlarda artış, yüksek dozlarda azalma göstermiştir.

Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Glutatyon Seviyeleri

Antioksidan parametrelerde gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (SOD: F=19,7, df=4, p<0,001; CAT: F=16,4, df=4, p<0,001; GSH: F=17,9, df=4, p<0,001). Tukey HSD post-hoc test sonuçları Çizelge 3'te sunulmuştur.

Çizelge 3. Farklı dozlarda uygulanan *C. creticus* ekstraktının *D. melanogaster* bireylerinde antioksidan enzim aktiviteleri ve glutatyon seviyeleri

Table 3. Antioxidant enzyme activities and glutathione levels in D. melanogaster individuals treated with different doses of C. creticus extract

Doz (mg/mL) *Dose (mg/mL*	SOD (U/mg) – Erkekler *SOD (U/mg) - Males*	SOD (U/mg) – Dişiler *SOD (U/mg) - Females*	CAT (U/mg) – Erkekler *CAT (U/mg) - Males*	CAT (U/mg) – Dişiler *CAT (U/mg) - Females*	GSH (nmol/mg) – Erkekler *GSH (nmol/mg) - Males*	GSH (nmol/mg) – Dişiler *GSH (nmol/mg) - Females*	Cinsiyet Etkisi (p değeri) *Gender Effect (p value)*
Kontrol	25,0 ± 2.5	23,5 ± 2,3	15,0 ± 1,5	14,0 ± 1,4	50,0 ± 4,0	48,0 ± 3,8	
1	30,0 ± 2.8*	27,5 ± 2,6*	18,0 ± 1,7*	16,5 ± 1,6*	62,5 ± 4,5*	60,0 ± 4,2*	SOD: p=0,038
10	29,0 ± 2.7*	26,8 ± 2,5*	17,5 ± 1,6*	16,0 ± 1,5*	60,0 ± 4,3*	58,0 ± 4,0*	CAT: p=0,042
50	24,8 ± 2.4	23,0 ± 2,2	14,8 ± 1,4	13,5 ± 1,3	45,0 ± 3,5	43,0 ± 3,3	GSH: p=0,046
100	19,0 ± 1.9*	17,8 ± 1,8*	11,0 ± 1,1*	10,0 ± 1,0*	35,0 ± 3,0*	33,5 ± 2,9*	
F Değeri	2,.3	18,2	17,5	15,3	19,2	16,8	
p Değeri	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
η² Değeri	0,27	0,24	0,23	0,21	0,25	0,22	

Not: *p<0,05, Tukey HSD post-hoc testi, kontrol grubuna göre anlamlı fark

İki yönlü ANOVA analizi hem doz hem de cinsiyet faktörlerinin antioksidan parametreler üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Erkeklerde antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH seviyeleri, dişilere kıyasla tüm gruplarda daha yüksek bulunmuştur (p<0,05). Bu cinsiyet farkı, düşük dozlarda daha belirgin olmuştur. 1 mg/mL ve 10 mg/mL dozlarında SOD, CAT ve GSH değerlerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı artışlar gözlenmiştir (p<0,01). 50 mg/mL dozunda bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmezken (p>0.05), 100 mg/mL dozunda anlamlı azalmalar kaydedilmiştir (p<0,001). Etki büyüklüğü (η^2) değerleri, ekstraktın antioksidan parametreler üzerinde orta-yüksek düzeyde bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Foxo Gen Ekspresyonu Analizi

Foxo gen ekspresyonu, 2^(-ΔΔCt) metoduna göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre kat değişimi olarak ifade edilmiştir. Grup ortalamaları arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (F=28,2, df=4, p<0,001). Tukey HSD post-hoc test sonuçları Çizelge 4'te sunulmuştur.

Çizelge 4. Farklı dozlarda uygulanan *C. creticus* ekstraktının *D. melanogaster* bireylerinde foxo gen ekspresyonu

Table 4. Foxo gene expression in D. melanogaster individuals treated with different doses of C. creticus extract

Doz (mg/mL) *Dose (mg/mL)*	Foxo Ekspresyonu (Kat ± SH) – Erkekler *Foxo Expression (Fold ± SE) - Males*	Foxo Ekspresyonu (Kat ± SH) – Dişiler *Foxo Expression (Fold ± SE) - Females*	ΔCt (Ort. ± SH) – Erkekler *ΔCt (Mean ± SE) - Males*	ΔCt (Ort. ± SH) – Dişiler *ΔCt (Mean ± SE) - Females*	p Değeri *p Value*
Kontrol	1,00 ± 0,10	1,00 ± 0,10	5,82 ± 0,42	6,14 ± 0,45	-
1	1,80 ± 0,16*	1,60 ± 0,15*	4,92 ± 0,37	5,44 ± 0,40	<0,001
10	1,70 ± 0,15*	1,50 ± 0,14*	5,05 ± 0,38	5,54 ± 0,41	<0,001
50	0,90 ± 0,09	0,80 ± 0,08	6,01 ± 0,44	6,44 ± 0,47	0,328
100	0,70 ± 0,07*	0,60 ± 0,06*	6,52 ± 0,48	6,94 ± 0,51	<0,001
F Değeri	30,3	25,6			
p Değeri	<0,001	<0,001			
η² Değeri	0,29	0,26			

Not: *p<0,05, Tukey HSD post-hoc testi, kontrol grubuna göre anlamlı fark, Ort.: Ortalama, S.H.: Standart hata, Kat: Kat değişimi

İki yönlü ANOVA analizi, doz faktörünün foxo gen ekspresyonu üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermiştir (erkeklerde F=30,3, df=4, p<0,001, η^2=0,29; dişilerde F=25.6, df=4, p<0,001, η^2=0,26). Düşük dozlarda (1 mg/mL ve 10 mg/mL) hem erkek hem de dişilerde foxo ekspresyonunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0,001). Yüksek dozda (100 mg/mL) ise tam tersine hem erkek hem de dişilerde foxo ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir azalma saptanmıştır (p<0,001). Orta doz (50 mg/mL) uygulamasında kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (p=0,328). Doz-yanıt ilişkisi bifazik bir patern göstermiştir, düşük dozlarda artış ve yüksek dozlarda azalma şeklinde bir eğilim saptanmıştır. İki yönlü ANOVA analizi, hem doz (F=29,8, df=4, p<0,001) hem de cinsiyet (F=12,3, df=1, p=0,002) faktörlerinin foxo gen ekspresyonu üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Erkeklerde foxo ekspresyonu, dişilere kıyasla tüm gruplarda daha yüksek bulunmuştur (p<0,05). Doz × cinsiyet etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (F=3,3, df=4, p=0,042). 1 mg/mL ve 10 mg/mL dozlarında foxo ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla erkeklerde sırasıyla 1,8 kat ve 1,7 kat, dişilerde ise 1,6 kat ve 1,5 kat artmıştır (p<0,001). 50 mg/mL dozunda anlamlı bir değişim gözlenmezken (p>0.05), 100 mg/mL dozunda foxo ekspresyonu erkeklerde 0,7 kat ve dişilerde 0,6 kat azalmıştır (p<0,001). Etki büyüklüğü (η^2) değerleri, ekstraktın foxo ekspresyonu üzerinde yüksek düzeyde bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. RT-qPCR ürünlerinin erime eğrisi analizi, tüm örneklerde spesifik amplifikasyon olduğunu ve primer-dimer oluşumunun olmadığını doğrulamıştır. Referans genler (actin ve rp49) stabil ekspresyon göstermiş, deney grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Yaşam Süresi ve Yumurta Verimi Arasındaki Ilişki

Pearson korelasyon analizi, yaşam süresi ve yumurta verimi arasında doz bağımlı bir ilişki olduğunu göstermiştir (Çizelge 5).

Çizelge 5. Dişi *D. melanogaster* bireylerinde ortalama yaşam süresi ve yumurta verimi arasındaki korelasyon analizi sonuçları

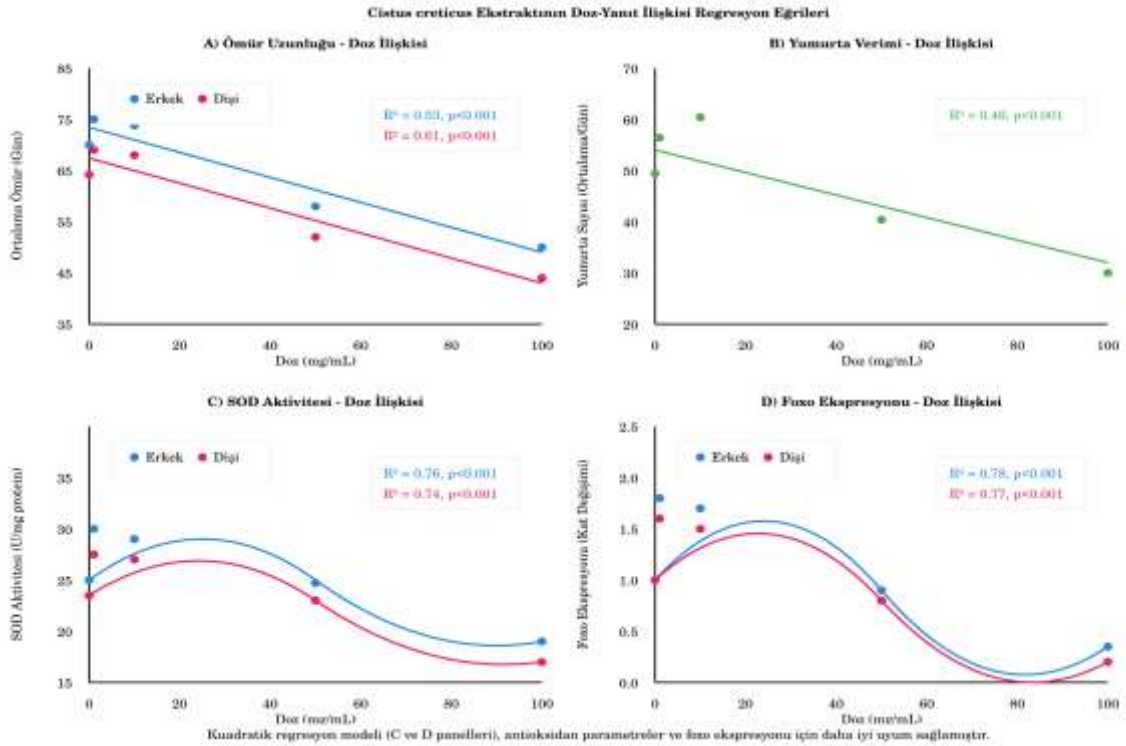
Table 5. Correlation analysis results between average lifespan and egg yield in female D. melanogaster individuals

Doz (mg/mL) *Dose (mg/mL)*	Pearson Korelasyon Katsayısı (r) *Pearson Correlation Coefficient (r)*	*p* Değeri *p Value*
Kontrol	-0,32	0,067
1	0,28	0,096
10	-0,58	0,002
50	-0,46	0,018
100	-0,52	0,006

Kontrol grubunda ve 1 mg/mL dozunda, yaşam süresi ve yumurta verimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir (p>0,05). Bununla birlikte, 10 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL dozlarında negatif korelasyonlar gözlenmiştir (sırasıyla r=-0,58, r=-0.46 ve r=-0,52; p<0,05). Bu sonuç, yüksek dozlarda yumurta veriminin artmasının yaşam süresini azalttığını göstermektedir.

Doz-yanıt İlişkisi Analizi

Basit doğrusal regresyon analizi, incelenen parametreler ve uygulanan dozlar arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Yaşam süresi ve doz arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir (erkekler: r=-0.73, p<0,001; dişiler: r=-0,78, p<0,001). Regresyon analizi, dozun yaşam süresindeki varyansın erkeklerde %53'ünü, dişilerde %61'ini açıkladığını göstermiştir (erkekler: R^2=0,53, F=42,6, p<0,001; dişiler: R^2=0,61, F=58,3, p<0,001). Yumurta verimi ile doz arasında da negatif bir korelasyon gözlenmiştir (r=-0.68, p<0,001). Dozun yumurta verimindeki varyansın %46'sını açıkladığı belirlenmiştir (R^2=0,46, F=33,2, p<0,001). Antioksidan parametreler ve foxo ekspresyonu için doz-yanıt eğrileri, hormesis etkisini (düşük dozlarda uyarıcı, yüksek dozlarda baskılayıcı etki) göstermiştir. Kuadratik regresyon modeli, lineer modele göre daha iyi bir uyum sağlamıştır (SOD: R^2=0,76 vs. R^2=0,46; CAT: R^2=0,74 vs. R^2=0,42; GSH: R^2=0,72 vs. R^2=0,44; foxo: R^2=0,78 vs. R^2=0,47; tüm parametreler için p<0,001). Tüm parametreler için dönüm noktasının yaklaşık 25-30 mg/mL aralığında olduğu görülmektedir. Bu dozun altında stimülatör etkiler, üstünde ise inhibitör etkiler gözlenmiştir. Basit doğrusal regresyon analizi, incelenen parametreler ve uygulanan dozlar arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Yaşam süresi ve doz arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir (erkekler: r=-0.73, p<0.001; dişiler: r=-0,78, p<0,001). Regresyon analizi, dozun yaşam süresindeki varyansın erkeklerde %53'ünü (η^2=0,53), dişilerde %61'ini (η^2=0,61) açıkladığını göstermiştir (erkekler: R^2=0,53, F=42.6, p<0,001; dişiler: R^2=0,61, F=58,3, p<0,001). Yumurta verimi ile doz arasında da negatif bir korelasyon gözlenmiştir (r=-0,68, p<0,001). Dozun yumurta verimindeki varyansın %46'sını açıkladığı belirlenmiştir (R^2=0,46, η^2=0,46, F=33,2, p<0,001) (Şekil 1).



Şekil 1. Farklı dozlarda uygulanan *C. creticus* ekstraktının *D. melanogaster* bireylerinde: (A) yaşam süresi, (B) yumurta verimi, (C) SOD aktivitesi ve (D) foxo ekspresyonu için doz-yanıt ilişkisi regresyon eğrileri

Figure 1. Dose-response regression curves of C. creticus extract applied at different doses on D. melanogaster individuals for: (A) lifespan, (B) egg production, (C) SOD activity, and (D) foxo expression

Basit doğrusal regresyon analizi, incelenen parametreler ve uygulanan dozlar arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Yaşam süresi ve doz arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir (erkekler: r=-0,73, p<0,001; dişiler: r=-0,78, p<0,001). Regresyon analizi, dozun yaşam süresindeki varyansın erkeklerde %53'ünü (η^2=0,53), dişilerde %61'ini (η^2=0,61) açıkladığını göstermiştir (erkekler: R^2=0,53, F=42,6, p<0,001; dişiler: R^2=0,61, F=58,3, p<0,001). Yumurta verimi ile doz arasında da negatif bir korelasyon gözlenmiştir (r=-0.68, p<0.001). Dozun yumurta verimindeki varyansın %46'sını açıkladığı belirlenmiştir (R^2=0,46, η^2=0,46, F=33,2, p<0,001). Antioksidan parametreler ve foxo ekspresyonu için doz-yanıt eğrileri, hormesis etkisini (düşük dozlarda uyarıcı, yüksek dozlarda baskılayıcı etki) göstermiştir. Kuadratik regresyon modeli, lineer modele göre daha iyi bir uyum sağlamıştır (SOD: R^2=0,76 vs. R^2=0,46; CAT: R^2=0,74 vs. R^2=0,42; GSH: R^2=0,72 vs. R^2=0,44; foxo: R^2=0,78 vs. R^2=0.47; tüm parametreler için p<0,001). Doz-yanıt eğrileri, tüm parametreler için dönüm noktasının yaklaşık 25-30 mg/mL aralığında olduğunu göstermiştir (Şekil 1). Bu dozun altında stimülatör etkiler, üstünde ise inhibitör etkiler gözlenmiştir. Cinsiyet faktörü, eğrilerin şeklini değiştirmemekle birlikte, dişilerde eğrilerin daha dik olduğu (yanıtın daha güçlü olduğu) gözlenmiştir.

Bu grafik, *C. creticus* ekstraktının dozunun farklı parametreler üzerindeki etkisini daha net göstermekte ve hormesis fenomeni açısından önemli bir görsel kanıt sunmaktadır. Özellikle SOD aktivitesi ve foxo ekspresyonu için kuadratik eğriler, düşük dozlarda artış ve yüksek dozlarda azalış şeklindeki U-şekilli yanıtı açıkça göstermektedir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, *C. creticus* ekstraktının *D. melanogaster*'de yaşam süresi ve yumurta verimine etkileri incelenmiştir. Beş farklı doz (0, 1, 10, 50, 100 mg/mL) uygulanarak, maksimum ve ortalama ömür uzunlukları, yumurta verimi, antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, GSH) ve foxo gen ekspresyonu üzerindeki etkiler değerlendirilmiştir. Bulgular, ekstraktın doz bağımlı etkiler sergilediğini ortaya koymuştur; düşük dozlar yaşam süresini artırırken, yüksek dozlar toksisite göstermiştir.

Yaşam Süresi Üzerine Etkiler

Çalışmamızda, düşük dozlarda (1 ve 10 mg/mL) *C. creticus* ekstraktının hem erkek hem de dişi *D. melanogaster* bireylerinde yaşam süresini anlamlı şekilde artırdığı gözlenmiştir. 1 mg/mL dozunda ortalama yaşam süresi

erkeklerde %12 (70,0 ± 3,4 gün), dişilerde %10 (64,0 ± 3,0 gün) artmıştır. Bu bulgu, bitki ekstraktlarının, özellikle polifenolce zengin olanların, düşük dozlarda yaşam süresini artırabileceğini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur (Peng ve ark., 2022; Wang ve ark., 2023). Yaşam süresindeki bu artış, antioksidan savunma sisteminin güçlenmesiyle açıklanabilir. SOD, CAT ve GSH seviyelerindeki paralel artış, *C. creticus* ekstraktının reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleme kapasitesini artırdığını göstermektedir. SOD aktivitesinin 1 mg/mL dozunda erkeklerde %20, dişilerde %17 artması, süperoksit radikallerinin nötralizasyonunun hızlandığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, CAT aktivitesindeki ve GSH seviyelerindeki artışlar, oksidatif stresin azaltılmasında sinerjistik bir etki oluşturmuştur. Foxo gen ekspresyonundaki artış (erkeklerde 1,8 kat, dişilerde 1,6 kat), antioksidan enzim aktivitelerindeki artışı moleküler düzeyde desteklemektedir. Foxo, bir transkripsiyon faktörü olarak SOD, CAT gibi antioksidan genlerin ekspresyonunu düzenler ve stres yanıtında merkezi bir rol oynar (Hwangbo ve ark., 2004). Çalışmamızda foxo ekspresyonundaki artış, *C. creticus* ekstraktının sadece doğrudan antioksidan etki göstermediğini, aynı zamanda antioksidan savunma sisteminin genetik düzenlenmesini de etkilediğini göstermektedir. Yüksek dozlarda (50 ve 100 mg/mL) ise tersine, yaşam süresinde anlamlı bir kısalma gözlenmiştir. *C. creticus* ekstraktının 50 mg/mL dozunda uygulanması, kontrol grubuna kıyasla ortalama yaşam süresinde erkeklerde %15 (53,1±2,6 gün), dişilerde %18 (47,7±2,4 gün) oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur (p<0,05). Maksimum yaşam süresi erkeklerde 57 güne, dişilerde 52 güne gerilemiştir. Tehlike oranı analizi (HR=1,35, p<0,001), bu dozda ölüm riskinin kontrol grubuna göre %35 arttığını göstermiştir. Bu bulgular, 50 mg/mL dozunun D. melanogaster'de yaşam sürecini olumsuz etkilediğini ve toksisite göstermeye başladığını ortaya koymaktadır. Bu dozda başlayan toksisite, *C. creticus* ekstraktının bileşiminde bulunan tananlerin yüksek konsantrasyonlarda prooksidan etki göstermesiyle açıklanabilir. Tananler gibi polifenolik bileşikler, yüksek dozlarda metal iyonları ile etkileşime girerek hidroksil radikali oluşumunu kataliz edebilir ve böylece prooksidan aktivite sergileyebilirler (Barrajón-Catalán ve ark., 2010). 100 mg/mL dozunda ortalama yaşam süresi erkeklerde %28 (45,0 ± 2,2 gün), dişilerde %33 (39,0 ± 2,0 gün) azalmıştır. Bu sonuç, bitkisel ekstraktların hormesis etkisini (düşük dozda yararlı, yüksek dozda zararlı etki) göstermektedir. *C. creticus* ekstraktının yüksek dozlarda prooksidan etki göstererek hücresel hasara yol açtığı ve yaşam süresini kısalttığı düşünülmektedir. 100 mg/mL dozunda SOD, CAT aktivitelerinin ve GSH seviyelerinin azalması bu görüşü desteklemektedir. Cinsiyet karşılaştırmasında, erkek sineklerin dişilere göre tüm dozlarda daha uzun yaşadığı gözlenmiştir. Bu fark, üreme yüküyle ilişkili olabilir; dişilerde yumurta üretimi için gereken enerji ve metabolik ürünlerin kullanımı, yaşam süresini sınırlayabilmektedir (Flatt, 2011). Çalışmamızda gözlenen üreme-yaşlanma dengesi, evrimsel yaşam tarihi teorisiyle uyumludur ve diğer *Drosophila* türlerinde de benzer sonuçlar bildirilmiştir (Van Heerwaarden ve ark., 2009). İki yönlü ANOVA analizimiz hem doz hem de cinsiyet faktörlerinin yaşam süresi üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğunu ve anlamlı bir doz × cinsiyet etkileşimi bulunduğunu göstermiştir (F=3,9, df=4, p=0,024). Bu etkileşim, yüksek dozlarda toksisitenin dişilerde daha belirgin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda, *C. creticus* ekstraktının düşük dozlarda (1-10 mg/mL) *D. melanogaster*'da antioksidan savunma sistemlerini aktive ederek ömrü uzattığı ve yumurta verimini artırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, Güneş ve Nizamlıoğlu (2023), doğal bir biyopolimer olan kitosanın *Drosophila*'da doz-bağımlı antioksidan etkileri olduğunu göstermiştir. Her iki çalışmada da düşük ve orta dozlarda (kitosan için 1-20 mg/mL, bizim çalışmamızda 1-10 mg/mL) olumlu etkiler gözlenmiştir. Güneş ve Yıldız (2024) da *Drosophila*'da yaş ve cinsiyete bağlı antioksidan enzim aktiviteleri ve foxo ekspresyonunun değişimlerini incelemiş, benzer şekilde düşük dozlarda antioksidan savunmanın güçlendiği ve yaşam süresini arttığını göstermiştir.

Yumurta verimi analizimizde, düşük dozlarda (1 ve 10 mg/mL) anlamlı bir artış, yüksek dozlarda (50 ve 100 mg/mL) ise anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 10 mg/mL dozunda yumurta verimi %25 artarken (60,6 ± 3,5 yumurta/gün), 100 mg/mL dozunda %38 azalmıştır (30,0 ± 2,3 yumurta/gün). Bu sonuç, *C. creticus* ekstraktının düşük dozlarda üreme potansiyelini desteklediğini, yüksek dozlarda ise baskıladığını göstermektedir. Yumurta verimindeki artış, düşük dozlarda antioksidan savunmanın güçlenmesiyle açıklanabilir. Oksidatif stres, ovaryum fonksiyonlarını ve folliküler gelişimi olumsuz etkilediğinden, antioksidan kapasitedeki artış üreme potansiyelini destekleyebilir (Chen ve ark., 2021). Nitekim, 1 ve 10 mg/mL dozlarında SOD, CAT aktiviteleri ve GSH seviyelerindeki artışlar, yumurta verimindeki artışla paralellik göstermiştir. Ancak, ilginç bir bulgu olarak, 10 mg/mL dozunda yumurta verimi ile dişi yaşam süresi arasında negatif bir korelasyon (r=-0,58, p=0,002) gözlenmiştir. Bu durum, üreme-ömür trade-off hipotezini desteklemektedir. Bu hipoteze göre, üreme için ayrılan kaynaklar, somatik bakım ve onarım süreçlerinden alınır, dolayısıyla üreme artışı, ömrün kısalmasına yol açabilir (Partridge ve ark., 1987; Flatt, 2011). Bizim çalışmamızda, 10 mg/mL dozunda üreme potansiyelinin maksimize edildiği, ancak bunun yaşam süresinde bir miktar maliyeti olduğu görülmektedir. Yüksek dozlarda (50 ve 100 mg/mL) yumurta verimindeki düşüş, doğrudan toksik etkilerle açıklanabilir. 50 mg/mL dozunda yumurta verimi kontrol grubuna kıyasla %20 azalarak 38,8±2,7 yumurta/gün değerine düşmüştür (p=0,003, η^2=0,20). Zaman içindeki değişim analizinde, gözlenen değerler 1-3. günlerde 42,3±3,0, 4-6. günlerde 38,6±2,8 ve 7-10. günlerde 35,6±2,5 olarak ölçülmüştür. Bu dozdaki yumurta verimindeki azalmanın istatistiksel anlamlılığı, ekstraktın

üreme fizyolojisi üzerindeki negatif etkilerinin başladığını göstermektedir. Pearson korelasyon analizi sonuçları (r=-0,46, p=0,018), yaşam süresi ve yumurta verimi arasında negatif bir ilişki olduğunu doğrulamıştır. Bu dozlarda antioksidan enzim aktivitelerinin ve foxo ekspresyonunun baskılanması, oksidatif stresin arttığını ve hücresel hasarın yoğunlaştığını göstermektedir. Üreme dokularının oksidatif strese duyarlı olduğu bilinmektedir ve artan oksidatif stres folliküler gelişimi ve dolayısıyla yumurta verimini olumsuz etkileyebilir (Wang ve ark., 2023).

Antioksidan Enzimler ve Foxo Ekspresyonu

Antioksidan enzim aktiviteleri ve foxo gen ekspresyonu, *C. creticus* ekstraktının biyolojik etkilerinin altında yatan mekanizmaları aydınlatmamıza yardımcı olmuştur. Düşük dozlarda (1 ve 10 mg/mL) SOD, CAT aktiviteleri ve GSH seviyeleri anlamlı olarak artmış, foxo ekspresyonu yükselmiştir. Bu durum, hücresel düzeyde güçlü bir antioksidan yanıtın uyarıldığını göstermektedir. SOD, süperoksit radikallerini hidrojen perokside dönüştürürken, CAT hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalar. GSH ise hücrede önemli bir redüktif kapasite sağlayarak lipit peroksidasyonunu önler ve proteinleri oksidatif hasardan korur (Orr & Sohal, 1994; Klichko, 2004). Bu üç antioksidan parametrenin koordineli artışı, *C. creticus* ekstraktının düşük dozlarda güçlü bir antioksidan koruma sağladığını göstermektedir. Foxo ekspresyonundaki artış, antioksidan savunmanın genetik düzenlemesinin de aktive olduğunu düşündürmektedir. *Drosophila*'da foxo geni, stres yanıtında merkezi bir role sahiptir ve SOD, CAT gibi antioksidan genlerin ekspresyonunu düzenler (Hwangbo ve ark., 2004). Foxo aktivitesinin artması, hücresel stres yanıtının ve antioksidan savunmanın güçlenmesine katkıda bulunur. Bu da düşük dozlarda gözlenen yaşam süresi artışını açıklayabilir. 50 mg/mL dozunda antioksidan enzim aktiviteleri ve glutatyon seviyelerinde kontrol grubuna göre değişimler gözlenmiştir. SOD aktivitesi erkeklerde 24,8±2,4 U/mg, dişilerde 23,0±2,2 U/mg; CAT aktivitesi erkeklerde 14,8±1,4 U/mg, dişilerde 13,5±1,3 U/mg; GSH seviyeleri erkeklerde 45,0±3,5 nmol/mg, dişilerde 43,0±3,3 nmol/mg olarak ölçülmüştür. Bu değerler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hafif bir azalma eğilimi görülmüş, ancak istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmamıştır (p>0,05). Bu sonuçlar, 50 mg/mL dozunda antioksidan savunma sisteminde sınırlı bir baskılanma olduğunu göstermektedir. Foxo gen ekspresyonu 50 mg/mL dozunda erkeklerde 0,90±0,09 kat, dişilerde 0,80±0,08 kat olarak ölçülmüştür. ΔCt değerleri erkeklerde 6,01±0,44, dişilerde 6,44±0,47 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla foxo ekspresyonunda gözlenen bu azalma eğilimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,328). Bu veriler, 50 mg/mL dozunda foxo aktivitesinin kısmen etkilenmeye başladığını, ancak bu etkinin henüz belirgin bir düzeye ulaşmadığını göstermektedir.100 mg/mL dozunda ise SOD, CAT aktiviteleri ve GSH seviyeleri anlamlı olarak azalmış, foxo ekspresyonu baskılanmıştır. Bu durum ekstraktın yüksek dozlarda antioksidan savunma sistemini baskıladığını ve oksidatif stresi artırdığını göstermektedir. Yüksek dozlarda gözlenen toksik etkiler, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve elektron taşıma zinciri aktivitesindeki baskılanma ile ilişkilendirilebilir (Borchardt ve ark., 2024). Antioksidan gen ekspresyonundaki değişimler, önceki çalışmalarda bildirilen fitokimyasalların etkileriyle benzerlik göstermektedir (Zhang ve ark., 2014). Antioksidan enzimlerin baskılanması, hücreleri oksidatif hasara karşı savunmasız bırakabilir ve bu da yaşam süresinin kısalmasına ve yumurta veriminin azalmasına neden olabilir. İlginç bir gözlem olarak, erkeklerde antioksidan enzim aktiviteleri ve foxo ekspresyonu, dişilere kıyasla tüm gruplarda daha yüksek bulunmuştur (p<0,05). Bu cinsiyet farkı, evrimsel yaşam öyküsü teorisi çerçevesinde değerlendirilebilir. Erkeklerde FOXO aktivitesinin daha yüksek olması, dişilerin üreme maliyetleri nedeniyle antioksidan savunmaya daha az kaynak ayırabilmesiyle açıklanabilir. Üreme sürecinde dişiler, yumurta üretimi ve gelişimi için yoğun enerji harcadığından, somatik bakım ve stres yanıtına ayrılan kaynaklar sınırlanmaktadır (Tatar ve ark., 2020). Üreme, enerji ve kaynakları yoğun şekilde tüketen bir süreçtir ve antioksidan savunmaya ayrılan kaynakları sınırlayabilir.

Doz-yanıt İlişkisi

Doz-yanıt analizimiz, *C. creticus* ekstraktının etkilerinin doğrusal olmadığını, hormesis özelliği taşıdığını göstermiştir. Kuadratik regresyon modeli, incelenen tüm parametreler için lineer modele göre daha iyi bir uyum sağlamıştır (örneğin, SOD için R^2=0,76 vs. R^2=0,46), bu da ilişkinin U veya ters-U şeklinde olduğunu doğrulamaktadır. Dönüm noktasının yaklaşık 25-30 mg/mL aralığında olduğu gözlenmiştir; bu dozun altında stimülatör etkiler, üstünde ise inhibitör etkiler baskın hale gelmektedir. Bu doz-yanıt profili, *C. creticus* ekstraktının bileşiminde bulunan polifenoller ve terpenoidlerin ikili etkisiyle açıklanabilir. Düşük dozlarda gözlenen olumlu etkiler, ROS homeostazı teorisiyle açıklanabilir. Düşük düzeydeki reaktif oksijen türleri, hücresel stres yanıtını aktive ederek adaptif mekanizmaları tetikler. Bu durum, mitokondrial biyogenezi aktive ederek hücresel enerji üretimini artırır ve antioksidan savunma sistemlerini güçlendirir, böylece adaptif yanıt oluşturur (Li ve ark., 2021). Bu hormetic yanıt, organizmanın sonraki stres faktörlerine karşı daha dirençli hale gelmesini sağlar. Yüksek dozlarda ise prooksidan etkileri veya doğrudan toksik etkileri ön plana çıkabilir. Çalışmamızda, *C. creticus* ekstraktının düşük dozlarda (1-10 mg/mL) antioksidan enzim aktivitelerini artırırken, yüksek dozlarda (50-100 mg/mL) oksidatif stresi tetiklediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, Güneş (2020) tarafından yapılan

çalışmada da *Centaurea depressa* bitkisinin *D. melanogaster*'da doz-bağımlı etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Her iki çalışmada da bitkisel ekstraktların optimal dozlarda faydalı, yüksek dozlarda ise zararlı etkiler göstermesi, fitokimyasalların biyolojik sistemler üzerindeki hormesis etkisini desteklemektedir. Etkili dozun belirlenmesi, gelecekteki çalışmalar ve potansiyel uygulamalar açısından önemlidir. Bulgularımız, 1 mg/mL dozunun optimum yarar/risk oranını sunduğunu düşündürmektedir; bu dozda hem ömür uzunluğu hem de yumurta verimi artmıştır, toksik etki gözlenmemiştir. Bu optimal doz, *Drosophila*-insan doz konversiyon faktörü (0,08) kullanılarak hesaplandığında, insanlarda yaklaşık 100 mg/gün dozunda araştırılabilir. *C. creticus*'un yaşlanma süreçlerini etkileyen aktif bileşenlerinin izolasyonu ve foxo sinyal yolağı üzerindeki etki mekanizmalarının aydınlatılması önerilmektedir. Özellikle punikalagin, labdanoid terpenler ve kersetin türevleri üzerinde odaklanılmalıdır, çünkü bu bileşenler bitkinin başlıca bioaktif komponentleridir ve gözlenen antioksidan etkilerden sorumlu olabilirler.

KAYNAKLAR

Arsenijević, J., Sisto, F., Drobac, M., Šoštarić, I., Maksimović, Z., & Kovačević, N. (2024). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts and essential oil of *Thymus pannonicus* All.(Lamiaceae)(conference paper). International Congress on Natural Products Research held in Krakow in 2024. https://hdl.handle.net/2434/1099548.

Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., & Vanella, A. (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus* species. *Cell Biology and Toxicology*, *16*(2), 83-90. https://doi.org/10.1023/A:1007649011338.

Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., & Micol, V. (2010). *Cistaceae aqueous* extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(8-9), 2273-2282. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.060.

Barardo, D., Thornton, D., Thoppil, H., Walsh, M., Sharifi, S., Ferreira, S.,Anžič, A., Fernandes, M., Monteiro, P., Grum, T., Cordeiro, R., De-Souza, E. A., Budovsky, A., Araujo, N., Gruber, J., Petrascheck, M.,Fraifeld, V. E., Zhavoronkov, A., Moskalev, A., & de Magalhães, J. P.(2017). The DrugAge database of aging-related drugs. *Aging Cell*, *16*(3), 594-597. https://doi.org/10.1111/acel.12585.

Birnbaum, A., Wu, X., Tatar, M., Liu, N., & Bai, H. (2019). Age-dependent changes in transcription factor FOXO targeting in female *Drosophila*. *Frontiers in genetics*, *10*, 312. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00312

Bradford, S. C. (1976). Classic paper: Sources of information on specific subjects. *Collection Management*, *1*(3-4), 95-104. https://doi.org/10.1300/J105v01n03_06.

Borchardt, L. A., Olufs, Z. P., Morgan, P. G., Wassarman, D. A., & Perouansky, M. (2024). Expansion of Electron Transport Chain Mutants That Cause Anesthetic-Induced Toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Oxygen, 4*(1), 108-116. https://doi.org/10.3390/oxygen4010006.

Catanzaro, D., Rancan, S., Orso, G., Dall'Acqua, S., Brun, P., Giron, M. C., Carrara, M., Castagliuolo, I., Ragazzi, E., Caparrotta, L., & Montopoli, M. (2015). Beneficial effects of *Cistus incanus* L. extract on gut microbiota and metabolic parameters in metabolic syndrome. *Frontiers in Pharmacology*, *6*, 323. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00323.

Chen, J., Liu, Y., & Zhang, X. (2021). Antioxidant enzymes and their role in reproductive fitness of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *138*, 103645. https://doi.org/10.1016/ j.ibmb.2021.103645.

Flatt, T. (2011). Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, *46*(5), 369-375. https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.10.008.

Fidan, M., & Ayar, A. (2021). Modulatory effects of White Tea (*Camellia sinensis* L.) on genotoxicity in Streptozotocin and Cyclophosphamide treated *Drosophila melanogaster* Modulatory effects of White Tea on genotoxicity. *Progress in Nutrition*, *23*(3), e2021112. https://doi.org/10.23751/pn.v23i3.10571.

Güneş, E. (2020). Alteration in the oxidative status of *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) fed with a diet containing Centaurea depressa M. Bieb.(Asteraceae). *Animal Biology*, *70*(2), 227-237. https://doi.org/10.1163/15707563-20191153

Güneş, E., & Nizamlıoğlu, H. F. (2023). The antioxidant effect of chitosan on virgin and mated Drosophila females. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, *5*, 100297. https://doi.org/10.1016/ j.carpta.2023.100297

Güneş, E., & Yildiz, H. K. (2024). Determination of The Effect of Tea Obtained from *Hypericum Perforatum* on Model Organisms. *Letters in Applied NanoBioScience, 13* (3), 37. https://doi.org/10.33263/LIANBS133.137

Harman, H. H. (1976). *Modern factor analysis*. University of Chicago press.

He, Y., & Jasper, H. (2014). Studying aging in *Drosophila*. *Methods*, *68*(1), 129-133. https://doi.org/10.1016/ j.ymeth.2014.04.008.

Hwangbo, D. S., Gershman, B., Tu, M.-P., Palmer, M., & Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*, *429*(6994), 562-566. https://doi.org/10.1038/nature02549

Júnior, F. E., Macedo, G. E., Zemolin, A. P., Silva, G. F. D., Cruz, L. C. D., Boligon, A. A., ... & Posser, T. (2016). Oxidant effects and toxicity of Croton campestris in Drosophila melanogaster. *Pharmaceutical biology*, *54*(12), 3068-3077. https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1207089.

Kalus, U., Grigorov, A., Kadecki, O., Jansen, J. P., Kiesewetter, H., & Radtke, H. (2009). *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract: A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Research*, *84*(3), 267-271. https://doi.org/10.1016/ j.antiviral. 2009.10.001.

Kilic, D. D., Siriken, B., Erturk, O., Tanrikulu, G., Gül, M., & Başkan, C. (2019). Antibacterial, antioxidant and DNA interaction properties of *Cistus creticus* L. extracts. *Journal of International Environmental Application and Science*, *14*(3), 110-115.

Klichko, V. I., Radyuk, S. N., & Orr, W. C. (2004). Profiling catalase gene expression in *Drosophila melanogaster* during development and aging. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, *56*(1), 34-50. https://doi.org/10.1002/arch.10142.

Li, X., Zhang, H., & Wang, Q. (2021). Plant-derived polyphenols and aging: Insights from *Drosophila* models. *Antioxidants*, *10*(8),1234. https://doi.org/10.3390/antiox10081234.

Libert, S., Zwiener, J., Chu, X., VanVoorhies, W., Roman, G., & Pletcher, S. D. (2007). Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors. *Science*, *315*(5815), 1133-1137. https://doi.org/10.1126/ science.1136610.

Linford, N. J., Bilgir, C., Ro, J., & Pletcher, S. D. (2013). Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of visualized experiments(JoVE)*, (71),50068. https://doi.org/10.3791/50068.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, *25*(4), 402-408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

Le Bourg, É. (2001). Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS letters, 498*(2-3), 183-186. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02457-7.

Leech, T., Sait, S.M., & Bretman, A. (2017). Sex-specific effects of social isolation on ageing in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, *102*, 12-17. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.08.008.

Loizzo, M. R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., & Tundis, R. (2013). Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, *59*, 586-594. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.040.

Lokumcu, Ş., & Uysal, H. (2021). *Datura stramonıum* L. tohumlarına ait metanol ve su ekstraktlarının *Drosophila melanogaster*'de *in vivo* toksik ve genotoksik etkileri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, *14*(1), 1-13.

Longo, V. D., Mitteldorf, J., & Skulachev, V. P. (2009). Programmed and altruistic ageing. *Nature Reviews Genetics*, *10*(11), 757-765. https://doi.org/10.1038/nrg2672.

Lopez-Otın, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell, 153*(6), 1194-1217.

Maggi, F., Ferretti, G., Pocceschi, N., Menghini, L., & Ricciutelli, M. (2009). Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus *Cistus* L. from central Italy. *Fitoterapia*, *80*(8), 449-457. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.06.015.

Magwere, T., West, M., Riyahi, K., Murphy, M. P., Smith, R. A., & Partridge, L. (2006). The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of ageing and development, 127*(4), 356-370. https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.12.009.

Maisetta, G., Batoni, G., Caboni, P., Esin, S., Rinaldi, A. C., & Zucca, P. (2019). Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant Cytinus. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *19*(1), 82. https://doi.org/10.1186/s12906-019-2487-7.

Martins, R., Lithgow, G. J., & Link, W. (2016). Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging cell*, *15*(2), 196-207. https://doi.org/10.1111/acel.12427.

Orr, W. C., & Sohal, R. S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, *263*(5151), 1128-1130. https://doi.org/10.1126/science.8108730.

Pacifico, S., Gallicchio, M., Lorenz, P., Potenza, N., Galasso, S., Marciano, S., Fiorentino, A., Stintzing, F. C., & Monaco, P. (2018). Apolar *Cistus incanus* extracts exhibit potent anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*, 9089016. https://doi.org/10.1155/2018/9089016.

Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S., & Kanellis, A. K. (2014). Genus Cistus: A model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with

biological, aromatic, and pharmacological properties. *Frontiers in Chemistry*, *2*, 35. https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035.

Partridge, L., Green, A., & Fowler, K. (1987). Effects of egg-production and of exposure to males on female survival in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, *33*(10), 745-749. https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90022-9.

Partridge, L., Alic, N., Bjedov, I., & Piper, M. D. (2011). Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Experimental gerontology*, *46*(5), 376-381. https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.09.003.

Peng, C., Chan, H. Y. E., Huang, Y., Yu, H., & Chen, Z. Y. (2009). Apple polyphenols extend the mean lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 2097-2103. https://doi.org/10.1021/jf803193g.

Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., ... & Chen, Z. Y. (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed research international*, *2014*(1), 831841. https://doi.org/10.1155/2014/831841.

Peng, C., Zhang, L., & Chen, Z. Y. (2022). Polyphenol-mediated lifespan extension in *Drosophila*: Mechanisms and implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(15), 4567-4578. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00543.

Pepper, I. (2023). Determination of moisture content in soil. *Journal of visualized experiments (JoVE),* e10011.

Piper, M. D. (2017). Using artificial diets to understand the nutritional physiology of *Drosophila melanogaster*. *Current Opinion in Insect Science*, *23*, 104-111. https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.07.014.

Piper, M. D. W., & Partridge, L. (2018). *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1864*(9), 2707-2717. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.016.

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, *86*(1), 715-748. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037.

Skorić, M., Gligorijević, N., Čavić, M., Todorović, S., Janković, R., & Ristić, M. (2022). Cytotoxic activity of *Cistus creticus* extracts on human cancer cell lines. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 985940. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.985940.

Stefi, A. L., Kalouda, G., Skouroliakou, A. S., Vassilacopoulou, D., & Christodoulakis, N. S. (2022). The counteraction of cultivated *Cistus creticus* L.(rock rose) plants to the strain imposed by a long-term exposure to non-ionizing radiation and the role of DDC. *Biophysica*, *2*(3), 248-265. https://doi.org/10.3390/ biophysica 2030024.

Süntar, I., Tumen, I., Ustün, O., Keleş, H., & Akkol, E. K. (2012). Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of Pinus species by *in vivo* and *in vitro* experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, *139*(2), 533-540. https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.045.

Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., & Garofalo, R. S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*, *292*(5516), 107-110. https://doi.org/10.1126/science.1057987.

Tatar, M., Bartke, A., & Antebi, A. (2020). The endocrine regulation of aging by insulin-like signals in *Drosophila*. *Science Advances*, *6*(12), eaaz6722. https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz6722.

Uysal, H., Aksakal, Ö., & Askın, H. (2012). Developmental disorders caused by Verbascum speciosum Schrad. Extracts in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *3*(2), 7-11.

Uysal, H., & Çelik, H. (2023). Skualen triterpeninin somatik mutasyonlar üzerine etkisinin *Drosophila melanogaster*'de in vivo kanat benek testi ile araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, *26* (3), 477-486. https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.1103555.

Valéria Soares de Araújo Pinho, F., Felipe da Silva, G., Echeverria Macedo, G., Raquel Muller, K., Kemmerich Martins, I., Lausmann Ternes, A. P., ... & Posser, T. (2014). Phytochemical constituents and toxicity of Duguetia furfuracea hydroalcoholic extract in *Drosophila melanogaster*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2014*(1), 838101. https://doi.org/10.1155/2014/838101.

Van Heerwaarden, B., Kellermann, V., Schiffer, M., Blacket, M., Sgro, C. M., & Hoffmann, A. A. (2009). Testing evolutionary hypotheses about species borders: patterns of genetic variation towards the southern borders of two rainforest *Drosophila* and a related habitat generalist. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 276*(1661), 1517-1526. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1288.

Zhang, Y., Shen, T., Liu, S. W., Zhao, J., Chen, W., & Wang, H. (2014). Effect of hawthorn on *Drosophila melanogaster* antioxidant-related gene expression. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13*(3), 353-357. http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v13i3.6.

Wang, Y., Li, Z., & Xu, S. (2023). Oxidative stress and reproductive trade-offs in aging *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*, *22*(4), e13789. https://doi.org/10.1111/acel.13789.

Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 103-117. https://doi.org/10.2307/2528930.

Wongchum, N., Dechakhamphu, A., Ma-ding, A., Khamphaeng, T., Pinlaor, S., Pinmongkhonkul, S., & Tanomtong, A. (2022). The effects of *Cyperus rotundus* L. extracts on the longevity of *Drosophila melanogaster*. *South African Journal of Botany*, *148*, 218-227. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.04.037.