

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**YÜKSEK ŞEKER VE YÜKSEK KAFEİNİN *DROSOPHILA*
MELANOGASTER'DE DNA HASARI ve OKSİDATİF HASAR YARATMA
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şirin KÜÇÜKBENLİ

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HAZİRAN 2025
ANTALYA**

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK ŞEKER VE YÜKSEK KAFEİNİN *DROSOPHILA*
MELANOGASTER'DE DNA HASARI ve OKSİDATİF HASAR YARATMA
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Şirin KÜÇÜKBENLİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2025-6760 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2025

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

**YÜKSEK ŞEKER VE YÜKSEK KAFEİNİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE DNA
HASARI ve OKSİDATİF HASAR YARATMA POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şirin KÜÇÜKBENLİ

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez 14/07/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir

Prof. Dr. Bülent KAYA (Danışman)
Prof. Dr. Türker BİLGİN
Doç. Dr. Esra AYDEMİR

ÖZET

YÜKSEK ŞEKER VE YÜKSEK KAFEİNİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE DNA HASARI ve OKSİDATİF HASAR YARATMA POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Şirin KÜÇÜKBENLİ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent Kaya

Haziran 2025; 152 Sayfa

Son yıllarda Dünya genelinde ve özellikle Türkiye'de diyabet prevalansında önemli bir artış gözlemlenmektedir (WHO 2021). Bu artış, bireylerde hayati tehlikelere neden olurken, ekonomik açıdan da ülkelere büyük zarar vermektedir.

Diyabet, bireylerde kalp hastalıkları, böbrek yetmezliği, körlük ve uzuv kaybı gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olarak yaşam kalitesini düşürür ve ölüm riskini artırır (Global Burden of Disease 2021; Diabetes Collaborators 2023). Sürekli ilaç kullanımı, glukoz takibi ve komplikasyonlarla uğraşmak, bireyde hem psikolojik hem de ekonomik yük oluşturur (Seuring vd. 2015). Diyabetli bireylerde depresyon ve anksiyete sık görülen eşlik eden durumlardır (de Groot 2023). Toplumsal düzeyde diyabet, sağlık sistemleri üzerinde büyük bir mali yük yaratır; küresel sağlık harcamalarının yaklaşık %10'u diyabet ve komplikasyonlarına ayrılmaktadır (Uluslararası Diyabet Federasyonu 2024). Ayrıca iş gücü kaybı, erken emeklilik ve üretkenlik düşüşü ekonomik zararları büyötmektedir (Kurkela vd. 2021). Düşük ve orta gelirli ölkelerde sağlık hizmetlerine erişimde eşitsizlikleri artırarak yoksulluk döngüsünü besler (Parker vd. 2024). Yüksek şeker ile beslenme sonucunda meydana gelen oksidatif stresin insan sağlığı üzerinde nörotoksik etkilerinin olduğu bilinmektedir (Krawczyk 2023). Yaygın olarak kullanılan kafeinin Tip 2 diyabetli bireyler üzerindeki potansiyel toksisitesi hakkında bu çalışma ile birlikte literatüre yeni bilgiler ekleyerek konu kapsamında literatürdeki bilgilerin ileri taşınması hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan normal şeker Lewis besin ortamında bulunan şeker dozunu ifade etmektedir (Normal şeker; 11,7/128ml) Katları olan şeker miktarı bu miktarın katlarıdır. Kafein dozları mg/ml olarak verilmiştir ve K ile ifade edilmektedir (K: Kafein). Bu amaç doğrultusunda çalışmada, şeker ve kafeinin birlikte ve yalnız kafein kullanımının nörotoksik etkisi *in vivo* ortamda *Drosophila melanogaster* bireylerinin beyin hücrelerinde alkali tek hücre jel elektroforezi (KOMET) deneyi ile araştırılmıştır. Şeker ve kafein ile beslenme tercihi için *D. melanogaster* erginlerinde iki yönlü besine yönelim analizi gerçekleştirilmiştir. Hücresel oksidatif stres seviyesini değerlendirmek için toplam antioksidan ve oksidan seviyesinin (TAS/TOS) ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ergin beyinlerindeki sitotoksik miktarı, membran hasarından yola çıkarak hücre canlılık testi akridin Oranj değerlendirilmiştir. Ek olarak serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres ile lipidlerin bozunma durumunu ortaya koymak amacıyla lipid peroksidasyonu (LPO) araştırılmıştır. *Drosophila* beyin hücrelerinde gerçekleştirilen KOMET sonuçlarına göre NŞ 0,5K– 2XŞ 0,1K – 2XŞ 0,5K

konsantrasyonlarında DNA hasarının anlamlı bir şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir. Besine yönelim değerlendirme sonucuna göre bireyler larval evreden ergin hale kadar yüksek şekerle beslenmelerine rağmen deney düzeneğinde yine yüksek şekeri tercih ederken yüksek kafein dozlarından kaçınmışlardır. TAS/TOS analizinde Kontrol grubuna kıyasla NŞ 0,1K ve NŞ 0,5K konsantrasyonlarda antioksidan miktarı azalma göstermiştir. Oksidan seviyesinde ise anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Akridin oranj testine göre hücre ölümü kontrol grubuna oranla yüksek şeker uygulamalarında istatistiksel önemde arttığı gözlemlenmiştir. Konsantrasyonlar arası lipid peroksidasyonu için anlamlı bir fark gözlemlenmemekle beraber NŞ 0,5K konsantrasyonu kontrole kıyasla az miktarda farklılık göstermiştir.

Yüksek şeker ve yüksek kafein geniş doz aralıkları (NŞ 0,1K - NŞ 0,5K – NŞ 1K – NŞ 2K – 2XŞ 0,1K - 2XŞ 0,5K - 2XŞ 1K - 2XŞ 2K - 4XŞ 0,1K - 4XŞ 0,5K - 4XŞ 1K - 4XŞ 2K - 8XŞ 0,1K - 8XŞ 0,5K - 8XŞ 1K - 8XŞ 2K) kullanılarak *D.melanogaster*'de larval ağırlık, larval sürünme, pupa pozisyon, ergin ağırlık, negatif jeotaksis, ömür uzunluğu ve iki yönlü besin analizi olmak üzere yedi davranış parametrelerinde değerlendirilmiştir. İki yönlü besin analizi hariç diğer davranış deneyleri için 1. 3. ve 5. nesillerde ölçüm gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kontrole göre kıyaslanmıştır. İki yönlü besin analizi için dört doz (NŞ 0,1K – NŞ 0,5K – 2XŞ 0,1K – 2XŞ 0,5K) çalışılarak sonuçlar elde edilmiştir. Larval sürünme deneyinde nesiller ilerledikçe sürünme mesafesinin dozların artışına bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Larval ağırlık deneyinde ileri nesillere gidildikçe doz ilişkili olarak ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. Pupa pozisyon deneyinde doz maruziyeti ile nesiller ilerledikçe hem pupa oluşma sayısı azalırken hem de larvalar alt bölgelerde (D – E – BY) daha çok pupa oluşturmuştur. Negatif jeotaksis deneyi sonucunda ileri nesillerde doza bağlı uçan/tırmanan birey sayısı azaldığı belirlenmiştir. Ergin ağırlık deneyinde dişi ve erkek bireylerde ayrı ayrı ağırlık ölçümü gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda 5. nesil hariç diğer nesillerde dozla ilişkili olarak hem erkek hem dişi bireylerde ağırlık kaybı görülmüştür. 5. nesilde kontrol kıyasla yine azalmıştır fakat önceki nesillere oranla artış gözlemlenmiştir. Ömür uzunluğu deneyinde ise bireyler nesiller ilerledikçe 0,1K'nın şeker birlikteliklerinde ömür uzunluğunda artış gözlemlenirken diğer dozlar için yaşam sürelerinin kısaldığı gözlemlenmiştir. İki yönlü besin analizinde 3. larval evre bireyler ergin olana kadar 2 kat şekerle maruz kalmalarına rağmen besin tercihleri yine yüksek şekerli besinler olmuştur. Kafein yer alan besinleri tercih etmemişlerdir. İki kafein dozuna maruz kaldıklarında ise düşük doz kafeini tercih etmişlerdir.

ANAHTAR KELİMELEER: Akridin oranj, Besine yönelim deneyi, Davranış deneyleri, Komet, Lipid peroksidasyonu ve TAS/TOS, *Drosophila melanogaster*

JÜRİ : Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. Türker BİLGİN

Doç. Dr. Esra AYDEMİR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF HIGH SUGAR AND HIGH CAFFEINE TO INDUCE DNA DAMAGE AND OXIDATIVE STRESS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Şirin KÜÇÜKBENLİ

Master's Thesis, Department of Biology

Advisor: Prof. Dr. Bülent Kaya

June 2025; 152 Pages

In recent years, a significant increase in the global and especially national prevalence of diabetes has been observed (WHO 2021). This rise poses life-threatening risks to individuals while also imposing a considerable economic burden on countries.

Diabetes leads to severe health complications such as cardiovascular diseases, kidney failure, blindness, and limb loss, thereby reducing quality of life and increasing mortality risk (Global Burden of Disease 2021; Diabetes Collaborators 2023). Continuous medication use, glucose monitoring, and management of complications impose both psychological and economic burdens on individuals (Seuring et al. 2015). Depression and anxiety are frequently observed comorbid conditions in individuals with diabetes (de Groot 2023). At the societal level, diabetes imposes a substantial economic burden on healthcare systems; approximately 10% of global healthcare expenditures are allocated to diabetes and its complications (International Diabetes Federation 2024). Furthermore, loss of workforce, early retirement, and decreased productivity amplify the economic damages (Kurkela et al. 2021). In low- and middle-income countries, diabetes exacerbates inequities in access to healthcare, thereby perpetuating the cycle of poverty (Parker et al., 2024). It is known that oxidative stress resulting from high sugar intake exerts neurotoxic effects on human health (Krawczyk 2023).

This study aims to contribute novel insights to the literature regarding the potential toxicity of widely consumed caffeine in individuals with type 2 diabetes, thereby advancing the current state of knowledge on this topic. Within the scope of this research, “normal sugar” refers to the sugar dose present in the Lewis medium (Normal sugar; 11.7/128 ml), and the multiples of sugar correspond to multiples of this amount. Caffeine doses are expressed in mg/ml and denoted as K (K: Caffeine).

Accordingly, the study investigated the neurotoxic effects of combined sugar and caffeine intake, as well as caffeine alone, in vivo on the brain cells of *Drosophila melanogaster* using alkaline single-cell gel electrophoresis (COMET assay). To assess feeding preferences, a two-choice feeding orientation analysis was conducted on adult *D. melanogaster* following larval exposure. Cellular oxidative stress levels were evaluated by measuring total antioxidant and oxidant status (TAS/TOS). The cytotoxic effects on adult brains were assessed via acridine orange staining based on membrane integrity. Additionally, lipid peroxidation (LPO) was examined to determine lipid degradation caused by oxidative stress induced by free radicals.

According to the COMET assay results conducted on *Drosophila* brain cells, significant increases in DNA damage were observed at NŞ 0,5K - 2XŞ 0,1K, and 2XŞ 0,5K concentrations. The feeding orientation analysis revealed that, although individuals were raised on high-sugar diets from larval to adult stages, they continued to prefer high-sugar diets in the experimental setup while avoiding high caffeine doses. TAS/TOS analysis showed a decrease in antioxidant levels at NŞ 0,1K and NŞ 0,5K concentrations compared to the control group, while no significant change was observed in oxidant levels. Acridine orange testing indicated a statistically significant increase in cell death under high-sugar treatments compared to the control group. Although no significant differences in lipid peroxidation were detected between concentrations, the NŞ 0,5K concentration showed a slight difference compared to the control.

Using a wide dose range of high sugar and high caffeine combinations (NŞ 0.1K, NŞ 0.5K, NŞ 1K, NŞ 2K, 2XŞ 0.1K, 2XŞ 0.5K, 2XŞ 1K, 2XŞ 2K, 4XŞ 0.1K, 4XŞ 0.5K, 4XŞ 1K, 4XŞ 2K, 8XŞ 0.1K, 8XŞ 0.5K, 8XŞ 1K, 8XŞ 2K), seven behavioral parameters were evaluated in *Drosophila melanogaster*, including larval weight, larval crawling, pupation site selection, adult weight, negative geotaxis, lifespan, and two-choice feeding preference, except for the two-choice feeding assay, all other behavioral experiments were performed in the 1st, 3rd, and 5th generations, and the results were compared to the control group, for the two-choice feeding assay, four doses (NŞ 0.1K, NŞ 0.5K, 2XŞ 0.1K, 2XŞ 0.5K) were tested and the results were obtained accordingly, in the larval crawling assay, a dose-dependent decrease in crawling distance was observed as generations progressed, in the larval weight assay, a generation-related weight loss associated with dose was observed, in the pupation site selection assay, as dose exposure continued over generations, the number of pupae decreased, and larvae pupated more frequently in the lower zones (D, E, BY), in the negative geotaxis assay, a generational and dose-related decrease in the number of climbing/flying individuals was identified, in the adult weight assay, weights were measured separately for female and male individuals, results showed a dose-related decrease in weight in both sexes in all generations except the 5th, in the 5th generation, although weights remained lower compared to the control, an increase was observed compared to earlier generations, in the lifespan assay, while increased lifespan was observed in sugar-associated 0.1K groups over generations, other dose groups exhibited a reduction in survival, in the two-choice feeding assay, although the individuals were exposed to triple sugar concentrations, their preference remained for sugar-rich diets, and they avoided caffeine-containing foods, when exposed to two different caffeine doses, individuals preferred the lower caffeine dose.

KEYWORDS: Acridine orange, Behavioral experiments, Comet assay, *Drosophila melanogaster*, Food preference assay, Lipid peroxidation, TAS/TOS

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. Türker BİLGİN

Assoc. Prof. Dr. Esra AYDEMİR

ÖNSÖZ

Günümüzde rafine şeker ve kafein tüketiminin yaygınlaşması, küresel ölçekte önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (Gillespie vd 2023; Čizmarová vd 2025). Bu maddelerin bireysel fizyolojik sistemler üzerindeki etkilerinin yanı sıra, toplum sağlığı ve sağlık ekonomisi üzerinde de kayda değer etkileri olduğu bilinmektedir. Dünya genelinde 2021 yılı itibarıyla yaklaşık 537 milyon kişinin tip 2 diyabetle yaşadığı rapor edilmiştir (IDF Diabetes Atlas, 2021). Türkiye’de ise bu oran erişkin nüfusun yaklaşık %15’ini oluşturmaktadır (TÜİK, 2021). Diyabetin gelişiminde yüksek şeker tüketimi önemli bir çevresel etken olarak öne çıkmaktadır. Şeker, glukoz metabolizmasını bozmanın yanı sıra nörotoksik etkilere de yol açarak sinir hücrelerinin bütünlüğünü tehlikeye atmaktadır (Smith ve Jones, 2010). Kafein ise düşük dozlarda antioksidan etkiler gösterebilirken, yüksek dozlarda oksidatif stres üzerinden benzer nörotoksik etkiler oluşturabilmektedir (Brown, 2015). Şekerin fizyolojik yararları enerji metabolizması ile ilgilidir; beyin, vücuttaki glukozun %20’sini kullanarak sinirsel iletim faaliyetlerini sürdürmektedir (Sievenpiper 2016; Dienel 2018; Rae vd. 2024). Ancak, aşırı ve düzensiz tüketimle bu dengeler bozulmaktadır. Bu tez çalışmasında, hem yüksek şeker ve kafein kombinasyonlarının hem de yalnızca kafein maruziyetinin *D. melanogaster melanogaster* model organizmasında oluşturabileceği oksidatif hasar çok yönlü bir yaklaşımla değerlendirilmiştir. *D. melanogaster*, kısa yaşam döngüsü, genetik olarak iyi tanımlanmış yapısı ve insanla homolog biyokimyasal süreçlere sahip olması nedeniyle toksikoloji alanında güvenilir bir model organizmadır. Bu bağlamda gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, NŞ (normal şeker) 0,1K - 0,5K (Kafein) ve 2XŞ (iki kat şeker) 0,1K - 0,5K (kafein) kombinasyonlarının *D. melanogaster* bireylerinde oluşturacağı oksidatif hasar, moleküler ve fizyolojik parametrelerle değerlendirilmiştir.

Oksidatif stresin hücresel düzeyde yol açabileceği hasarın belirlenmesi amacıyla çeşitli analizler gerçekleştirilmiştir. KOMET testi, oksidatif stres kaynaklı DNA zincir kırıklıklarının varlığını ortaya koymak amacıyla kullanılmıştır. Lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelebilecek bozulmaları değerlendirmek ve aynı zamanda oksidatif stres düzeyini belirlemek amacıyla lipid peroksidasyon analizi yapılmıştır. Hücredeki oksidatif ve antioksidatif kapasitenin karşılaştırılması için TAS/TOS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. hücre ölümünün değerlendirilmesi amacıyla Akridin Oranj boyaması, seçici besin toksisitesinin belirlenmesi için ise iki yönlü besin analizi yapılmıştır.

Bu çalışma, yüksek şeker ve kafein maruziyetinin *D. melanogaster* modelindeki oksidatif hasar mekanizmalarını anlamayı ve Dünyadaki artan diyabet vakaları ile kafein alımının sağlık üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Elde edilen veriler, mevcut literatürdeki eksik bilgileri tamamlamaya yönelik önemli bulgular sunarak, bireylerin beslenme alışkanlıklarına ve sağlık politikalarına yönelik stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunmayı hedeflemektedir.

Bu tez çalışmasının hazırlanma sürecinde bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her zaman yapıcı eleştirileri ve akademik desteğiyle rehberlik eden saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Bülent Kaya’ya (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), bu süreçte bana çeşitli konularda destek olan katkılarını esirgemeyen Nuray

Kaya'ya (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), birlikte yürüttüğümüz çalışmalarda katkılarıyla süreci kolaylaştıran çalışma arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte en büyük teşekkür ise hiç kuşkusuz aileme aittir. Hayatım boyunca her zaman arkamda duran, sevgileri ve fedakârlıklarıyla bana güç veren biricik annem Ema Küçükbenli ve biricik babam Halil İbrahim Küçükbenli'nin üzerimdeki emekleri kelimelerle tarif edilemeyecek kadar kıymetlidir. Her zorlandığımda destekleriyle beni yeniden ayağa kaldıran, en küçük başarıımı bile coşkuyla kutlayan, neşeleriyle bana moral veren iki sevgili kardeşim Mehmet Küçükbenli ve Furkan Küçükbenli'ye sonsuz teşekkür ederim. Onların varlığı bu süreçte en büyük ilham ve dayanma kaynağım olmuştur. Varlığınız, inancınız ve sevginiz bu sürecin en büyük ilham kaynağı oldu. Hayatımın her alanında yanımda olan ve bana inanan aileme minnettarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	5
2.1. Tip 2 Diyabet	5
2.2. Hiperglisemi ile Serbest Radikal Oluşumu.....	6
2.3. Glukoz oto-oksidasyonu	6
2.4. Glikasyon	6
2.5. Poliyol.....	6
2.6. Diyabetin Dünya'daki yeri.....	7
2.7. Türkiye'de diyabet.....	8
2.8. Avrupa ülkelerinde diyabet verileri (2011-2021)	9
2.9. Tip 2 diyabet ekonomisi	10
2.10. Tip 2 diyabet ve <i>D. melanogaster</i>	10
2.11. <i>D. melanogaster</i> 'de IPC'leri düzenleyen faktörler	12
2.12. <i>D. melanogaster</i> insülin benzeri peptitlerin (DILP) üretim yerleri	13
2.13. Kafein	13
2.14. Kafein içeren gıdalar	13
2.15. Kafeinin etkileri.....	14
2.16. Kafeinin olumlu etkileri	15
2.17. Kafeinin olumsuz etkileri	15
2.18. Kafeinin nörotoksik etkileri.....	16
2.19. Günlük kullanımda kafein	17
2.20. Kafein metabolizması	17
2.21. Kafeinin Etkisi.....	19
2.22. Kafeinin yarılanma ömrü.....	20
2.23. Kafein mekanizması.....	21
2.24. Kafeinin farmakolojik etkileri.....	22

2.25. <i>D. melanogaster</i> ’de kafein mekanizması	22
3. MATERYAL – YÖNTEM.....	25
3.1. Kullanılan kimyasallar.....	25
3.2. Kullanılan cihazlar	26
3.3. Kullanılan kitler.....	27
3.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	27
3.5. <i>D. melanogaster</i> ’in yaşam döngüsü	29
3.6. <i>D. melanogaster</i> besiyeri hazırlanışı	32
3.7. Çalışılan dozların hazırlanması	32
3.8. <i>D. melanogaster</i> moleküler düzeyde Analizler	37
3.9. <i>D. melanogaster</i> tek hücre alkali jel elektroforez testi.....	37
3.10. Akridin Oranj /etidyum bromid ile hücre canlılığı ölçümü	40
3.11. Toplam antioksidan seviyesi /toplam oksidan seviyesi ölçülmesi	42
3.12. Tiyobarbitürik asit ile lipid peroksidasyonunun belirlenmesi.....	45
3.13. <i>Drosophila</i> ’da davranışsal parametrelerle nörotoksisite analizi	47
3.14. <i>Drosophila melanogaster</i> davranış deneylerinin değerlendirilmesi....	47
3.15. Larval sürünme deneyi.....	48
3.16. Larval sürünme (crawling) deneyi aşamaları.....	49
3.17. <i>D. melanogaster</i> larval ağırlık	49
3.18. Larval ağırlığın sinir sistemi gelişimine etkisi.....	50
3.19. Larval ağırlığın hareket davranışı üzerine etkisi.....	50
3.20. Gelişim üzerindeki etkileri.....	50
3.21. Larval ağırlık deneyi	51
3.22. <i>D. melanogaster</i> pupa pozisyon deneyi	51
3.23. Pupa pozisyon deneyi aşamaları	52
3.24. <i>D. melanogaster</i> ergin ağırlık ölçümü ve larval ağırlığa ek değeri.....	52
3.25. Ergin ağırlık deneyi aşamaları	53
3.26. <i>D. melanogaster</i> Negatif jeotaksis deneyi	54
3.27. Negatif jeotaksis deney yapılışı	55
3.28. <i>D. melanogaster</i> ömür uzunluğu deneyi.....	56
3.29. Ömür uzunluğu deney yapılışı.....	57
3.30. <i>D. melanogaster</i> iki yönlü besin analizi	57
4. BULGULAR	61
4.1. <i>D. melanogaster</i> moleküler çalışmalar	61

4.2. <i>D. melanogaster</i> beyin hücrelerinde tek hücre jel elektroforez testi	61
4.3. <i>D. melanogaster</i> beyin hücrelerinde TAS ve TOS ölçümü	63
4.4. <i>D. melanogaster</i> beyin hücrelerinde akridin oranj ölçümü	67
4.5. <i>D. melanogaster</i> beyin hücrelerinde lipid peroksidasyonu.....	68
4.6. <i>D. melanogaster</i> de gerçekleştirilen davranış deneyleri	69
4.7. <i>D. melanogaster</i> larval sürünme	69
4.7.1. Larval sürünme görüntüleri	73
4.8. <i>D. melanogaster</i> larval ağırlık	74
4.9. <i>D. melanogaster</i> pupa pozisyon deneyi.....	77
4.10. <i>D. melanogaster</i> negatif jeotaksis sonuçları.....	80
4.11. Ergin ağırlık sonuçları	83
4.12. <i>D. melanogaster</i> ömür uzunluğu sonuçları.....	86
4.13. <i>D. melanogaster</i> iki yönlü besin analizi	89
5. TARTIŞMA.....	95
6. SONUÇLAR.....	117
7. KAYNAKLAR.....	119
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yüksek Şeker ve Yüksek Kafeinin *Drosophila melanogaster*’de DNA Hasarı ve Oksidatif Hasar Yaratma Potansiyelinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

06/08/2025

Şirin KÜÇÜKBENLİ

İmza

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

± : Artı eksi

% : Yüzde

≤ : Küçük ve eşittir

~ : Yaklaşık

< : Büyüktür

> : Küçüktür

≥ : Büyük ve eşittir

μL : Mikrolitre

°C : Santigrat derece

cm : Santimetre

gr : Gram

mg : Miligram

ml : Mililitre

mm: mikrometre

nm : nanometre

Bu tezde ondalık yazım ayırıcı olarak nokta (,) kullanılmıştır.

Kısaltmalar

2XŞ : 2 kat şeker

4-HNE : 4-hidroksinonenal

4XŞ : 4 kat şeker

8XŞ : 8 kat Şeker

AGEs : ileri glikasyon ürünleri

AKH : Adipokinetik hormon

AO : Akridin Oranj

ATP : Adenozin trifosfat

BER : baz eksizyon tamiri

CA : Corpora Allata
Ca²⁺ : kalsiyum
Camp : Hücre içi ikincil habercidir
CAT : katalaz
CC : Corpora cardiaca
CYP450 : Sitokrom P450
DILP : *Drosophila* insülin benzeri peptit
DNA : Deoksiribonükleik asit
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
EB : Etidyum bromür
GABA : Gama aminobütirik asit
GLUT4 : Glukoz taşıyıcı tip 4
GRN : tat reseptör nöronları
GSH : glutatyon
IDF : Uluslararası Diyabet Federasyonu
ILP : İnsülin benzeri peptit
IPC : insülin üreten hücreler
IUGR : rahim içi büyüme
K : Kafein
KOMET : Alkali tek hücre jel elektroforezi (SCGE)
L1 : 1. Larval evre
LBW : düşük doğum ağırlığı
LMA : Düşük erime sıcaklığına sahip Agaroz
LPO : Lipid Peroksidasyonu
Lst : Limostatin hormonu
MDA : malondialdehit
MSS : merkezi sinir sistemi
Myo : myoglianin
NaCl : Sodyum klorür

NaOH : Sodyum klorür
NB : mavi abdomenli sinekler
NMA : Normal erime sıcaklığına sahip Agaroz
NP : mor abdomenli sinekler
NR : kırmızı abdomenli sinekler
NŞ : normal şeker
 O_2^- : süperoksit radikali
OSI : Oksidatif stres indeksi
P.I. : Yönelim İndeksi
PBS : Fosfat tamponu
Prx : peroksirredoksinler
ROS : Reaktif oksijen türleri
Snpf : Kısa nöropeptid F
Sod1 : sitoplazmik süperoksit dismutaz
Sod2 : mitokondriyal süperoksit dismutaz
SOG : subözofageal ganglion
SSBs : tek zincir kırıkları
TAS : Toplam antioksidan durumu
TBA : tiyobarbitürik asit
TBARS : Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TCA : trikloroasetik asit
TDV ; Türkiye Diyabet Vakfı
TOS : Toplam oksidan durumu
UPD2 : unpaired2
USDA : Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
UV : Ultraviyole
VNC : ventral sinir kordonu
VNC : ventral sinir kordonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sükrozun yapısal formülü.....	1
Şekil 1.2. Yüksek şekerin nörotoksik etki mekanizması.....	2
Şekil 2.1. 2024 yılına ait Dünya çapında diyabet artışı 2021 yılına kıyasla verilmiştir....	8
Şekil 2.2. Avrupa ülkelerinde diyabetin görülme sıklığı	9
Şekil 2.3. <i>D. melanogaster</i> 'de ILP'yi kontrol eden faktörlerin diyagramı	11
Şekil 2.4. İnsülin üreten hücrelerin (IPC) ortaya çıkışını düzenleyen faktörler.....	12
Şekil 2.5. DILP'lerin çıkış noktaları	13
Şekil 2.6. Kafeinin etki ettiği durumlar ve sistemler.....	15
Şekil 2.7. Aşırı kafein tüketiminin nörotoksik etkileri.....	16
Şekil 2.8. İçeceklerin kafein içeriği.....	17
Şekil 2.9. Kafeinin karaciğerde metabolitlerine dönüşümü	18
Şekil 2.10. Kafeinin vücut içerisinde ulaştığı doku ve organlar	19
Şekil 2.11. Kafeinin zamana bağlı olarak değişen etkileri.....	20
Şekil 2.12. ATP molekülünün yapısı	21
Şekil 2.13. Kafeinin sistemler üzerindeki etkisi.....	22
Şekil 2.14. <i>D. melanogaster</i> 'de kafein parçalanmasıyla açığa çıkan metabolitleri.....	23
Şekil 3.1. Yabanıl Tip <i>D. melanogaster</i>	27
Şekil 3.2. <i>D. melanogaster</i> yaşam döngüsü	30
Şekil 3.3. <i>D. melanogaster</i> imajinal diskleri ve ergin bireyde oluşturduğu yapılar.....	31
Şekil 3.7. 1K, 2K, 5K ve 10K Kafein konsantrasyonlarında ölen bireyler	33
Şekil 3.8. 1K kafein (a) ve 2K kafein dozlarında (b) <i>D. melanogaster</i> gelişimi.....	34
Şekil 3.9. 4XŞ ve 8XŞ sükroz maruziyeti sonucu bireylerin görüntüsü	35
Şekil 3.10. Tez çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar	36
Şekil 3.11. Çalışma konsantrasyonlarında gözlemlenen pupa miktarı.....	36
Şekil 3.12. Hasarlı bir hücrede baş ve kuyruk gösterimi	37
Şekil 3.13. Florosan mikroskop altında farklı renkler veren hücreler.....	40
Şekil 3.14. Akridin Oranj deney aşamaları gösterimi	41
Şekil 3.15. TAS/TOS Prensibi	43
Şekil 3.16. TAS/TOS deney aşamaları gösterimi.....	44
Şekil 3.17. Lipid peroksidasyonu deney aşamaları gösterimi	46
Şekil 3.18. <i>Drosophila</i> larva merkezi sinir ve nöromüsküler sistemi	48
Şekil 3.19. Larval sürünme deney sürecinin gösterimi	49
Şekil 3.20. Larval ağırlık deneyi aşamaları.....	51
Şekil 3.21. Pupa pozisyon deneyi aşamaları	52
Şekil 3.22. Ergin Ağırlık deneyi aşamaları	54
Şekil 3.23. Negatif jeotaksis deneyi aşamaları.....	56
Şekil 3.24. Ömür uzunluğu deneyinin aşamaları	57
Şekil 4.1. COMET assay IV programında ölçümü ve değerlendirme parametreleri	61
Şekil 4.2. Beyin KOMET kuyruk uzunluğu bakımından konsantrasyonlar.....	62
Şekil 4.3. Beyin KOMET kuyruk yoğunluğu bakımından konsantrasyonlar	62
Şekil 4.4. Beyin KOMET kuyruk momenti bakımından konsantrasyonlar	63
Şekil 4.5. TOS spektrofotometrede ölçüme hazırlanmış deney aşaması	64
Şekil 4.6. TAS ve TOS ölçüm öncesi görüntüsü.....	64
Şekil 4.7. <i>D. melanogaster</i> beyin hücreleri için toplam oksidan seviyesinin gösterimi.	65

Şekil 4.8. <i>D. melanogaster</i> beyin hücreleri için toplam antioksidan seviyesi.....	65
Şekil 4.9. <i>D. melanogaster</i> beyin hücreleri için TOS ve TAS seviyesi	66
Şekil 4.10. <i>D. melanogaster</i> beyin hücreleri için oksidatif stres indeksinin gösterimi ...	66
Şekil 4.11. Canlı ve ölü hücreden yayılan yeşil ve kırmızı yansıma.....	67
Şekil 4.12. <i>D. melanogaster</i> beyin hücrelerinde ölüm yüzdesinin gösterimi.....	68
Şekil 4.13. <i>D. melanogaster</i> beyin hücrelerinde yapılan lipid peroksidasyonu	69
Şekil 4.14. Larval sürünme 1. nesil deneyinin grafiksel gösterimi	70
Şekil 4.15. Larval sürünme 3. nesil deneyinin grafiksel gösterimi	71
Şekil 4.16. Larval sürünme 5. nesil deneyinin grafiksel gösterimi	72
Şekil 4.17. Kontrol grubunun 1. nesil larval sürünme görüntüsü.....	73
Şekil 4.18. Sadece kafein uygulanan grupların 1. nesil larval sürünme görüntüleri	73
Şekil 4.19. 2 kat şeker ve kafein gruplarının 1. nesil larval sürünme görüntüleri.....	73
Şekil 4.20. 4 kat şeker ve kafein gruplarının 1. nesil larval sürünme görüntüleri.....	74
Şekil 4.21. 8 kat şeker ve kafein uygulanan 1. nesil larval sürünme görüntüleri.....	74
Şekil 4.22. Larval ağırlık 1. nesil sonuçları.....	75
Şekil 4.23. Larval ağırlık 3. nesil sonuçlarının grafiksel gösterimi	76
Şekil 4.24. Larval ağırlık 5. nesil deney sonuçları	77
Şekil 4.25. Pupa pozisyon 1. nesil pupa oluşumunun grafik gösterimi.....	78
Şekil 4.26. Pupa pozisyon 3. nesil pupa oluşumunun grafik gösterimi.....	79
Şekil 4.27. Pupa pozisyon 5. nesil pupa oluşumunun grafik gösterimi.....	80
Şekil 4.28. Negatif jeotaksis 1. nesil deney sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	81
Şekil 4.29. Negatif jeotaksis 3. nesil deney sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	82
Şekil 4.30. Negatif jeotaksis 5. nesil deney sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	82
Şekil 4.31. Ergin ağırlık 1. nesil deney sonucunun grafiksel gösterimi.....	84
Şekil 4.32. Ergin ağırlık 3. nesil deney sonucunun grafiksel gösterimi	85
Şekil 4.33. Ergin ağırlık 5. nesil deney sonucunun grafiksel gösterimi.....	86
Şekil 4.34. Ömür uzunluğu 1. nesil deney sonucunun gösterimi	87
Şekil 4.35. Ömür uzunluğu 3. nesil deney sonucunun gösterimi	88
Şekil 4.36. Ömür uzunluğu 5. nesil deney sonucunun gösterimi	89
Şekil 4.37. Dozlar boyalar ile kuyucuklara zikzak şekilde hazırlandı	90
Şekil 4.38. Platelerin inkübatör içerisindeki görüntüsü	90
Şekil 4.39. Mavi besin ile beslenen bireyler ve mavi abdomen renginin gösterimi.....	91
Şekil 4.40. Kırmızı besin ile beslenen bireylerin abdomen renginin gösterimi	91
Şekil 4.41. Hem mavi hem kırmızı besinden yiyen mor renkli abdomenli bireyler	92

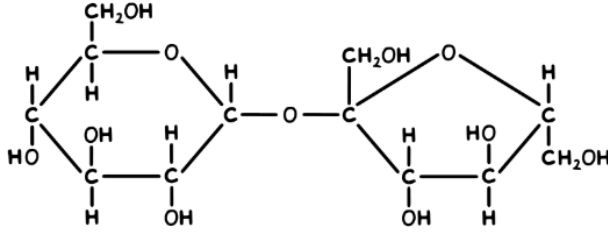
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Hiperglisemi ile ilişkili hastalıklar	1
Çizelge 2.1. Türkiye için diyabet oranları (IDF 2021).....	9
Çizelge 2.1. Kafein içeren gıdalar ve içerisindeki kafein miktarları (USDA 2019)	14
Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar	25
Çizelge 3.2. Çalışma kapsamında deneylerin yürütülmesinde kullanılan cihazlar	26
Çizelge 3.3. Çalışmada yer alan deneyler için kullanılan kitler.....	27
Çizelge 3.4. Standart <i>D. melanogaster</i> besin içeriği (Kaya 2000).....	31
Çizelge 3.5. Komet deneyinin kullanıldığı alanlar ve amaçları	38
Çizelge 3.6. Konsantrasyonlar ve besine yönelimi ifade eden PI değeri	93



1. GİRİŞ

Sakkaroz (sükroz), doğada yaygın olarak bulunan ve insanlar tarafından en çok tüketilen disakkarit şeker türüdür. Kimyasal olarak bir glukoz ve bir fruktoz molekülünün glikozidik bağ ile birleşmesiyle oluşur ($C_{12}H_{22}O_{11}$). Sakkaroz, suda yüksek oranda çözünebilir ve sindirim sisteminde sükras enzimi tarafından hızla parçalanarak monosakkaritlerine ayrılır ve kana karışır (Selvamani vd. 2023).

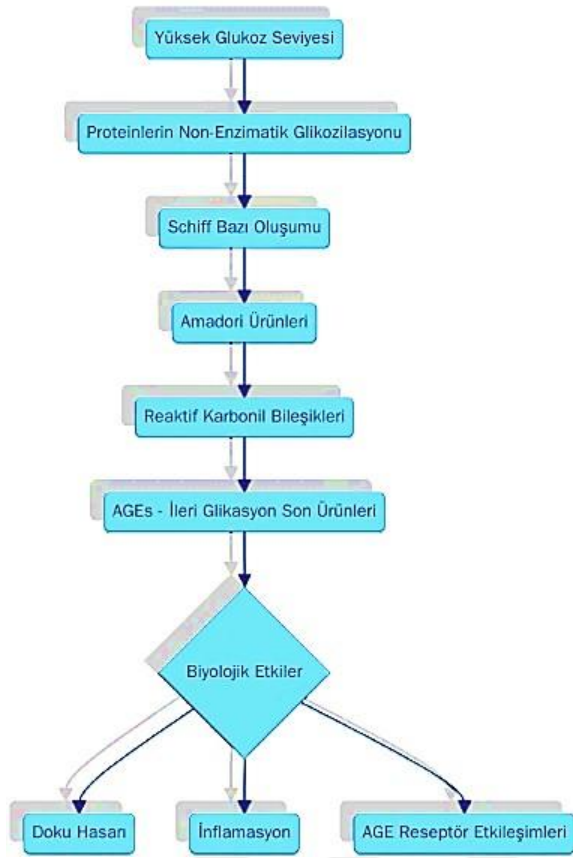


Şekil 1.1. Sükrozun yapısal formülü

Rafine sakkaroz, günümüzde birçok hazır gıda ve içeceğin temel bileşeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, günlük şeker tüketimi önerilen sınırların oldukça üzerindedir. Dünya Sağlık Örgütü, bireylerin günlük enerji alımının %5'inden fazlasının serbest şekerlerden gelmemesi gerektiğini vurgulamaktadır. Ancak, birçok toplumda bu oran %10'un üzerindedir. Aşırı sakkaroz tüketimi, obezite, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve karaciğer yağlanması gibi birçok metabolik bozukluğun gelişimiyle ilişkilidir. Şekerin fizyolojik yararları enerji metabolizması ile bağlantılıdır; beyin, vücuttaki glukozun %20'sini kullanarak sinirsel iletim faaliyetlerini sürdürür. Glukoz ayrıca pentoz fosfat yolu, glikoliz ve sitrik asit döngüsü gibi biyokimyasal yollarda ara madde olarak görev yapar. Ancak, bu yolların dengesi bozulduğunda, özellikle aşırı ve düzensiz şeker tüketimiyle birlikte, şekerin zararları ön plana çıkmaktadır. çizelge 1.1'de yüksek ve kronik şeker beslenmesi sonucu ortaya çıkan hastalıklar verilmiştir.

Çizelge 1.1. Hiperglisemi ile ilişkili hastalıklar

Hastalık Grubu	Hastalıklar	Kaynak
Metabolik Hastalıklar	Tip 2 Diyabet, İnsülin Direnci, Obezite	Stanhope 2016
Kardiyovasküler	Hipertansiyon, Kalp Hastalıkları	Yang vd. 2014; Witek vd. 2022
Psikolojik ve Nörolojik	Depresyon, Beyin Sisi	Tryon vd. 2015
Karaciğer Hastalıkları	Yağlı Karaciğer (NAFLD)	Manchanayake vd. 2011
Ağız Sağlığı	Diş Çürükleri, Diş Eti Hastalıkları	Moreira vd. 2021
Cilt ve Diğer	Sivilce	Prada vd. 2022



Şekil 1.2. Yüksek şekerin nörotoksik etki mekanizması (Tomlinson ve Gardiner 2008)

Yüksek miktarda ve uzun süreli şeker tüketimi, glukoz seviyelerinin artmasına ve bunun sonucunda proteinlerin glikozilasyonu ile ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) oluşumuna yol açar. Bu ürünler, inflamasyon ve oksidatif stres gibi süreçleri tetikleyerek hücrel yaşlanmaya katkıda bulunur. Bu mekanizmalar, yalnızca periferik dokular için değil merkezi sinir sistemi için de zararlıdır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, yüksek glukoz maruziyetinin nörotoksik etkiler yaratabileceğini göstermiştir (Zhang vd. 2023). Kronik hiperglisemi durumunda, beyindeki nöronlarda mitokondriyal disfonksiyon, nöronal dejenerasyon ve apoptoz gibi süreçler aktive olur (Catalani vd. 2021). Bu nörotoksiste, oksidatif stresin artışı ve glutamat metabolizmasının bozulması gibi mekanizmalarla ilişkilidir. Bu süreçler, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda da gözlemlenmektedir. Ayrıca, yüksek

şeker tüketimi hipokampus gibi öğrenme ve hafıza bölgelerinde nöron hasarını artırarak bilişsel fonksiyonlar üzerinde olumsuz etkiler yapabilir. Bu nedenle, şeker tüketiminin sınırlanması, nörolojik sağlığın korunması açısından önemlidir (Greco vd. 2023).

Dört ay boyunca %10 sakkaroz ile beslenen sıçanlarda yapılan bir çalışmada, kan, hipokampus ve kemik iliği dokularında DNA hasarının ve oksidatif stres belirteçlerinin anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, sakkarozun sistemik genotoksik etki potansiyelini ortaya koymaktadır (Franke vd. 2017).

Bunun yanı sıra sakkarozun nöral dokulardaki mikrogliya aktivasyonunu artırarak nöroinflamasyonu tetiklediği ve bunun Alzheimer tipi nörodejenerasyonla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Kaur vd. 2024). Bu bulgular sakkaroz tüketiminin sadece metabolik sağlık üzerinde değil, aynı zamanda nörolojik sağlık üzerinde de ciddi etkiler yaratabileceğini göstermektedir. Yüksek miktarda şeker tüketimi, özellikle işlenmiş gıdalardaki rafine sakkaroz ve fruktozun yaygın olarak tüketilmesi, tip 2 diyabetin ortaya çıkmasında önemli bir çevresel risk faktörü olarak değerlendirilmiştir (Lima vd. 2022; Russo 2024). Gıdalara, içeceklere üretim veya hazırlık sırasında eklenen monosakkarit ve disakkaritler (örneğin; bal, şurup, meyve suları) serbest şeker olarak adlandırılır (WHO

2015). Aşırı miktarda alınan serbest şekerler, yemek sonrası glisemik yükü artırırken pankreas β -hücrelerine sürekli bir insülin talebi yaratarak hücrel yorgunluğa neden olur (Rad vd. 2018). Uzun vadede bu durum insülin salgısının bozulmasına ve periferik hücrelerde insülin direncinin gelişmesine yol açabilir (Henriksen ve Diamond-Stanic, 2011). Ayrıca şekerin aşırı tüketimi hiperinsülinemiye neden olarak lipogenez ve abdominal yağ birikimini artırmaktadır bu durum da obeziteyle birlikte diyabet riskini daha da yükseltmektedir (Tangvarasittichai 2015). Metabolik sendromun merkezinde yer alan bu glisemik ve lipid dengesizlikleri, tip 2 diyabetin fizyopatolojisini besleyen kısır bir döngü oluşturmaktadır (Maciejczyk vd. 2019). Nörotoksik etkilerle birlikte şekerin sinir sistemi üzerindeki oksidatif baskısı yalnızca metabolik değil nörolojik diyabet komplikasyonlarını da tetikleme potansiyeline sahiptir (Blázquez ve Velázquez 2014). Bu nedenle şeker tüketiminin kısıtlanması tip 2 diyabetin önlenmesi ve komplikasyonlarının azaltılması açısından hayati bir öneme sahiptir (Soares vd. 2012; Butterfield vd. 2014).

Kafein, Dünya genelinde en yaygın tüketilen psikoaktif maddedir ve özellikle kahve, çay, kakao, enerji içecekleri ve bazı gazlı içeceklerde bulunur. Bir fincan kahve yaklaşık 80–175 mg, bir fincan çay yaklaşık 47 mg, bir kutu kola ise ortalama 47 mg kafein içerir (Wierzejska ve Gielecińska 2024). Kafein, merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı etki gösterir ve düşük-orta dozlarda bilişsel uyanıklığı, dikkat ve egzersiz performansını artırabilir (Wang vd. 2022). Yapılan meta-analizler, düzenli ve ölçülü kafein tüketiminin Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkiler sağlayabileceğini ortaya koymaktadır (Saimaiti vd. 2023). Ayrıca günde 3-4 fincan kahve tüketimi; tip 2 diyabet, kronik böbrek hastalığı ve metabolik sendrom riskinde azalma ile ilişkilendirilmiştir (Ni vd. 2021). Bununla birlikte, kafein tüketiminin bazı sağlık riskleri de vardır. Yüksek dozlarda (≥ 400 mg/gün), özellikle duyarlı bireylerde anksiyete riskini artırabilir ve uykusuzluk, huzursuzluk, taşikardi, tremor gibi belirtilere neden olabilir (Klevebrant ve Frick 2022). Yapılan çalışmalar, kafeinin uyku süresini ortalama 45 dakika kısalttığını ve uyku verimliliğini yaklaşık %7 azalttığını göstermektedir (Gardiner 2023). Gebelikte ise 200 mg/gün üzerindeki kafein alımı, düşük doğum ağırlığı ve spontan abortus riskini artırabileceğinden, bu sınırın aşılması önerilmektedir (Jafari 2022). Kafein toksisitesi ise genellikle aşırı dozlarda, yani yaklaşık 1200 mg üzerinde akut alımlarda görülür ve ciddi nörolojik ve kardiyak etkiler yaratabilir. Klinik olarak taşikardi, hipertansiyon, aritmi, mide rahatsızlıkları ve ajitasyon gözlenebilir; 5-10 gramlık dozlar ise ölümcül olabilmektedir (Shan vd. 2022). Nadiren de olsa çok yüksek doz kafein alımı psikotik atakları tetikleyebilir (Mannix vd. 2024). Öte yandan sporcularda yapılan araştırmalar, 1–3 mg/kg doz kafeinin dayanıklılık ve anaerobik performansı artırabileceğini göstermiştir (Guest vd. 2021). Sağlıklı yetişkinler için önerilen güvenli üst sınır günde 400 mg, gebeler için ise 200 mg'dır (Saraiva vd. 2023). Çocuk ve ergenlerde ise vücut ağırlığına göre daha düşük alım önerilir (Abalo vd. 2021). Genel olarak kafein, ölçülü tüketildiğinde metabolik ve nörolojik sağlık üzerinde yararlı etkilere sahip olabilirken, aşırı alımlarda toksisite riski taşımaktadır. Bu nedenle kafein tüketiminde bireysel duyarlılıklar ve özel durumlar (gebelik, anksiyete eğilimi, kalp hastalıkları) göz önünde bulundurulmalıdır.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Tip 2 Diyabet

Diyabet, insülin hormonunun üretiminden ya da kullanımından kaynaklanan metabolik bir hasar sonucu ortaya çıkan kandaki yüksek şeker seviyesine bağlı olarak gelişen bir hastalıktır. Çıkış kaynağına bağlı olarak diyabet, tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki ayrı başlığa ayırmaktadır. Tip 1 diyabet, immün sisteminin pankreasta bulunan beta hücrelerini yıkmasıyla ortaya çıkmaktadır (Lambert 2002). Tip 1 diyabet, pankreasın insülin üretememesinden kaynaklı ortaya çıkan kandaki yüksek şekerden kaynaklı olmaktadır. Genç yaşlarda ortaya çıkarken canlının yaşayış tarzıyla bir ilgisi yoktur. Tip 2 diyabet ise pankreastan insülin salgılsa da hücre zarında bulunan insülin reseptöründeki bozulmalardan kaynaklı ortaya çıkan yüksek şekerden meydana gelmektedir. Tip 2 diyabet çevresel şartlardan etkilenmektedir ve belli bir yaştan sonra kendisini göstermeye başlamaktadır. Diyabetin tanısının ortaya konmaması ve diyabet için etkili bir tedavi uygulanmaması diyabetli insanları; kalp krizi, böbrek yetmezliği, felç gibi hayatı ciddi boyutlarda kötü etkileyecek hastalıklarda bu insanları öncü kişiler haline getirmektedir. Diyabetin ortaya çıktığını belli eden başlıca semptomlar vardır bunlar; çok fazla idrara çıkma, halsizlik, susuzluk hissidir. Yapılan çalışmalarda diyabetli sıçanlarda ve diyabetli hastalarda, serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede artış gösterdiği ortaya konulmuştur. Serbest radikal oluşumunun diyabetin ilerlemesinde rol oynadığı ortaya konulmuştur. Kanda yüksek şeker seviyesi ile bilinen hiperglisemi birçok dejeneratif hastalığın ortaya çıkmasına ve kötüleşmesine neden olmaktadır (Pitkanen 1992). *D. melanogaster* bireyleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda *Drosophila*'nın %15 ila %30 şeker maruziyetinin ardından bireylerde insülin direnci, insülin sinyalinde bozulma, yağ birikimi, metabolik bozukluklar ve stres durumları gözlemlenmiştir (Musselman vd. 2011; Pasco ve Léopold 2012; Na vd. 2013; Rovenko vd. 2015; Ecker vd. 2017). Bu nedenle metabolik bozukluklar ve tip 2 diyabet çalışmalarında *Drosophila melanogaster*'in model organizma olarak kullanılması etkin olmuştur.

Tip 2 diyabet, insülin direnci ve ilerleyen dönemde pankreatik β -hücre disfonksiyonuyla karakterize, kompleks ve multifaktöriyel bir metabolik hastalıktır (Demir vd. 2021). Başlangıçta periferik dokuların (özellikle kas, yağ ve karaciğer) insüline karşı yanıt vermemesiyle gelişen bu süreç, uzun dönemde insülin sekresyon kapasitesinin azalmasıyla glisemik kontrolün bozulmasına yol açar (Teran vd. 2021).

Diyabetin gelişiminde genetik yatkınlık önemli bir etken olmakla birlikte, çevresel faktörler de kritik bir rol oynamaktadır. Obezite, fiziksel inaktivite, beslenme alışkanlıkları ve stres gibi unsurlar, diyabetin patogeneğinde belirleyici faktörler arasında yer almaktadır (Franks ve McCarthy 2016; Kolb ve Martin, 2017; Beulens vd. 2022).

Hücresel düzeyde ise, insülin sinyal yollarının bozulması, özellikle IRS-1/PI3K/Akt yolunda meydana gelen aksaklıklar, diyabetin gelişiminde önemli bir mekanizma olarak öne çıkmaktadır. Bu bozulmalar, mitokondriyal disfonksiyon ile birleştiğinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırmakta ve bu da hücresel hasara yol açmaktadır. Artan ROS seviyeleri, inflamatuvar yanıtları tetikleyerek

diyabetin ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (De Deus vd. 2023; Ramasubbu ve Rajeswari 2023). Tip 2 diyabetin komplikasyonları çok yönlüdür. Uzun süreli hiperglisemi; retinopati, nefropati, nöropati ve kardiyovasküler hastalıklar gibi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişmesine neden olur (Sabuncu vd. 2021). Kardiyovasküler komplikasyonlar, diyabetli bireylerde en önemli mortalite nedenlerinden biridir (Siam ve Snigdha 2024).

Biyokimyasal olarak glukozun kronik olarak yüksek düzeyde bulunması, ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) oluşumuna ve bu ürünlerin RAGE reseptörlerine bağlanmasıyla NF- κ B gibi inflamatuvar transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olur (Teran vd. 2021). Bu süreç, hem vasküler endotelyum hem de sinir dokusu üzerinde zararlı etkiler oluşturur. Ayrıca, lipotoksisite ve inflamasyonun sinerjik etkisiyle β -hücre apoptozu tetiklenerek diyabet progresyonu hızlanır (Okur vd. 2017).

2.2. Hiperglisemi ile Serbest Radikal Oluşumu

Kandaki yüksek şeker seviyesi sonrasında serbest radikal oluşumunun arttığı bilinmektedir. Hiperglisemi ile radikal oluşumu; glukoz oto-oksidasyonu, glikasyon ve poliyol olmak üzere 3 farklı yolak ile gerçekleşmektedir.

2.3. Glukoz oto-oksidasyonu

Enerji üretimi sırasında görev alan mitokondriyal elektron taşıma zinciri ile oluşturulan elektrokimyasal proton gradiyenti hücre içi süperoksit üretimine neden olur. Glukoz alımı süper oksit üretimini artırır. Böylelikle Protein kinaz C üretilir. Bu da damar geçirgenliğine sebep olarak damar komplikasyonlarının patogeneze rol alır (Koya 1998).

2.4. Glikasyon

Protein glikasyonu sonrasında günler içerisinde amadori ürünleri oluşur. Oluşan amadori ürünleri, dikarbonil bileşiklere ve haftalar içerisinde ileri glikasyon ürünlerine dönüşür. Glikasyon son ürünlerinin sinir iletim hızını azalttığı, psikomotor etkinliği azalttığı ve periferik sinirlere kan akımını azaltarak diyabetik nöropatiyi artırdığı görülmüştür (Yorulmaz 2013). Hiperglisemi ile artan ileri glikasyon ürünleri Alzheimer hastalığı gibi birçok dejeneratif hastalığın gelişiminde veya kötüleşmesinde rol oynayan bir biyolojik belirteçtir (Valente vd 2009).

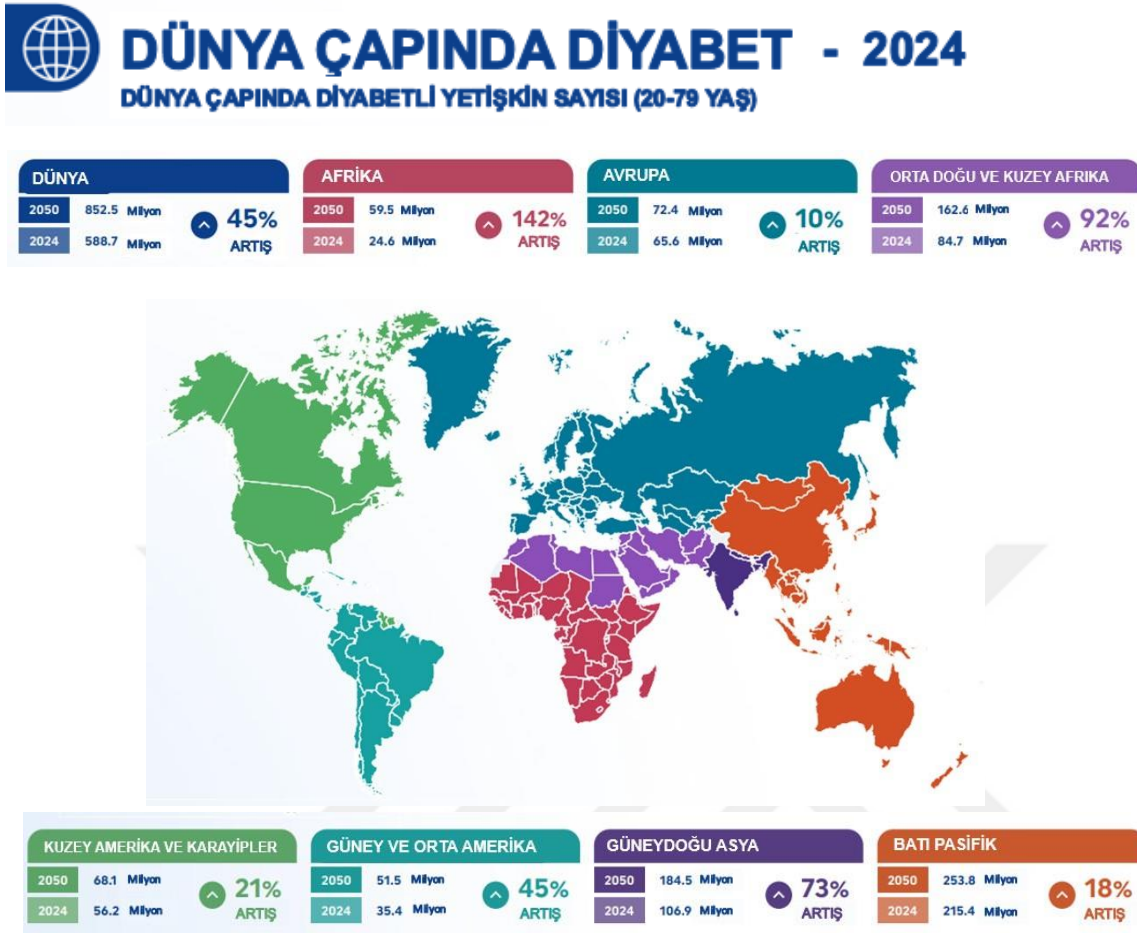
2.5. Poliyol

Hücre içi fonksiyonlarının gerçekleşmesi için NADH gereklidir. Fakat vücuda fazla glukoz alımı NADH seviyesini azaltmaktadır. NADH seviyesinin azalması sonucunda antioksidan seviyesi azalır. Böylelikle reaktif oksijen türlerinin seviyesinin artmasına neden olur. Poliyol ayrıca glukozdan fruktoz sentezinin gerçekleştiği bir yoldur. Glukozun sorbitole dönüşümü sorbitolün fruktoza dönüşümü gerçekleşir. Poliyol aktivitesi sonucunda sodyum potasyumda azalma olmaktadır.

2.6. Diyabetin Dünya'daki yeri

Dünya genelinde tip 2 diyabet prevalansı ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre, dünya çapında yaklaşık 422 milyon insan diyabet hastasıdır ve her yıl 1,5 milyon kişi diyabet nedeniyle hayatını kaybetmektedir (WHO 2021). Diyabetin görülme sıklığı ve vaka sayısı sürekli artış göstermektedir. 2024 yılı verilerine göre, dünya çapında 537 milyon birey diyabetle yaşamaktadır ve bu sayının 2030 yılına kadar 643 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Onat vd. 2014). Türkiye'de yapılan TURDEP-II çalışması, erişkin nüfusta tip 2 diyabet prevalansının %13.7'ye ulaştığını ve hızlı bir artış eğilimi gösterdiğini ortaya koymaktadır (Akın ve Bölük 2020). Bu veriler, diyabetle mücadelede daha etkili stratejilerin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Eğitim ve farkındalık çalışmaları, erken teşhis ve uygun tedavi yöntemlerinin yaygınlaştırılması, diyabetin kontrol altına alınmasında önemli rol oynamaktadır. Diyabetin önlenmesi ve yönetimi için ulusal ve uluslararası düzeyde işbirliği kritik öneme sahiptir.

Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun (IDF) 2024'de yayınlanan diyabet atlası 11. baskısına göre şu an Dünya genelinde 589 milyon insan diyabetten müzdarip yani günümüzde her on kişiden biri diyabetle mücadele etmektedir (IDF 2024). Ayrıca 2019 yılında, 2021 yılı için tahmin edilen sayının şu an da çok daha üstünde olduğumuzu bildirmektedir. IDF diyabet atlasına göre 2050 yılına kadar diyabet sayısının 853 milyon insana daha ulaşacağını belirtiyor. Açıklanan diyabet vaka sayısı ve toplumdaki artış miktarı diyabetin ciddi boyutlara ulaşmış olduğunu bize göstermektedir. (Şekil 2.1) Ek olarak IDF, diyabetli olan insanların %90'ından fazlasının tip 2 diyabetli olduğunu ortaya koymaktadır. 2024 yılında diyabetin ya da diyabet komplikasyonlarının yaklaşık olarak 3,4 milyon insanın hayatını kaybetmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Son olarak IDF, diyabetin maddi açıdan da bizi ne kadar çok etkilediğini anlatan bir veri daha ortaya koymaktadır. Diyabet, Dünya çapında 1,015 trilyon dolar harcamaya sebep olmuştur (IDF 2024).



Şekil 2.1. 2024 yılına ait Dünya çapında diyabet artışı 2021 yılına kıyasla verilmiştir (IDF 2024)

2.7. Türkiye’de diyabet

Uluslararası Diyabet federasyonu (IDF) Türkiye için diyabetin geldiği son durumunu ortaya koymuştur (Çizelge 2.1). Son zamanlar da Türkiye’deki diyabetli kişilerin artışıyla beraber sadece insanların hayatı olarak tehlikeye girmesinden değil ekonomik anlamda diyabete çok fazla para harcanmasına da sebep olmuştur.

Çizelge 2.1. Türkiye için diyabet oranları (IDF 2021)

Gösterge (Yıllık)	Değer	Açıklama
Tahmini Diyabetli Yetişkin Sayısı	9,020.9	20-79 yaş aralığında (1000)
Toplam Yetişkin Nüfus	56,658.9	20-79 yaş aralığında
Diyabet Yaygınlığı	%14,5	Yaşa göre ayarlanmış oran
Kişi Başına Diyabet Maliyeti	1.144,9 USD	20-79 yaş grubunda ortalama
Diyabete Bağlı Yıllık Ölüm Sayısı	83.221	20-79 yaş grubunda
Tanı Konmamış Diyabet Oranı	%41,8	Diyabeti olanların içinde
Her X Yetişkinden Biri Diyabetli	6	Yaklaşık her 6 kişiden biri

IDF'nin ortaya koyduğu, Avrupa ülkelerindeki diyabet görülme sayılarına baktığımızda Türkiye'deki diyabet vakasının her yıl çok fazla arttığını ve bu artışın Türkiye'yi diyabet görülme miktarı konusunda Avrupa ülkeleri içerisinde birinci sıraya taşıdığı görülmektedir (IDF 2021).

2.8. Avrupa ülkelerinde diyabet verileri (2011-2021)

Diyabetli Kişi Sayısı (Milyon)		
	YIL	
ÜLKE	2011 - 2021	
Türkiye	3.5	9.0
Rusya Federasyonu	12.6	7.4
Almanya	5.0	6.2
İspanya	2.8	5.1
İtalya	3.6	4.5

Yaşa Göre Ayarlanmış Diyabet Yaygınlığı (%)		
	YIL	
ÜLKE	2011 - 2021	
Türkiye	8.1	14.5
İspanya	6.5	10.3
Andora	5.6	9.7
Portekiz	9.8	9.1
Sirbistan	7.9	9.1

Şekil 2.2. Avrupa ülkelerinde diyabetin görülme sıklığı (Internaitonal Diabetes Federation 2021)

2.9. Tip 2 diyabet ekonomisi

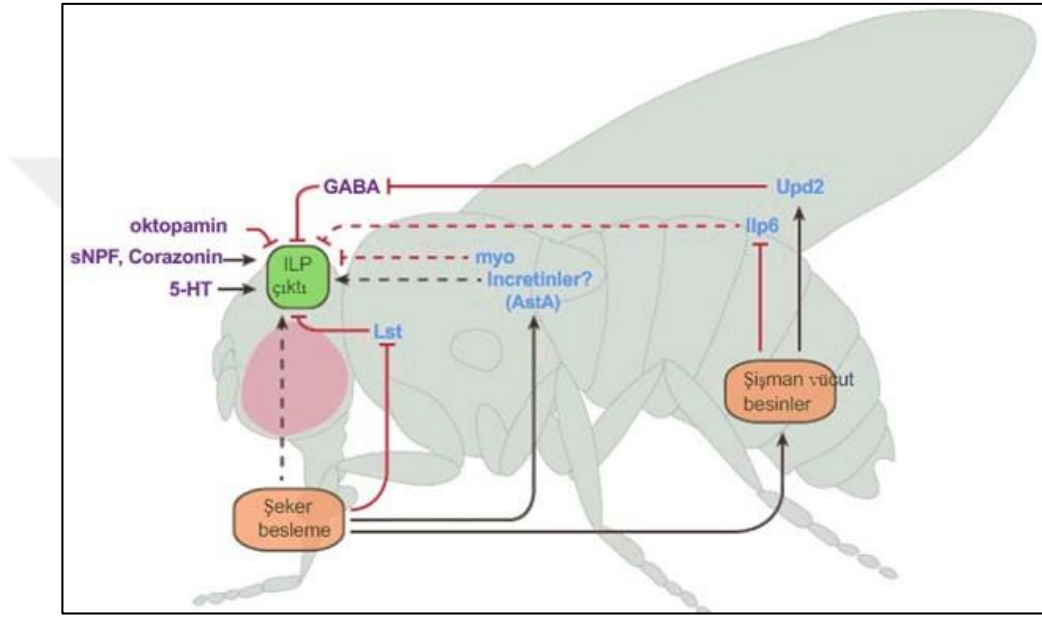
Ekonomik açıdan da önemli bir halk sağlığı sorunu olan tip 2 diyabet, hem doğrudan tedavi maliyetleri hem de komplikasyonlara bağlı sağlık hizmeti yükü açısından ülkeler için ciddi bir ekonomik zarar kaynağıdır (Malhan vd. 2014). Türkiye Diyabet Vakfı (TDV) başkanı Prof. Dr. Temel Yılmaz'ın açıklamalarına göre; Türkiye'de yaklaşık olarak 12 milyona yakın diyabet hastası bulunmaktadır. SGK resmi verilerine göre bu kişilerden, 8 milyonu ilaç kullanan diyabetli ve 1,5 milyonu bünyesine insülin enjekte etmektedir. Ayrıca ülkemizdeki diyabet vaka sayısının artış miktarı Dünya ortalamasının 2 katıyken Avrupa ülkelerinin diyabet ortalamasının 3 katı olduğunu da söylemektedir (IDF 2021). Türkiye'de her 10 yılda bir diyabet vaka sayısının 2 kat artması Türkiye'yi Avrupa ülkeleri içerisinde her yıl en yüksek artış oranına sahip olmasına neden olmaktadır. Ek olarak ülkemizin sağlık bütçesinin dörtte birinin sadece diyabet hastalığı kapsamında kullanıldığını belirtmiştir (Gür 2024).

2.10. Tip 2 diyabet ve *D. melanogaster*

D. melanogaster, diyabet araştırmalarında sıkça kullanılan bir model organizmadır. İnsanlarla yüksek oranda benzer hastalık genlerine sahip olması ve memelilerin glikoz denge mekanizmalarına benzer yapılar taşıması, sineklerin bu alanda öncü olmasını sağlamaktadır (Demir vd. 2021). Sineklerde insülin sinyallerinin karakterizasyonu, metabolik diyagramın anlaşılmasına katkı sağlamış ve bu sinyallerdeki kusurların memelilerdeki etkilerle benzerlik göstermesi dikkat çekmiştir. *Drosophila*'da keşfedilen 8 insülin benzeri peptit (ILP), stres tepkileri, yaşam süresi, büyüme ve metabolizmayı düzenlemekte, beyinden çıkışını birçok faktör etkilemektedir (Liao vd. 2020). Bu özellikleri nedeniyle *D. melanogaster*, diyabetin genetik mekanizmalarını incelemekte kullanılan önemli bir sistem haline gelmiştir. Özellikle tip 2 diyabetle ilgili araştırmalar, sineklerin bu alandaki rolünü artırmıştır. Metabolizma kaynaklı sorunların tespiti, *D. melanogaster*'i çok sayıda genin fonksiyonunu tanımlama açısından değerli kılmaktadır.

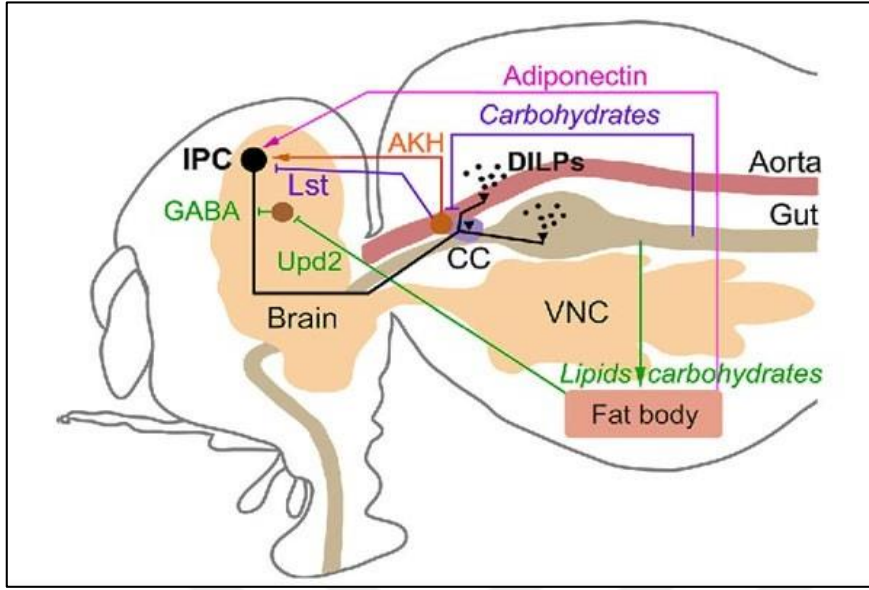
Aşağıda verilen diyagramda yetişkin bir *D. melanogaster*'den insülin benzeri peptit salınımını kontrol eden ve düzenleyen faktörler verilmiştir (Şekil 2.3). Diyagramda mor metin ile gösterilen kısımlar ILP'yi düzenleyen sistemleri mavi metin ile gösterilen kısımlar ise ILP salgısının periferik faktörlerdir. Yetişkin bir *Drosophila*'nın bünyesine şeker girmesiyle *D. melanogaster*'deki yağlı besin sensörü, inkretin benzeri mekanizmalar vasıtasıyla etkisini göstermektedir (çizgili siyah noktalar). Yağ gövdesi, ILP6 ve unpaired2 (UPD2) faktörleri sayesinde ILP çıkışını uzaktan kontrolünü gerçekleştirmek için besin sensörü olarak görev yapmaktadır. UPD2, organizmanın tok olması halinde yağ hücreleri tarafından üretimi gerçekleştirilen bir peptittir. UPD2'de meydana gelen bir hasar büyümede azalmaya neden olmaktadır. UPD2'nin salınımı gama aminobütirik asidin (GABA) ortaya çıkışını baskılamaktadır. GABA, ILP çıkışı üzerinde inhibitör etkiye sahip olan durdurucu bir nörondur. UPD2'nin salgılanması GABA nöronunu baskılayacağı için ILP çıkışına neden olmaktadır. UPD2 salgılanmaz ise GABA nöronunu durdurucu herhangi bir etki olmadığı için ILP çıkışı gerçekleşemez.

ILP6, metabolik stres altında yağ gövdesi tarafından salgılanmaktadır. ILP6 sentezi büyümenin olumlu bir şekilde gerçekleşmesini desteklemektedir. ILP6 çıkışı, ILP sentezinde inhibitör görev alır. Bünyeye alınan şeker Corpora cardiaca'dan sentezlenen Limostatin hormonu (Lst) durdurur. Limostatinin durdurulması ILP çıkışına neden olur. Bünyeye şekerin girmemesi limostatin hormonunu artırır ve ILP'nin ortaya çıkışında inhibitör etki göstermektedir (Corpora cardiaca böceklerde deri değiştirme hormonunun salgılayan iç salgı bezidir). Kas dokusundan salgılanan myoglianin (myo), ILP sentezi üzerinde durdurucu etkiye sahiptir. Kısa nöropeptid F (Snpf) geni, Corazonin nöropeptidi ve 5-HT reseptörü ILP sentezinin gerçekleşmesini sağlayan faktörler olup oktopamin hormonu ise ILP'nin çıkışına engel olmaktadır (Alfa ve Kim 2016).



Şekil 2.3. *D. melanogaster*'de ILP'yi kontrol eden faktörlerin diyagramı (Alfa ve Kim 2016). (siyah çizgiler, ILP'nin çıkışında pozitif yolları gösterirken kırmızı çizgiler ise ILP çıkışında durdurucu faktörleri göstermektedir)

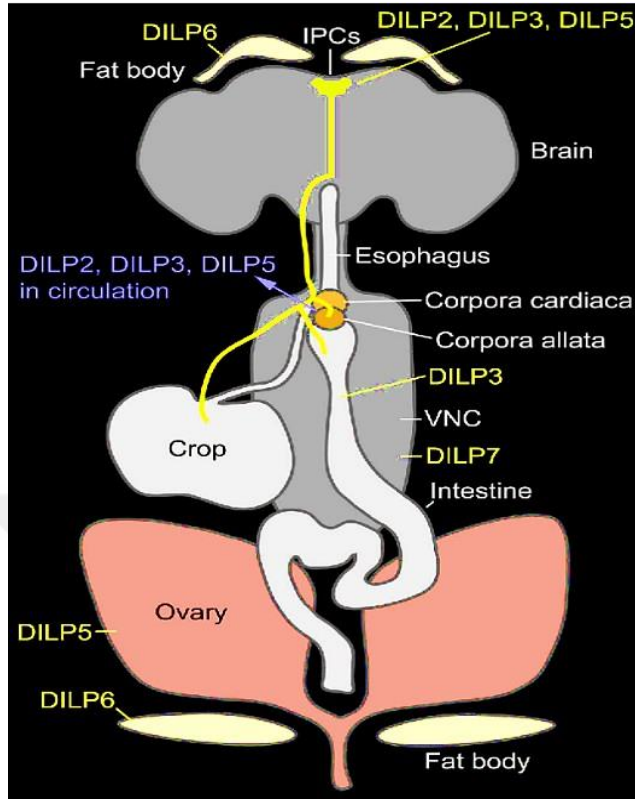
2.11. *D. melanogaster*'de IPC'leri düzenleyen faktörler



Şekil 2.4. İnsülin üreten hücrelerin (IPC) ortaya çıkışını düzenleyen faktörler (Nässel ve Broeck 2015)

D. melanogaster'de insülin üreten hücreler (IPC) bağırsaktan, yağ gövdesinden, Corpora Cardiac'a'nın endokrin hücrelerinden ve beyinden salınan birçok faktör aracılığıyla düzenlenmektedir. *D. melanogaster*'de IPC'leri düzenleyen faktörler Şekil 2.4'de verilmiştir. IPC (siyah nokta ile gösterilen), *D. melanogaster*'de kafa bölgesinde bulunmaktadır. Yeşil çizgi ile gösterilen yol, yağ gövdesinden karbonhidrat ve lipid vasıtasıyla ortaya çıkan UPD2'nin GABA nöronunun etkinliğini durdurmasını, GABA nöronunun durdurulması da IPC üretiminin desteklendiğini göstermektedir. Kırmızı yol, IPC'yi uyarıcı glikoz molekülleri sayesinde Corpora Cardiac'a'dan Adipokinetik hormonunun (AKH) salgılanması verilmiştir. Adipokinetik hormon, birçok böcekte yağ hücresinden elde edilen enerjinin ortaya çıkışında köprü görevi görmektedir. AKH'dan yoksun sineklerde açlık direnci bakımından kontrol sineklerden çok daha uzun yaşadıkları gözlemlenmiştir. Mavi yol, karbonhidratın ortaya çıkışıyla AKH üretiminin durmasını ve AKH'ın durması ile IPC'ler üzerinde inhibe edici özelliğe sahip limostatin hormon sentezinin engellenmesi gösterilmiştir. Pembe yol, IPC'lerin uyarımını gerçekleştiren Adiponektinin yağ gövdesinden salınımını göstermektedir. Adiponektin, yağ dokusundan salgılanarak hayvanlar da metabolizma düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. IPC'ye ait Adiponektinin durdurulması sonucu *D. melanogaster* de şeker ve trigliserit seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir.

2.12. *D. melanogaster* insülin benzeri peptitlerin (DILP) üretim yerleri



Şekil 2.5. DILP'lerin çıkış noktaları (Nässel ve Broeck 2016)

Yetişkin bir *D. melanogaster*'in merkezi sinir sisteminde ve diğer organlarında DILP'lerin üretim ve salınım bölgeleri Şekil 2.5'de gösterilmiştir. *D. melanogaster* beynindeki insülin üreten hücrelerden (IPC) 3 adet *D. melanogaster* insülin benzeri peptit (DILP) salgılanmaktadır. Bunlar (diagramın sağ üst köşesinde sarı ile gösterilen) DILP2, DILP3 ve DILP5'tir. Bu 3 insülin benzeri peptit, Corpora Cardiaca (CC) ve Corpora Allata'nın (CA) akson uçlarından *D. melanogaster*'in ön bağırsağına ve crop adı verilen bölgesine salgılanmaktadır (crop; gıdaların sindirimi gerçekleştirilmeden önce depolandığı ince duvarlı bölge). DILP3, DILP5 ve bağırsak kası tarafından malpighi tübülllerinde ve yumurtalıklar da üretilmektedir. DILP6, *D. melanogaster*'in hem kafasındaki hem de gövdesindeki

yağ gövdesinin adipositleri tarafından sentezi gerçekleştirilmektedir. DILP7, ventral sinir kordonunda bulunan (VNC) yaklaşık 20 nöromer tarafından üretilmektedir (nöromer; sinir çiftlerinin bağlanma noktaları arasındaki parçalar). Ventral sinir kordonundan üretilen DILP7, arka bağırsağına ve yumurta kanalına doğru da salınımı gerçekleşmektedir (Nässel ve Broeck 2016).

2.13. Kafein

Kafein, yaprak veya meyve halindeki bitkilerde doğal halde bulunan uyarıcı etkilere sahip hafif acı bir tada sahip beyaz, kokusuz bir toz olan ergojenik (performans arttırıcı) bir maddedir. Kafein, Dünya'da en çok tüketilen psikoaktif maddedir (Landolt 2008). Kimyasal olarak 1,3,7-trimetilksantin yapısında, doğal olarak çay, kahve, kakao ve bazı bitkilerde bulunan bir alkaloiddir (Heckman ve Gonzalez de Mejia, 2010). Yapısal olarak pürin türevleriyle benzerlik gösterir ve molekül ağırlığı yaklaşık 194 g/mol'dür (Ösz vd. 2022).

2.14. Kafein içeren gıdalar

Kafein, birçok farklı gıdadan farklı konsantrasyonlarda alımı söz konusudur. Doğal olarak 60'dan fazla bitkide kafein bulunmaktadır (Rodak vd 2021). En iyi

bilinenlerden gurana meyvesinde, çay yapraklarında, kakao çekirdeklerinde, kola fındığında bulunmaktadır. Guarana bitkisi kafein içeriği en yüksek bitkidir (Schimpl 2013). Bu bitkiler işlenerek özellikle kahve, çikolata, meşrubatlarda ve ağrı kesici özelliğinden dolayı bazı ilaçlarda kullanılan etken maddedir. Ek olarak kafeinli sakızların üretimi de söz konusudur.

Çizelge 2.1. Kafein içeren gıdalar ve içerisindeki kafein miktarları (USDA 2019)

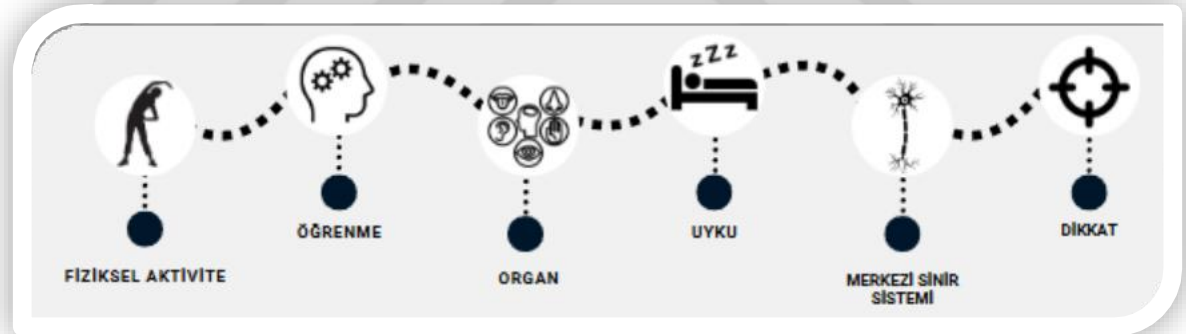
Tanımlayıcı Kod	Gıda	Porsiyon Ağırlığı (g)	Kafein (mg)
19165	Kakao	100	5710
19120	Sütlü Çikolata	100	20
14214	Hazır Kahve	100	3140
14210	Espresso	100	212
14366	Hazır Çay	100	5710
19081	Çikolata	100	66
14629	Enerji İçeceği	100	33
44258	Çikolatalı Puding	100	18
14148	Kola	100	9
19125	Çikolatalı fındık ezmesi	100	7

2.15. Kafeinin etkileri

Kafein, kullanım miktarına ve amacına göre hem faydalı hem de zararlı etkiler gösterebilir. Günlük 250 mg gibi düşük seviyelerde alındığında, mutluluk ve keyif verici etkiler yaratabilir. Ancak 500 mg gibi yüksek miktarlarda tüketildiğinde, sinirlilik, heyecan, kalp çarpıntısı, huzursuzluk ve kaygı gibi durumlara yol açarak kişinin ruh halini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Rodak vd 2021). Yapılan çalışmalar sonucunda kafeinin uyku durumunu geciktirdiği de ortaya konulmuştur (Penetar 1993). Kafein, uyku ihtiyacını ortadan kaldırmaz ancak uykulu olma durumunu geçici olarak gizleyerek kişinin uykulu haldeyken en iyi şekilde performans sergilemesine katkı sağlayan bir uyarıcıdır.

2.16. Kafeinin olumlu etkileri

Kafein tüketiminin çeşitli sistemler üzerinde farklı etkileri bulunmaktadır (Şekil 2.6). Kas sistemini etkileyen kafein, kişinin yorgunluk, uyuklama ve ağrı hislerini azaltmasına yardımcı olabilir (Yıldırım 2024). Kolayca kan-beyin bariyerlerini aşarak merkezi sinir sistemini de etkileyebilmektedir (Demirci 2022) Beyne giden ve beyinden gelen mesajların iletim süresini hızlandırarak beyin üzerinde etkili olur (Nehlig 1992). Ayrıca, öğrenme ve hafıza üzerinde çeşitli etkileri bulunmaktadır. Reaksiyon süresini kısalttığı, uyanıklığı artırdığı, odaklanmayı geliştirdiği ve motor koordinasyonunu iyileştirdiği bilinmektedir. Farklı organlar üzerinde de olumlu etkiler göstermektedir. Örneğin, kafein alımının ardından açığa çıkan teobromin, damarların genişlemesine yardımcı olur. Bu sebeple kafein astım ve prematüre apnesi gibi çeşitli solunum hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Han vd. 2022). Kafein tüketimi, göz bebeklerinin genişlemesine yardımcı olarak kişinin görüşünü daha net hale getirir. Modern çağın hastalıklarından diyabet ve kanser için ise antidiyabetik ve antikanser özelliklere sahip olduğu söylenmektedir (de Sotillo and Hadley 2002; Abokyi vd. 2017; Nigra vd. 2021). Araştırmalar, kafeinin Huntington, Parkinson, epilepsi, şizofreni ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasını engelleyebileceğini veya mevcut hastalıkların ilerleyişini yavaşlatabileceğini göstermektedir (Rodak vd. 2021). Son olarak, antioksidan özelliği sayesinde oksidatif stresi azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (Vieira vd. 2020).



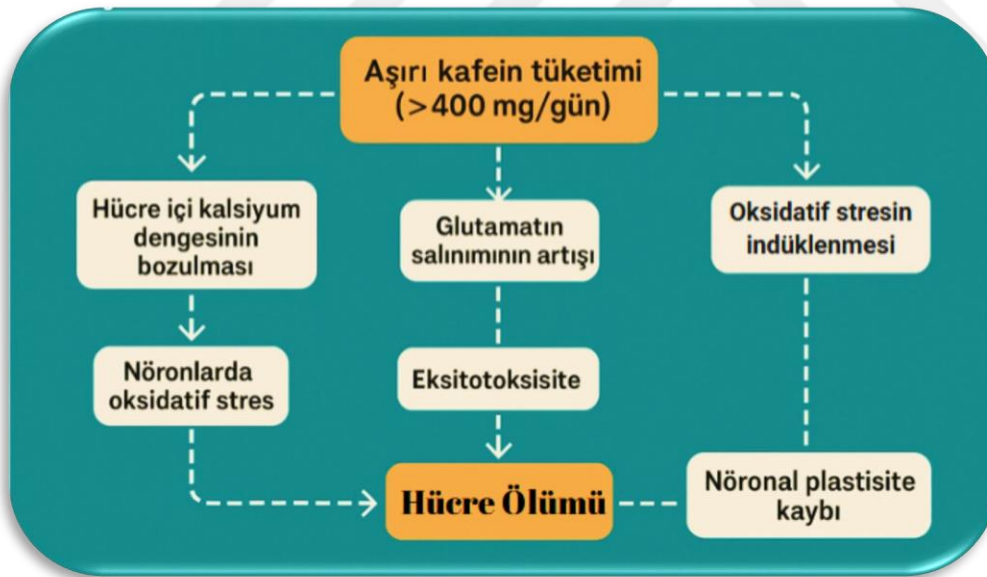
Şekil 2.6. Kafeinin etki ettiği durumlar ve sistemler

2.17. Kafeinin olumsuz etkileri

Günlük olarak 300 mg'dan fazla kafein alımının, bireyler üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceği gösterilmiştir. Bu miktarın üzerindeki kafein tüketimi, kalp çarpıntısı, yüksek tansiyon, agresif davranışlar, yüz kızarması, idrar miktarında artış, sinirlilik ve depresyon gibi durumlara yol açabilmektedir (Rodak vd. 2021). Kafein tüketiminin aniden durdurulması halinde, bireyde baş ağrısı, kas ağrısı ve kaygı gibi etkiler meydana gelebilir. Özellikle hamileliğin ilk üç ayında annenin günde 150 mg'dan fazla kafein almasının, spontan düşük yapma, rahim içi büyüme kısıtlaması (IUGR), düşük doğum ağırlığı (LBW) ve erken doğum riskini artırabileceği düşünülmektedir (Deniz 2015).

2.18. Kafeinin nörotoksik etkileri

Kafein, merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı etkilere sahip olduğu bilinen bir psikoaktif maddedir. Bununla birlikte, yüksek dozlarda veya sürekli kullanımı durumunda nörotoksik etkiler gösterebileceği bilinmektedir (Temple vd. 2017; Morsy vd. 2024). Kafein, adenosin reseptörlerini antagonize ederek nöronal aktiviteyi artırmaktadır. Bu durum başlangıç aşamasında bilişsel fonksiyonlarda geçici bir iyileşme sağlaması mümkün olmaktadır (Nehlig 2016; Smith 2022). Kafein tüketiminin nörolojik etkileri üzerine yapılan araştırmalar, hem olumlu hem de olumsuz sonuçlar ortaya koymaktadır. Aşırı kafein alımı, hücre içi kalsiyum dengesini bozarak oksidatif stres ve hücre ölümüne neden olabilir (Chen vd. 2018; Wang ve Chen 2024). Ayrıca, glutamat salınımını artırarak eksitotoksisiteye yol açabilir ve bu durum nörodejeneratif süreçleri hızlandırabilir (Fredholm vd. 1999). Kronik kafein tüketimi, nöronal plastisiteyi olumsuz etkileyebilir ve sinaptik bağlantılarda bozulmalara neden olabilir (Temido-Ferreira vd. 2020). Öte yandan kafeinin nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu potansiyel taşıdığı da bildirilmektedir. Nrf2 ve A2A reseptör yolları üzerinden oksidatif stresle mücadele ederek Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında koruyucu etki gösterebilir (Ikram vd. 2020). Ayrıca A β -toksisitesi ve NO-bağımlı nöroinflamasyonu baskılayarak nöron koruyucu etki sağladığı gözlemlenmiştir (Song vd. 2024). Bu bulgular, kafeinin nörolojik sağlık üzerindeki karmaşık etkilerini anlamada önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 2.7. Aşırı kafein tüketiminin nörotoksik etkileri (Wang ve Chen 2024)

Kafeinin dopaminerjik sistem üzerindeki etkileri, nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynayabilir (Fisone vd. 2004; Song vd. 2024). Özellikle hipokampus gibi bellek ve öğrenme süreçleriyle ilişkili beyin bölgelerinde kafeinin nörotoksik etkileri gözlemlenmiştir (Cunha ve Agostinho 2010; Temple vd. 2017). Uzun

sürekli kafein kullanımı bu etkileri daha belirgin hale getirebilir (Lorist ve Tops 2003). Kafeinin nörotoksik potansiyeli, bireylerin genetik yatkınlıkları ve metabolizma hızlarındaki farklılıklar nedeniyle çeşitlilik gösterebilir (Cornelis vd. 2011). Genetik polimorfizmler, bireylerin kafeine karşı duyarlılık seviyelerini etkileyebilir (Yang vd. 2010). Bu sebeple kafeinin nörotoksik potansiyeli, özellikle uzun süreli ve yüksek doz maruziyet durumlarında dikkate alınması gereken bir konudur.

2.19. Günlük kullanımda kafein



Şekil 2.8. İçeceklerin kafein içeriği (Zduńska 2023)

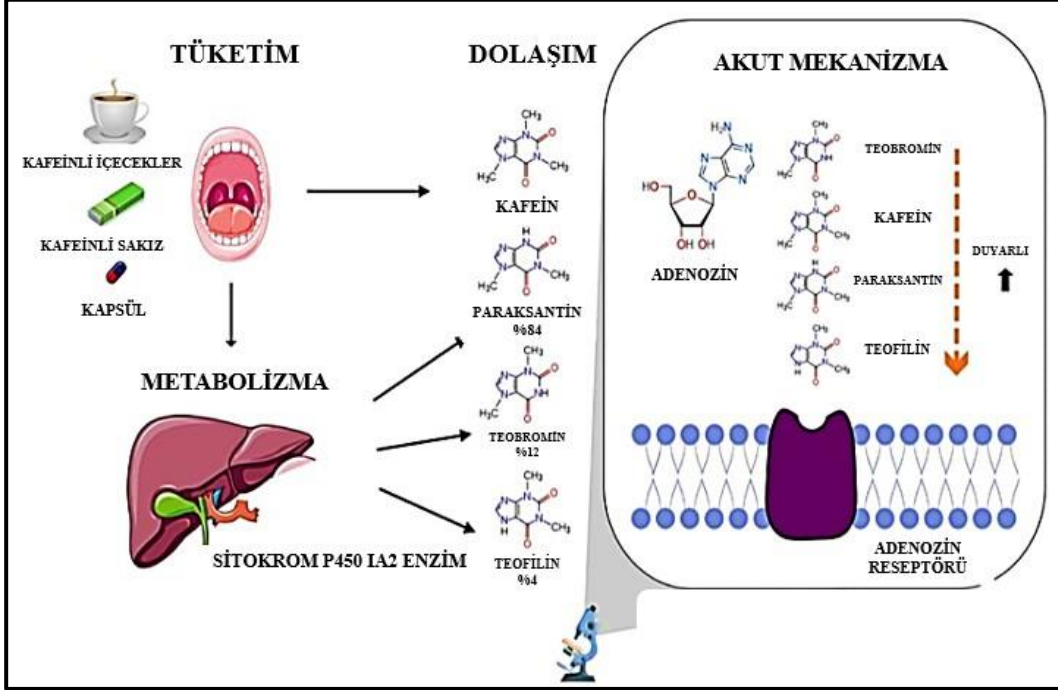
Günlük 300 mg'a kadar kafein tüketimi normal kabul edilirken, 300 mg'dan fazla kafein alımı kafein toksisitesine yol açabilir. Özellikle 400-800 mg arasında kafein tüketimi, kafein toksisitesine sebep olmaktadır (Zduńska 2023). Kafein toksisitesi, mide bulantısı, baş dönmesi, ellerde titreme, baş ağrısı ve kusma gibi belirtilerle kendini gösterir. toksisite seviyesi yükseldikçe halüsinasyonlar, kaslarda yıkım, sindirim sistemi sorunları ve psikoz gibi daha ciddi durumlar meydana gelebilir (Hancı vd. 2013). Günlük 5-10 gram kafein alımı hayatı tehdit edebilir ve ölümle sonuçlanabilir (kablan ve Erdem 2022). Bu miktarda kafein tüketimi, 75 fincan kahveye, 125 fincan çaya ve 200 kutu kolaya denk gelmektedir. Alınan gıdanın türü, kafein miktarını etkilemektedir (Şekil 2.8). Örneğin 30 mg'lık sütlü çikolata içinde 6 mg kafein bulunurken, aynı miktardaki bitter çikolatada 60 mg kafein yer almaktadır. Tükettiğimiz kahvenin yoğunluğu veya hazır mı yoksa evde mi hazırlandığı, içeriğindeki kafein seviyesini etkiler. Örneğin filtre

kahvenin mililitresinde 85 mg kafein varken, aynı hacimdeki hazır kahvede bu miktar 65 mg'dır.

2.20. Kafein metabolizması

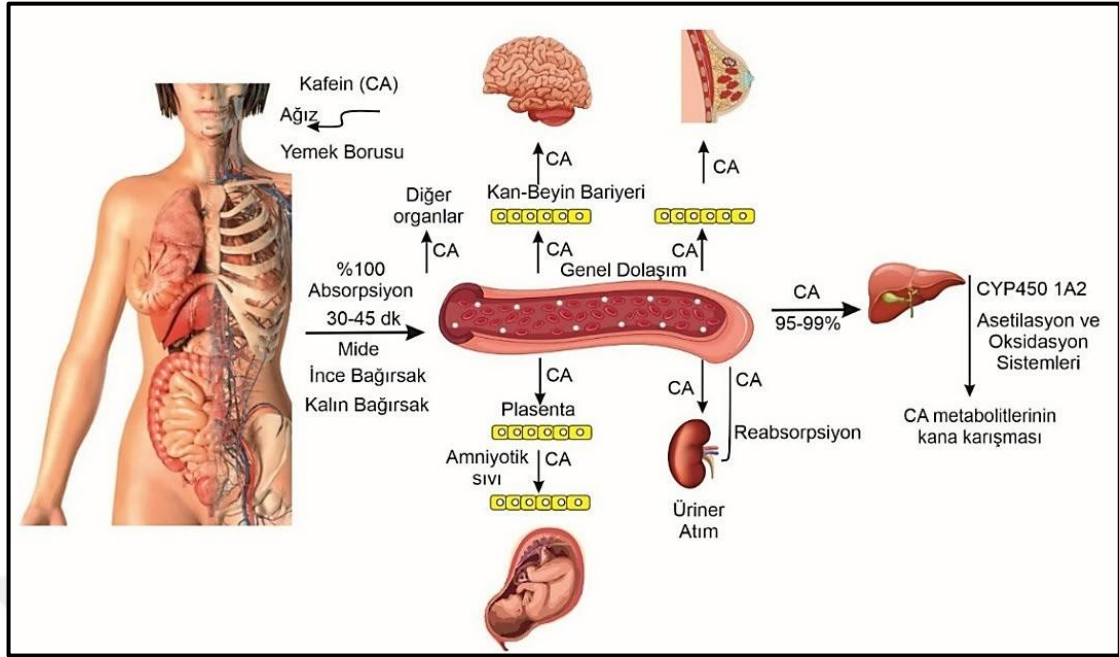
Kafein, oral alım sonrası 35-40 dakika içerisinde ince bağırsaklarda emilerek kan dolaşımına geçer. Ağızdan alındıktan sonra vücutta nasıl bir dönüşüm geçirdiği, şekil 2.9'da gösterilmiştir. İnce bağırsaklardan tamamen emilen kafein, lipofilik yapısı sayesinde kan-beyin bariyerini kolaylıkla aşarak merkezi sinir sistemine ulaşır ve etkiler (Nehlig ve Debry 1994; Sharma ve Thakur 2023). Plasenta bariyerini geçerek embriyoya ulaşır ve gonad bariyerlerini aşarak üreme organlarına etki etmektedir (Miners ve Birkett 1996; Qian vd. 2018). İnsan vücudunda kafein metabolize edildiğinde, %84 paraksantin, %12 teobromin ve %4 teofilin oluşmaktadır (Barcelos vd. 2020). Paraksantin, lipoliz

sürecini hızlandırarak kan plazmasındaki gliserol ve yağ asidi seviyelerinde artışa yol açmaktadır. Teobromin, vazodilatasyon etkisi göstererek kan damarlarının genişlemesine ve idrar hacminde artışa neden olmaktadır. Teofilin ise düz kasların gevşemesini sağlaması nedeniyle özellikle astım tedavisinde klinik kullanım alanı bulunmaktadır.



Şekil 2.9. Kafeinin karaciğerde metabolitlerine dönüşümü (Barcelos vd. 2020)

Kafeinin metabolizması karaciğerden salgılanan CYP450 1A2 enzimi ile gerçekleşmektedir (Çimen ve Erdem 2022). Kafein alımının artmasıyla birlikte, karaciğerden CYP450 1A2 enziminin salınımında bir artış gözlemlenmektedir. Kafein, bu enzim aracılığıyla aktif metabolitlerine dönüştürülmektedir (Şekil 2.10). Nikotin, sigara dumanı ve lahanagiller gibi faktörler CYP450 1A2 enziminin salınımını teşvik ederken, greyfurt suyu, lidokain ve takrin gibi bileşikler ise bu enzimin salınımını inhibe etmektedir (Aydın ve Dede 2016). İnsanlarda kafeinin yarılanma süresi ise 3 ila 7 saat arasında değişmektedir (Fredholm vd. 1999; Juliano ve Griffiths 2004). Kafein alındığında, ağız ve midede bir miktar emilir. İnce bağırsaklardan tamamen emilen kafein, vücutta önemli doku ve organlara kolayca ulaşmaktadır.



Şekil 2.10. Kafeinin vücut içerisinde ulaştığı doku ve organlar (Aydın ve Dede 2016)

Karaciğerde gerçekleşen bu metabolik dönüşüm, bireyin enzim düzeyi, genetik özellikleri, patojenik durumu, beslenme alışkanlıkları, hormonal durumu ve kafein konsantrasyonuna bağlı olarak kafeinin parçalanma süresinde değişikliklere yol açmaktadır. Kafein, vücuda alındıktan sonra anne sütü, ter, meni ve tükürük gibi birçok biyolojik örnekte tespit edilebilmektedir. Kafeinin yaklaşık %0,5-10'u ise metabolize edilmeden doğrudan safra ve idrar yoluyla vücuttan atılmaktadır (Aydın ve Dede 2016). Kafein vücuttan büyük ölçüde böbrekler yoluyla atılırken az miktarda da tükürük ve ter ile dışarı atılmaktadır.

2.21. Kafeinin Etkisi

Kafein, düşük dozlarda (yaklaşık 20-200 mg) tüketildiğinde, bilişsel işlevlerde iyileşmeler sağlama potansiyeline sahiptir. Bu doz aralığında, dikkat, reaksiyon süresi ve hafıza gibi alanlarda uyarıcı etkiler gözlemlenebilir (Socała vd. 2020). Ayrıca adenosin reseptörlerini antagonize ederek nöronal aktiviteyi düzenler ve bu süreçte antioksidan savunma sistemini aktive eder (Ikram vd. 2020).



Şekil 2.11. Kafeinin zamana bağlı olarak değişen etkileri (Fredholm vd. 1999)

Kafein, düşük dozlarda glukoz metabolizmasını düzenleyerek insülin duyarlılığını artırabilirken, yüksek dozlarda glukoz intoleransı ve insülin direnci riskini artırabilir (Stefanello vd. 2014). Bu çift yönlü etkilerin, kafeinin GLUT4 ekspresyonu, mitokondriyal fonksiyonlar ve serbest radikal üretimi üzerindeki etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Fatima vd. 2023).

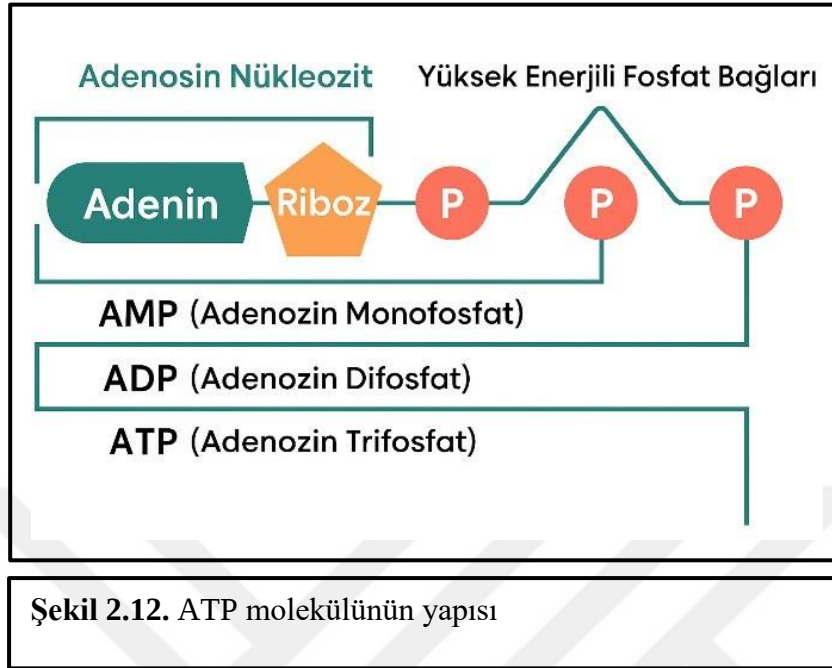
2.22. Kafeinin yarılanma ömrü

İnsanlarda kafeinin yarılanma ömrü 3 ila 7 saat arasında değişiklik göstermektedir. Ancak bu süre, bireyin genel sağlık durumu, yaşam tarzı ve yaş gibi faktörlere bağlı olarak farklılık arz etmektedir.

Hamile bireylerde kafeinin yarılanma ömrü belirgin bir şekilde uzamakta ve 9 ila 11 saat aralığına kadar çıkabilmektedir (Dündar 2022). Obez bireylerde ise kafeinin metabolize edilme sürecinin yavaşladığı ve vücuttan atılımının azaldığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, obez kadınların zayıf kadınlara kıyasla daha yüksek düzeyde paraksantin, teobromin ve teofilin salgıladığı gözlemlenmiştir (Harpaz vd. 2017; Sınar vd. 2019)

Kafeinin yarılanma ömrü, yenidoğanlar ve çocuklarda yetişkin bireylere kıyasla daha uzundur. Yenidoğanların karaciğerinde sitokrom P450 enzim miktarının düşük olması nedeniyle kafeinin metabolize edilme süresi yavaşlamakta ve yarılanma ömrü 30 saate kadar uzayabilmektedir. Ergenlik dönemindeki bireylerde ise metabolik süreçler daha hızlı gerçekleştiğinden, kafeinin yarılanma ömrü daha kısa olmaktadır (Aydın ve Dede 2016)

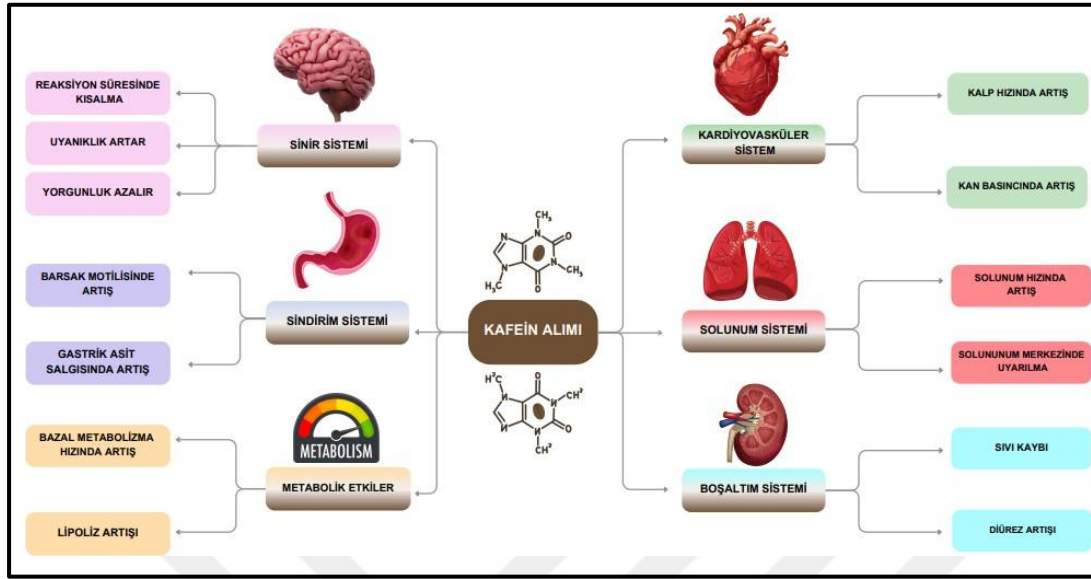
2.23. Kafein mekanizması



ATP'nin parçalanması sonucu ortaya çıkan doğal bir molekül olan adenosin (Şekil 2.12) beyindeki adenosin reseptörlerine bağlanarak kişide yorgunluk, bitkinlik ve ağrı hislerine yol açmaktadır. Kafeinin adenosine benzer üç boyutlu bir yapıya sahip olması, onun adenosin reseptörlerine

bağlanabilmesine olanak tanımaktadır. Kafein, adenosin reseptörlerine adenosine kıyasla daha yüksek bir afiniteye sahip olduğundan, vücuda alındığında reseptörlere adenosin yerine kafein bağlanmaktadır. Kafeinin adenosin reseptörlerine bağlanması, adenosinin bağlanmasını engelleyerek adenosinin fizyolojik etkilerini baskılamaktadır. Kısa süreli düzenli kafein tüketiminin, adenosin reseptörlerinin sayısını artırarak belirli bir miktarda alınan kafeinin etkilerinin zamanla azaldığını ortaya koyduğu bildirilmiştir (Grgic ve Mikulic 2021). Özetle, adenosin reseptörlerine bağlanan adenosin miktarı arttıkça bireyin yorgunluk ve bitkinlik hissi de artmaktadır. Memelilerde A1, A2A, A2B ve A3 olmak üzere dört farklı adenosin reseptörü bulunmaktadır (Landolt 2008). Kafein metabolizmasında özellikle A1 ve A2 reseptörleri etkili rol oynamaktadır. Kafein, adenosinin neden olduğu uyku ve yorgunluk hissini doğrudan ortadan kaldırmaz, fakat bu etkilerin ortaya çıkmasını engelleyerek uykuyu geciktirir.

2.24. Kafeinin farmakolojik etkileri



Şekil 2.13. Kafeinin sistemler üzerindeki etkisi (Nehlig vd. 1992)

Kafein, dünya genelinde en yaygın tüketilen psikoaktif maddelerden biri olup, hem olumlu hem de olumsuz etkiler gösterebilen bir bileşiktir (Ikram vd. 2020). Günlük düşük dozlarda tüketildiğinde, kafeinin dikkat ve konsantrasyonu artırdığı, bilişsel performansı iyileştirdiği ve fiziksel dayanıklılığı artırdığı bilinmektedir (Smith vd. 2017). Ancak, yüksek dozlarda ve uzun süreli tüketiminde, kafein anksiyete, uykusuzluk ve taşikardi gibi yan etkilere neden olabilir (Fatima vd. 2023). Ayrıca, nöronal hücrelerde kalsiyum homeostazının bozulması yoluyla nörotoksik etkiler oluşturabileceği rapor edilmiştir (Fatima vd. 2023).

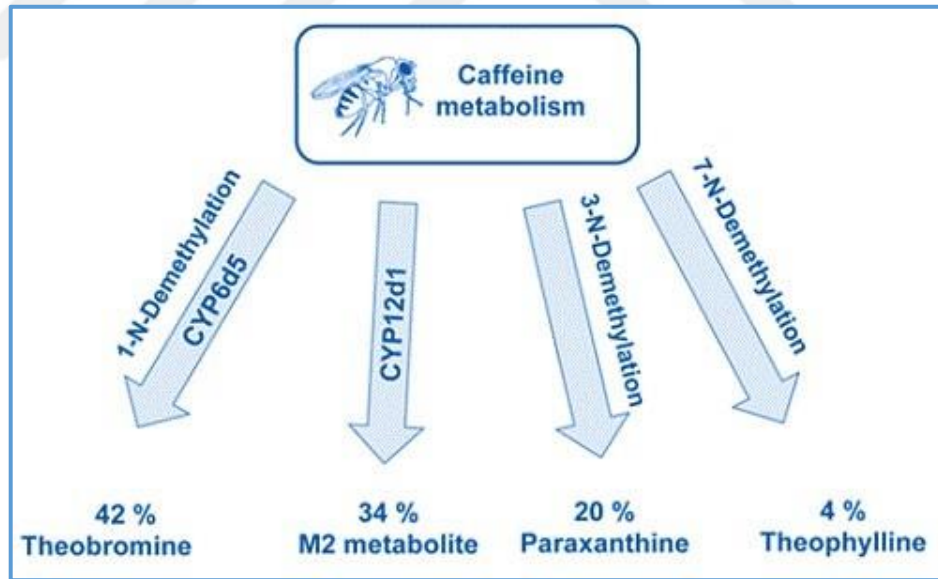
2.25. *D. melanogaster*'de kafein mekanizması

Kafein, merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı etkileriyle tanınan bir bileşiktir ve bu etkilerin biyolojik mekanizmalarını anlamak için *D. melanogaster* sıkça kullanılan bir model organizmadır. Yapılan araştırmalara göre, belirli dozlarda kafein verilen sineklerin ömrü, kontrol grubuna kıyasla daha uzun olmuştur (Nikitin ve Navitskas 2008). Ayrıca *Drosophila*'nın genetik yapısının iyi bilinmesi, kafeinin vücutta nasıl metabolize edildiğini anlamada büyük avantaj sağlar. Kafeinin metabolizmasında görev alan sitokrom P450 enzimleri bu modelde detaylı incelenmiştir (Coelho vd. 2015). Kafeinin sinir sistemi üzerindeki etkileri de araştırılmış ve uyku-uyanıklık döngüsünü değiştirdiği bulunmuştur (Lin vd. 2010). Kafeinin Cyp6a2 ve Cyp6a8 gibi genlerin ekspresyonunu artırdığı ve bunun sinyal yollarıyla düzenlendiği belirlenmiştir (Bhaskara vd. 2008). Genetik etkiler açısından, kafeinin sineklerde mutasyon oranlarını artırabildiği ve potansiyel bir mutajen olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Clark ve Clark 1968). *Drosophila*, öğrenme ve hafıza gibi davranışsal etkileri gözlemlemek için de kullanılır (Asbah vd. 2021). Daha önceki yapılan araştırmalar sonucunda *D. melanogaster* bireylerinde 1 - 2 mg / ml oranında kafein miktarı ölümcül dozlar olduğu, 0,2 – 0,5 mg /

ml konsantrasyonunun ise zararlı ama ölümcül olmayan kafein dozu olarak bildirilmiştir (Nikitin vd. 2008; Wu vd. 2009; Nall vd. 2016; Scanlan vd. 2022). Tez kapsamında moleküler çalışmalarda *D. melanogaster* bireylerine 0,1 – 05 mg / ml dozları uygulanmıştır.

Yapılan çalışmalar, kafeinin akut uygulamasının (8-12 saat boyunca 0,25-5,0 mg/ml) *D. melanogaster* bireylerinde de uyku süresini azalttığını ortaya koymuştur (Hendricks 2000). *D. melanogaster* bireylerinde kafein metabolizması incelendiğinde, memelilerdeki kafein metabolizmasına benzer bir süreç izlediği gözlemlenmiştir. Sitokrom enzimleri, böceklerde gelişim ve detoksifikasyon süreçlerinde kritik öneme sahip olup, çeşitli kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, kafeinin metabolizasyonunda da rol oynayan enzimler arasında yer almaktadır. *D. melanogaster*'de kafein parçalandığında, metabolitlerin yaklaşık %42'sinin teobromin, %34'ünün memelilerde bir karşılığı bulunmayan M2 metaboliti, %20'sinin paraksantin ve %4'ünün teofilin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.14) (2015).

Organizma	Theobromine	Paraxanthine	Theophylline	1,3,7-trimethyluric asit	M2
<i>Drosophila</i>	42.41 ± 1.70	20.25 ± 0.46	3.59 ± 0.71	Tespit edilmedi	33.75 ± 0.70
Sıçan	8	13	9	70	-
İnsan	7	70	8	15	-



Şekil 2.14. *D. melanogaster*'de kafein parçalanmasıyla açığa çıkan metabolitleri (Coelho 2015)

D.melanogaster bireylerinde memelilerde bulunan A1 ve A2A reseptörlerine benzer özellikler gösteren *dAdoR* adenosin reseptörü bulunmaktadır. *dAdoR* null mutant bireylerde yapılan çalışmalar, kafeinin benzer sonuçlar doğurduğunu göstermiştir. Bu durum kafein metabolizması üzerinde farklı faktörlerin de etkili olabileceğini

düşündürmüş ve sonraki araştırmalarda bu faktörün uyanıklığı teşvik eden nörotransmitterlerden biri olan dopamin sentezi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Andretic vd. 2008). Kafein tüketiminin, sinekler ve insanlar arasında benzer davranışsal etkiler göstermesi *D. melanogaster*'deki etki mekanizmasının anlaşılmasının memelilerdeki olası etkilerin öngörülmesine katkı sağlayabileceği düşüncesini desteklemektedir.

Sonuç olarak *D. melanogaster*'in genetik olarak kolay manipüle edilebilmesi, kısa yaşam döngüsü, düşük maliyetli oluşu ve kafeine karşı fizyolojik ve davranışsal olarak belirgin yanıtlar vermesi, onu kafein araştırmaları için ideal bir model organizma haline getirmektedir.



3. MATERYAL – YÖNTEM

3.1. Kullanılan kimyasallar

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar

KULLANILAN KİMYASALLAR		
Kafein ($C_8H_{10}N_4O_2$)	Sarcosine	Agar-agar
Sükroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	Fosfat tamponu (PBS)	Potasyum klorür
Orto-fosforik asit (H_3PO_4)	Etidyum bromür	Ringer's Solüsyonu
Propiyonik asit ($C_3H_6O_2$)	Trizma Base BioUltra	Etanol (%70)
Glasiyel asetik asit (CH_3COOH)	Agaroz (LMA)	Feniltiyöre
Sodyum hidroksit (NaOH)	Agaroz (NMA)	Sulforhodamine B
Etilendiamin tetraasetik asit (Na_2EDTA)	HEPES	Brillant Blue FCF
Sodyum klorür (NaCl)	Coomassie Blue (Bradford)	

3.2. Kullanılan cihazlar

Çizelge 3.2. Çalışma kapsamında deneylerin yürütülmesinde kullanılan cihazlar

KULLANILAN CİHAZLAR		
CİHAZ	MARKA	MODEL
Stereo Mikroskop	Nikon	SMZ645
Florasın Mikroskop	Nikon	Eclipse E-200
Santrifüj	Beckman coulter	Allegra X-22R
Elektroforez Tankı	SCIE-PLAS	HU20
Mikrodalga	VESTEL	MD-GDX30
Buzdolabı	VESTEL	Lotus555Deep A
Steril Kabin	JSR	JSCB-1200SB
Hassas Terazı	Precisa	XB 320M
Vortex	VWR	Cat No. 12620-856
Manyetik Karıştırıcı	DLAB	MS-H-S10
Ph Metre	Ohaus	a-AB23PH
Çoklu Plate Çalkalayıcı	Biosan	MPS-1
Monitör	Samsung	S22D300
PCR	NYX Teknik	A6

3.3. Kullanılan kitler

Çizelge 3.3. Çalışmada yer alan deneyler için kullanılan kitler

KULLANILAN KİTLER		
ÜRÜN	MARKA	CAT NO.
Lipid Peroksidasyonu	BT Lab	E0726Hu
TOS	Rel Assay Diagnostics	LOT. KM24156A
TAS	Rel Assay Diagnostics	LOT. KM241730
RNeasy Mini Kit	Qiagen	LOT. 166013553

3.4. *Drosophila melanogaster*



Şekil 3.1. Yabanıl Tip *D. melanogaster*

D. melanogaster, genetik çalışmalarında sıkça kullanılan ve bilim dünyasında önemli bir yer edinen bir model organizmadır (Schmidt vd. 2006). Bu küçük sinek türü, hayvanlar âlemi içinde Eklem bacaklılar (Arthropoda) şubesine ve Böcekler (Insecta) sınıfına aittir. Çift kanatlılar (Diptera) takımının Drosophilidae familyasında yer alan *Drosophila*, özellikle genetik ve biyolojik araştırmalarda çokça tercih edilmektedir (Schmidt vd. 2006). *Drosophila*'nın cins adı olan "*Drosophila*", "çürüyen meyveyi seven" anlamına gelirken tür adı "*melanogaster*" ise "siyah karın" anlamını gelmektedir

(O'Grady ve DeSalle 2018). Bu türün doğal yaşam alanlarında yaygın olarak bulunan yabancı tipleri, kırmızı petek gözlü, uzun kanatlı ve açık renk vücutlu fenotipik özelliklere sahiptir. Boyları genellikle 2 ila 4 mm arasında değişmektedir (Roberts 2006). *D. melanogaster*'in genetik araştırmalarda bu denli yaygın kullanılmasının sebeplerinden biri de hızlı üreme döngüsüne sahip olmasıdır. Bu özellik, bilim insanlarının genetik varyasyonları ve mutasyonları kısa sürede gözlemleyebilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca birçok farklı fenotipe ve davranış özelliklerine sahip yaklaşık 1500 türü bulunmaktadır. Bu çeşitlilik, *D. melanogaster*'i biyolojik çeşitlilik ve evrimsel süreçlerin incelenmesi açısından değerli kılmaktadır (Sato vd. 2020).

Sonuç olarak *D. melanogaster* sadece genetik çalışmalar için değil, ekoloji ve evrimsel biyoloji alanlarında da önemli bir rol oynamaktadır. Bu küçük sinek türü, bilim dünyasında model organizma olarak kabul edilmekte ve birçok araştırmada kullanılmaktadır. Bu nedenle *D. melanogaster*, bilimsel literatürde sıkça atıfta bulunulan bir organizma olmuştur (Ong vd. 2015; Rocha 2013).

D. melanogaster biyolojik araştırmalarda model organizma olarak tercih edilmesinin en önemli nedenlerinden biri, son derece kısa yaşam döngüsüne sahip olmasıdır (Beckingham vd. 2005). Uygun sıcaklık koşullarında (25°C) yumurtadan erişkin bireye geçiş sadece yaklaşık 10 gün sürer ve bu da kısa sürede çok sayıda nesil üretmeye olanak tanır (Rocha 2013; Flatt 2020). Dişi bireylerin günlük olarak 100'den fazla yumurta bırakabilmesi büyük deneysel popülasyonların oluşturulmasını kolaylaştırır ve istatistiksel güvenilirliği artırır (Reaume ve Sokolowski 2006). Bunun yanında, küçük boyutları ve basit beslenme ihtiyaçları sayesinde laboratuvar ortamında yüzlerce bireyin düşük maliyetle yetiştirilmesi mümkündür. Genetik yapısı açısından da oldukça elverişli bir türdür; *D. melanogaster* yaklaşık 14.000 gene sahiptir ve bu genlerin %75 kadarı insan hastalıklarıyla ilişkili genlerin homologlarıdır (Markow ve O'Grady 2005; Reaume ve Sokolowski 2006; Mirzoyan vd. 2019). Bu durum, özellikle nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve metabolik bozukluklar gibi konuların genetik düzeyde modellenmesini mümkün kılar. Çok sayıda genetik araç bu organizma için optimize edilmiştir. Özellikle UAS-GAL4 sistemi, belirli genlerin hedef dokularda veya zamansal olarak düzenlenmesini sağlayarak gen işlevlerinin detaylı analizine imkân tanır (Arias 2008). RNA interferansı (RNAi), CRISPR/Cas9 gibi ileri düzey genetik düzenleme teknikleri de bu türde yaygın olarak başarıyla kullanılmaktadır (Neville ve Goodwin 2012). Gelişimsel genetik çalışmaları açısından da idealdir; çünkü larvalarının bazı dokularında bulunan polytene kromozomlar, mikroskop altında kolayca gözlemlenebilir ve genetik haritalama için mükemmel bir kaynak oluşturur (Zykova vd. 2018).

Etik yönden bakıldığında ise, *D. melanogaster* omurgasız canlı sınıfında olduğu için pek çok ülkede deneysel kullanımında etik kurul iznine ihtiyaç duyulmaz; bu da bilim insanlarına önemli bir operasyonel kolaylık sağlar (Arias 2008). Son olarak *Drosophila*, merkezi sinir sistemi üzerine yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilir çünkü beyin yapısı sadedir öğrenme, hafıza, uyku, saldırganlık ve çiftleşme gibi davranışsal süreçleri incelemek için oldukça uygundur (Yamamoto ve Jallon, 1997; Jeibmann ve Paulus 2009). Bu özellik, epilepsi gibi nörolojik bozuklukların genetik modellerinin geliştirilmesini

mümkün kılar (Fischer vd. 2023). Gıda bilimi ve toksikoloji gibi farklı disiplinlerde de kullanılabilirliği bu organizmayı disiplinler arası araştırmalar için değerli kılar (Staats vd. 2018). Örneğin nanomalzemelerin toksik etkilerinin *in vivo* değerlendirilmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Ong vd. 2015).

3.5. *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü

D. melanogaster'de cinsiyet X kromozomunun otozomal kromozom takımına oranı ile belirlenmesi esasına dayanır:

Dişiler (XX), İki X kromozomuna sahipken erkekler (XY), bir X ve bir Y kromozomuna sahiptir. Ancak burada Y kromozomu cinsiyeti belirlemez, sadece erkek fertilitesi için gereklidir (Reaume ve Sokolowski 2006). Erkekler, çiftleşme davranışı sırasında "courtship song" üretir. Bu, kanatlarını titreştirerek çıkardıkları seslerdir ve dişinin çiftleşmeye hazır olup olmadığını anlamaya yarar. Dişiler, bu sinyalleri değerlendirerek çiftleşmeye izin verir ya da reddeder. Dişiler, sperm depolayabilir ve döllenmiş yumurtaları günler boyunca bırakabilirler (Neville ve Goodwin 2012).

D. melanogaster'in yaşam döngüsü dört ana evreden oluşur: yumurta, larva, pupa ve erişkin (imago) evreleri. Bu süreç, türün biyolojik özelliklerini ve çevresel adaptasyonlarını anlamamıza yardımcı olur.

1. Yumurta

D. melanogaster dişileri, döllenmiş yumurtalarını genellikle çürüyen meyve gibi nemli, organik maddeler üzerine bırakır. Yumurtalar yaklaşık 0,5 mm uzunluğunda, oval şekilli ve soluk beyaz renktedir. Yumurtanın ucunda bulunan iki "dorsal appendage" adı verilen solungaç benzeri yapılar, embriyonun oksijen almasını sağlar. Sıcaklığa bağlı olarak embriyo gelişimi 18°C'de yaklaşık 24 saat, 25°C'de ise 12 saat sürer (Campos-Ortega ve Hartenstein 2013).

2. Larva

Yumurtadan çıkan larva, ilk instar (L1) aşamasına girer. Larvalar renksiz ve şeffaf görünür, kaslı ve segmentli vücut yapısına sahiptir. Ağız kısımlarında "cephalic hook" adı verilen çene benzeri yapılar bulunur. Larva toplamda üç instar geçirir: L1: Yaklaşık 1 gün, L2: 1-1,5 gün, L3: 2-2,5 gün. Toplamda larva aşaması 4-5 gün sürer (25°C'de). Bu süreçte larva sürekli beslenir ve vücudu 200 kat kadar büyür (Bakker 1959). Son instar sonunda larva genellikle besin kaynağını terk ederek uygun bir yüzeye pupalanmak için hareket eder (Bownes ve Rembold 1987; Flatt 2020).

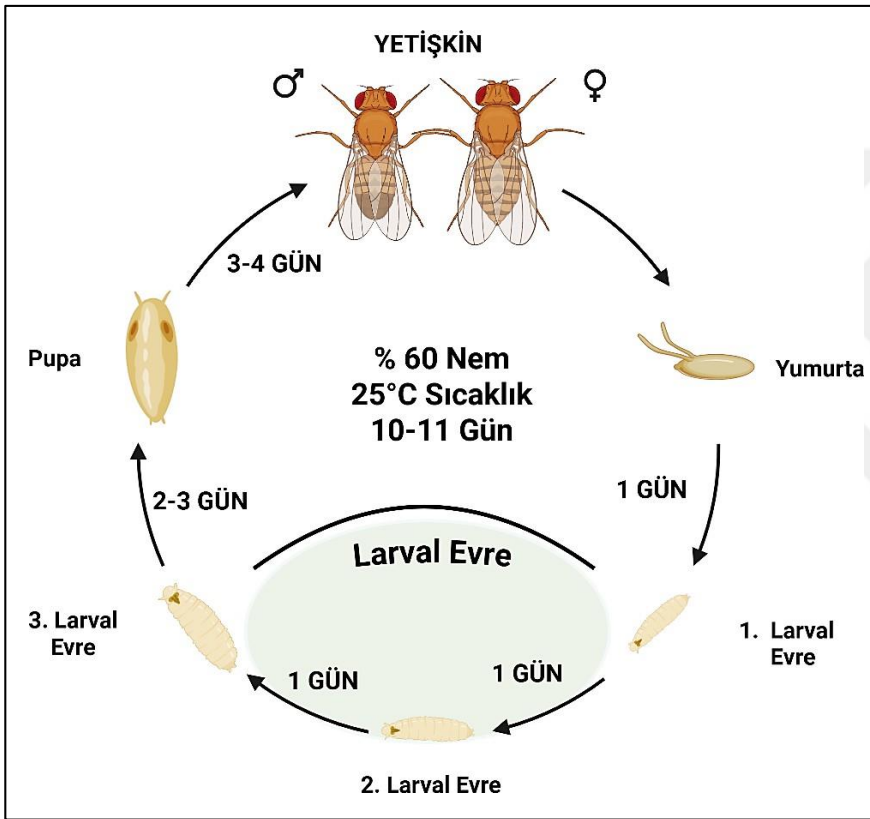
3. Pupa

Larva kendini sabit bir yüzeye yapıştırarak pupa haline gelir. Başta yumuşak ve soluk sarı-bej rengine olan pupa, dış yüzeyi sertleşerek koyu kahverengi bir kabuk oluşturur. Bu kabuğa puparium denir. Metamorfoz süreci burada gerçekleşir: larva yapıları parçalanır ve erişkin yapılar gelişir (Vijayalakshmi 2013). Bu aşama 4 gün sürer.

Son günlerde erişkin sineğin gözleri pupariumdan dışarıdan görülebilir hâle gelir (Azevedo ve Partridge 1997).

4. Erişkin (İmago)

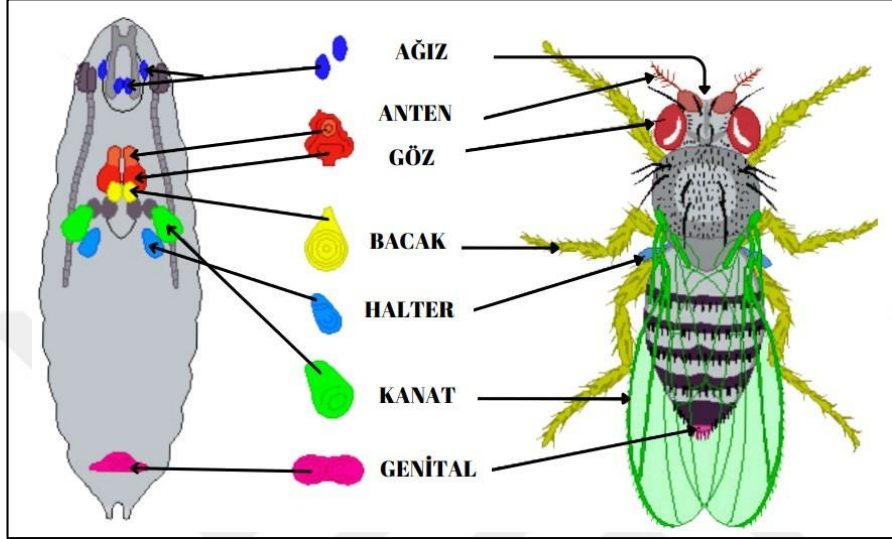
Pupariumdan çıkan sineğe imago denir. İlk çıktığında sineğin kanatları nemli ve kıvrıktır, vücut rengi soluktur. Birkaç saat içinde kanatlar açılır, sertleşir ve renklenir. Dişiler erkeklere göre daha büyük yapıdadır. Erkeklerin karın kısmı daha koyudur ve son abdominal segmentlerinde karakteristik siyah bantlar vardır. Cinsel olgunluk genellikle 8-12 saat içinde kazanılır. Dişi erişkin günde yaklaşık 100 yumurta bırakabilir ve ömrü ~50 gün civarındadır (laboratuvar koşullarında) (Reaume ve Sokolowski 2006).



Şekil 3.2. *D. melanogaster* yaşam döngüsü (Ong vd. 2015)

D. melanogaster larvaları, gelişim süreci boyunca oldukça aktif bir beslenme davranışı sergiler ve bu sırada ağız açıklıkları yaklaşık 50 - 200 mikrometre aralığında değişen boyutlara sahiptir. Larval dönemde besinlerle alınan çeşitli kimyasallar, gelişmekte olan imajinal disk hücrelerine ulaştığında bu hücrelerin genetik düzenlenmelerini etkileyebilir ve nihayetinde erişkin fenotip üzerinde belirgin sonuçlar doğurabilir (Martin vd. 2021). İmajinal diskler, larval evre boyunca aktif hücre bölünmeleri geçiren, erişkin yapıları oluşturacak olan epitel kökenli hücre kümeleridir. Bu yapılar, gelişimin sonlarına doğru farklılaşarak bacak, kanat, göz, anten gibi erişkin yapıları meydana getirir (Beira ve Paro 2016). Genital diskin aksine, diğer tüm imajinal diskler çift yapıdır. Baş bölgesinin oluşumunda görev alan ağız, anten ve göz diskleri

birlikte çalışarak kompleks bir morfolojik yapı oluşturur. *D. melanogaster*'de toplamda 19 adet imajinal disk bulunur; bunlar arasında bacak, halter, protoraks ve genital diskler yer alır (Lecuit ve Cohen 1997). Larval gelişim yaklaşık dört gün sürmekte olup bu süreçte imajinal disk hücrelerinin yaklaşık her 10 saatte bir bölündüğü bildirilmektedir. Hücresel yoğunluğu en fazla olan ve yaklaşık 50.000 hücre içeren kanat diskleri, bu yapılar arasında en büyüğüdür (Cohen 1993; Tripathi and Irvine 2022.).



Şekil 3.3. *D. melanogaster* imajinal diskleri ve ergin bireyde oluşturduğu yapılar (Aldaz vd. 2010)

D. melanogaster ile yapılan deneylerde standart Lewis besin ortamı kullanılmıştır (Graf ve Schaik 1992; Marcos ve Carmona 2013).

Çizelge 3.4. Standart *D. melanogaster* besin içeriği (Kaya 2000)

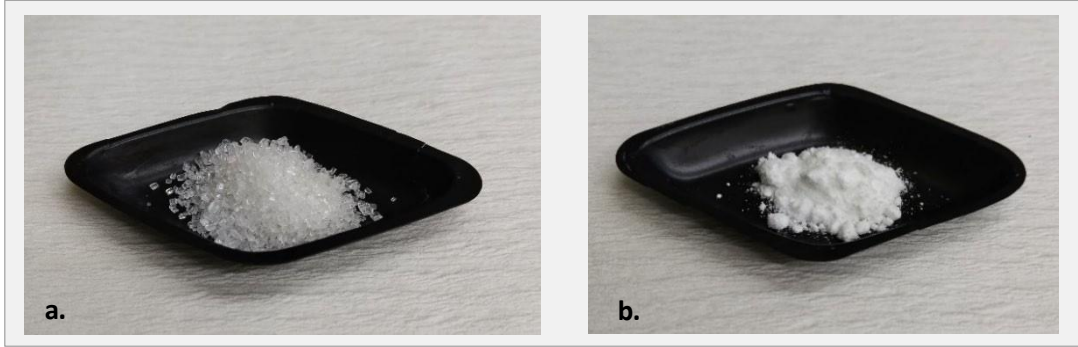
Ürün	Miktar	Kullanım Amacı
Mısır unu	104 gr	Karbonhidrat kaynağı olarak kullanılır
Toz şeker	94 gr	Besiyeri için cezbedici maddedir
Toz maya	19 gr	Karbonhidrat kaynağı ve yumurta verimini artırır
Agar	5 gr	Besiyerine katı bir kıvam vermesini sağlar
Distile su	1020 mL	Karışma ortamı oluşturur
Asit karışımı (Ortofosforik asit) (Propiyonik asit)	6 mL (83 mL) (836 mL)	Bakteri ve mantar oluşumunun engelleyerek mikroorganizma üremesinin önüne geçer.

3.6. *D. melanogaster* besiyeri hazırlanışı

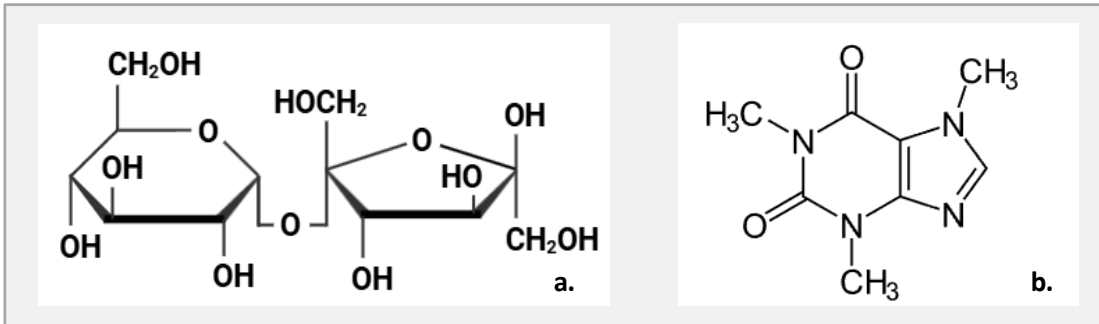
D. melanogaster besiyeri için kullanılan malzemeler marketlerden ya da buna benzer satış noktalarından oldukça kolay elde edilebilen ürünlerden oluşmaktadır. Bu besiyeri hazırlanırken sadece kullanılacak olan asit karışımı laboratuvar ortamından temin edilecektir. İlk olarak asit karışımı hariç mısır unu, şeker, maya, agar gibi malzemeler belirlenmiş ölçüde kaynatmanın yapılabileceği bir kaba konularak üzerine hazırlanmak istenilen hacimde distile su eklenir. Bir kaşık yardımıyla malzemeler topaklanmayacak şekilde karıştırılır ve kaynatmak için ocağa alınır. Kaşık yardımıyla karıştırılır ve kıvam alıp kaynayana kadar ocakta tutulur. Karışımın kaynamaya başlamasından 2 dakika sonra karışım ocaktan alınarak üzerine karışım oranlarına uygun miktarda asit karışımı eklenir. Besiyeri artık şişelere dökülmeye hazır hale gelir. Şişelerin dibinde 2 cm olacak şekilde besiyeri şişelere boşaltılır. Daha sonra şişelerin ağız kısmına ince bir örtü ya da buna benzer bir materyal serilir ve soğumaya bırakılır (Kaya 2000).

3.7. Çalışılan dozların hazırlanması

Tez kapsamında moleküler düzeydeki çalışmalar için; NŞ 0,1K - NŞ 0,5K - 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K olmak üzere 4 farklı doz kullanılmıştır. Davranış deneyleri için; NŞ 0,1K – NŞ 0,5K – NŞ 1K – NŞ 2K -2XŞ 0,1K – 2XŞ 0,5K - 2XŞ 1K - 2XŞ 2K - 4XŞ 0,1K - 4XŞ 0,5K - 4XŞ 1K - 4XŞ 2K - 8XŞ 0,1K - 8XŞ 0,5K - 8XŞ 1K - 8XŞ 2K dozları kullanılmıştır. Davranış deneyleri *D. melanogaster* bireylerinin 1. 3. ve 5. nesillerinde gerçekleştirilmiştir. Deneyler kapsamında *D. melanogaster* besiyeri farklı oranlardaki şeker ve kafein solüsyonları eklenerek hazırlanmıştır (çizelge 3.6).

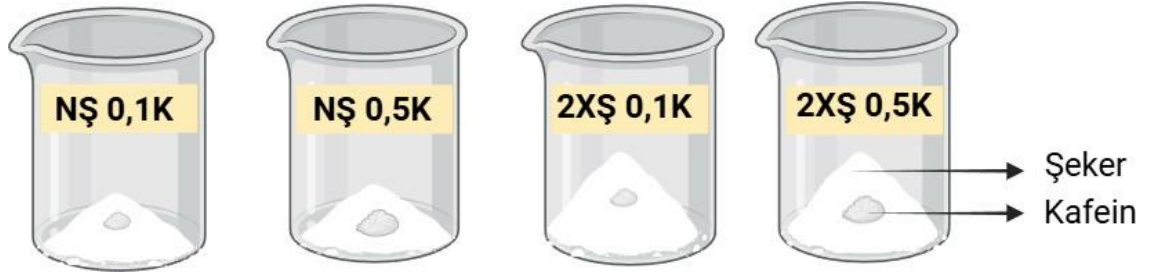


Şekil 3.4. Araştırma kapsamında kullanılan toz şeker (a) ve toz kafein (b)



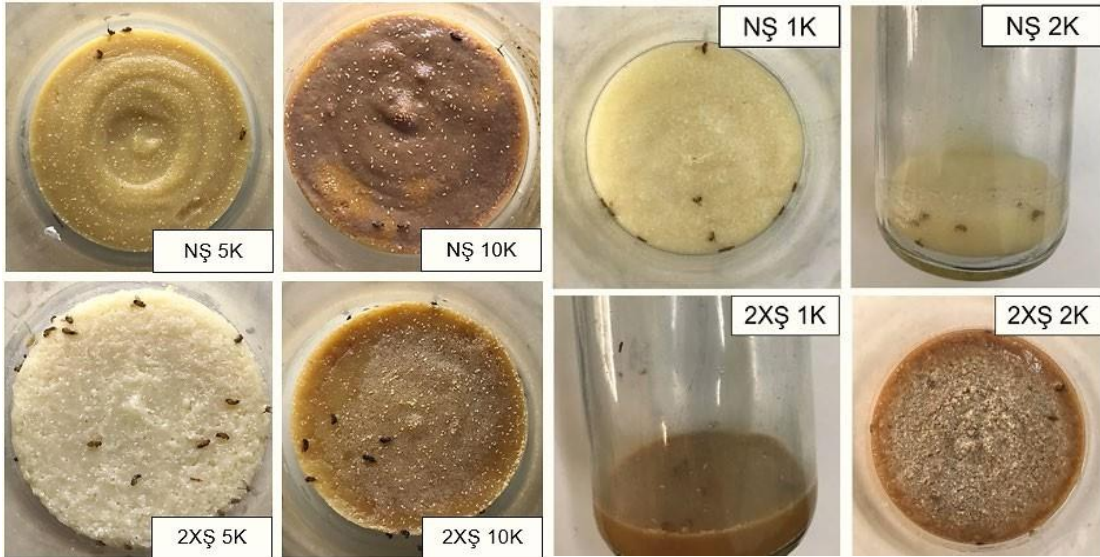
Şekil 3.5. Sükroz (a) ve Kafeinin (b) yapısal formülü

Besinler lewis besin ortamına göre hazırlanıp içerisine çalışmada yer alan dozlar eklenerek yüksek ateşte pişirilmiştir.

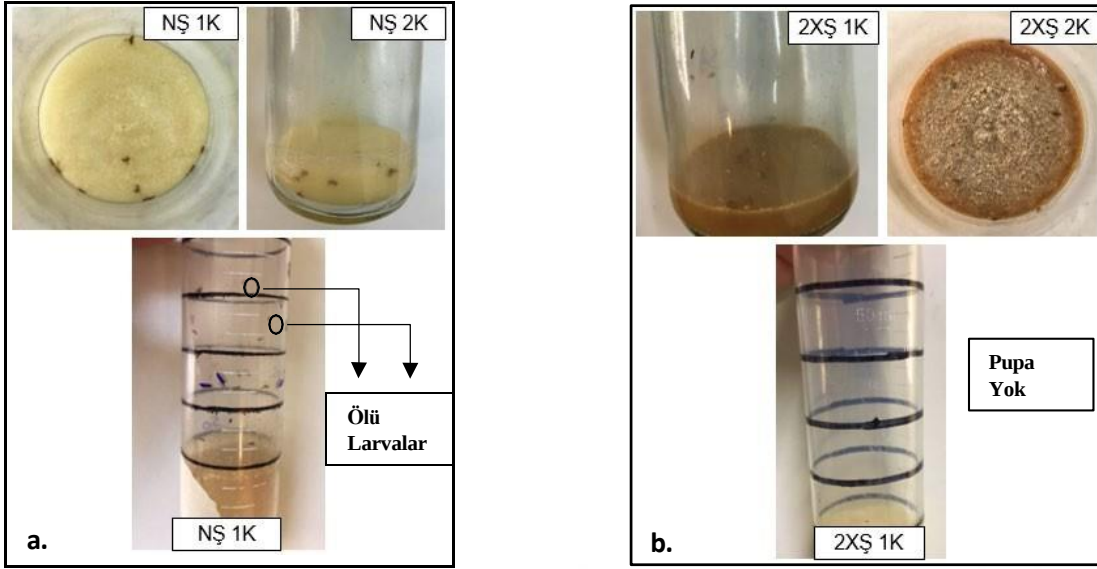


Şekil 3.6. Çalışma kapsamında hazırlanan şeker ve kafein konsantrasyonları

Tez kapsamında *D. melanogaster* bireylerinde kullanılan kafein dozları, daha önceki akademik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan doz aralıkları temel alınarak belirlenmiştir. Kafein oranı literatürden elde edilen verilere göre 1K (1,99 mg / ml)/ 2K (3,98 mg / ml) / 5K (0,64 g / 128 ml) ve 10K (1,28 g / 128 ml) oranlarında belirlenmiştir (Wu vd 2009). Fakat bu doz uygulamalarında bireylerin belirgin bir şekilde yumurta veriminde azalma, gelişim sürecinde yavaşlama ve ergin bireylerin kısa yaşam süresinden kaynaklı bireylerde kayıp gözlemlenmiştir (Şekil 3.7.-3.8.). Bu nedenle çalışmada daha önceki yapılan çalışmalar temel alınıp fizyolojik olarak tolere edilebilir dozlar üzerinde yoğunlaşmıştır.



Şekil 3.7. 1K, 2K, 5K ve 10K Kafein konsantrasyonlarında ölen bireylerin görüntüsü

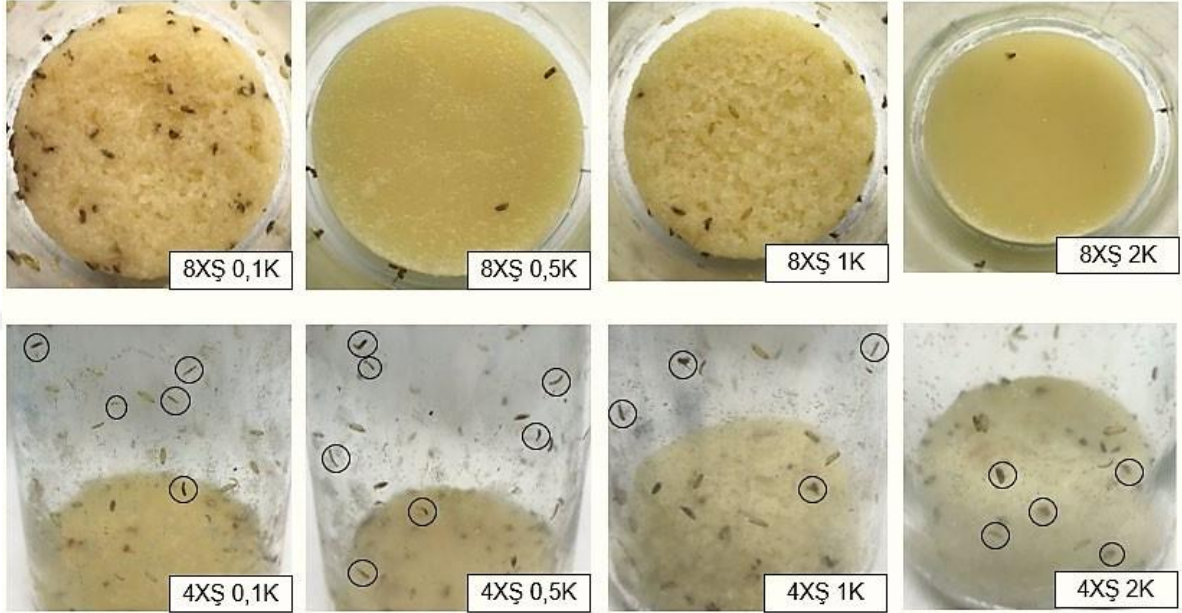


Şekil 3.8. 1K kafein (a) ve 2K kafein dozlarında (b) *D. melanogaster* bireylerinin gelişimi

Literatürde kafein uygulamaları genellikle davranışsal yanıtlar, uyanıklık düzeyi, yaşam süresi ve gelişimsel süreçler üzerindeki etkileri değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiş olup dozlar genellikle 0,01 mg/ml ile 1,25 mg/ml arasında değişmektedir (Nikitin ve Navitskas 2008; Apostolopoulou vd. 2016). Bu bağlamda çalışmada 0,1 mg/mL (0,1K) ve 0,5 mg/mL (0,5K) kafein konsantrasyonları seçilmiştir. Bu dozlar, literatürde hem fizyolojik etkilerin gözlemlenebildiği hem de organizma için Tolere edilebilir kabul edilen aralık içinde yer almaktadır (Lin vd. 2010; Apostolopoulou vd. 2016).

D. melanogaster deneylerinde kullanılan normal besin % 5 şeker içermektedir. Bu çalışma kapsamında hazırlanması planlanan besin ortamında kullanılan normal şeker miktarı (NŞ; 11,7 g / 128 ml); 2XŞ (23,4 g / 128 ml), 4XŞ (46,8 g / 128 ml) ve 8XŞ (93,6 g / 128 ml) kat artırılarak yüksek şekerli besinler elde edilmesi planlanmıştır. Çalışmada kullanılan NŞ (91,41 mg/ml) ve 2XŞ (182,81 mg/ml) süktroz konsantrasyonları, literatürde *D. melanogaster* bireyleriyle yapılan önceki çalışmalar doğrultusunda belirlenmiştir. Literatürde kullanılan süktroz dozları oldukça geniş bir aralıkta değişmekte olup en düşük doz olarak 0,1 mg/ml (Darby vd. 2024), en yüksek doz olarak ise 513 mg/ml (yaklaşık 1,5 M) (Neamtu vd. 2020) dozları kullanılmıştır. Bu çalışmada tercih edilen 91,41 mg/ml ve 182,81 mg/ml süktroz konsantrasyonları, Tennessen vd. (2014) tarafından kullanılan 30 - 150 mg/ml aralığındaki metabolik diyet dozlarıyla ve Mishra vd. (2013) tarafından test edilen 6,85 - 171,15 mg/ml aralığındaki şeker tercih dozlarıyla örtüşmektedir. Çalışmanın başlangıcında daha yüksek etkileri gözlemlemek amacıyla 4XŞ (365,63 mg/ml) ve 8XŞ (731,25 mg/ml) süktroz konsantrasyonları da test edilmiş Fakat 1. nesil uygulaması gerçekleştirildikten sonra şekerin 8XŞ konsantrasyonunda ve 3. nesil uygulaması gerçekleştirildikten sonra 4XŞ konsantrasyonunda besinlerin yüksek şekerden kurumamasından kaynaklı bireylerin gelişiminin belirgin şekilde yavaşladığı, çoğunun pupa evresine ulaşamadığı ve ergin olan bireylerde ise önemli düzeyde ölüm

gözlemlendiği için deneyden çıkarılmıştır (Şekil 3.9). 8 Kat şeker + kafein dozlarında 1. nesil larvaları elde edilmiştir fakat larvalar ergin hale gelememiştir. Bu bağlamda bu dozların larval deneyleri bulunurken ergin birey deneyleri yapılamamıştır. Bu gözlemler, yüksek şekerin *D. melanogaster* bireylerinde gelişimsel stres ve genotoksik etki yaratabileceğini gösteren literatür bulgularıyla tutarlıdır (Silva-Soares vd. 2017). Çalışma kapsamında NŞ ve 2XŞ konsantrasyonlarında deneylere devam edilmiştir.



Şekil 3.9. 4XŞ (365,63 mg/ml) ve 8XŞ (731,25 mg/ml) sükröz maruziyeti sonucu ölen erginler ve kuruyan larvaların görüntüsü

Çalışma kapsamında 3. ve 5. nesil deneylerinde bireyler sadece bu nesillerde uygulamaya maruz bırakılmak yerine 1. nesilden itibaren bireyler sürekli olarak çalışma dozlarından hazırlanmış besinlere maruz bırakılmıştır. Besinlerdeki ebeveyn erginler her yeni nesil çıkmadan önce uzaklaştırılmıştır. Yeni çıkan nesiller tekrar çalışma dozlarının bulunduğu besine aktarılıp nesil devamlılığı sağlanarak 3. nesile ve 5. nesile geldiklerinde deney yapılmıştır.



Şekil 3.10. Tez çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar

Bu proje kapsamında incelenecek konsantrasyonlar, daha önceki 1919B012111594 numaralı TÜBİTAK 2209-A projemizden elde ettiğimiz verilere dayanarak belirlenmiştir. Negatif kontrol grubu olarak, uygulama gruplarındaki çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan ultra saf su kullanılmıştır (Siddique vd. 2005). Aynı zamanda, hazırlanmış olan standart besin, negatif kontrol grubu için kullanılmıştır. Oregon R+ *Drosophila* soyları üzerinde yapılan bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Bülent Kaya tarafından sağlanan *D. melanogaster* hattı ile yürütülmüştür. Kültürler, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve %60 bağıl nem bulunan özel bir kültür odasında muhafaza edilmiştir.



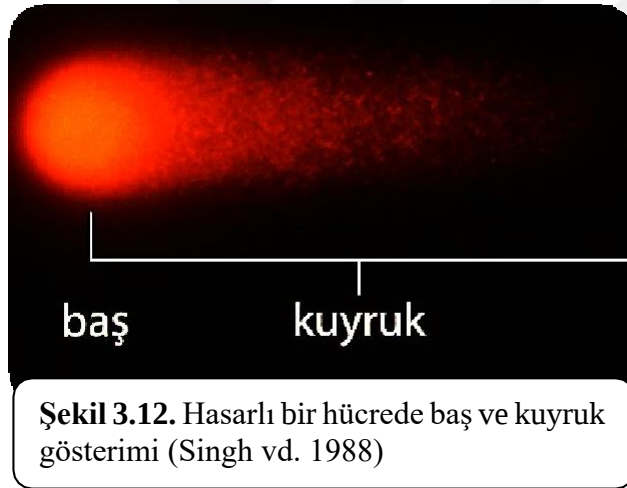
Şekil 3.11. Çalışma konsantrasyonlarında gözlemlenen pupa miktarı

Araştırma kapsamında hazırlanan NŞ 0,1K, NŞ 0,5K, 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K konsantrasyonlarına 3. larval evre *D. melanogaster* bireyleri maruz bırakıldığında konsantrasyonlar arttıkça hem larvaların ergin bireye gelişme başarıları düşerken hem de ergin bireyin çıkma sürelerinde gecikme gözlemlenmiştir.

Ayrıca NŞ 0,1K konsantrasyonu Kontrol grubuna kıyasla daha fazla ve daha hızlı pupa oluşturduğu gözlemlenmiştir. Literatürde bu durumu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (Zhao vd. 2025). Keebaugh vd. (2017) çalışmasında farklı şükroz konsantrasyonlarıyla kafein birlikte verildiğinde özellikle uykusuzluk ve gelişimsel gecikme belirtileri gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kafeinle uyarılmış uykusuzluk hali, yüksek şeker yüküyle birleştiğinde davranışsal düzensizliklerin ve gecikmiş gelişim periyotlarının daha şiddetli hale geldiği belirtilmiştir. Ayrıca Silva vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada kafeine duyarlı mutant *D. melanogaster* larvalarında normal beslenme koşullarında gelişim 3-4 gün gecikirken kafein maruziyetiyle bu gecikmenin daha da arttığı gözlemlenmiştir. Özellikle göz gelişimi gibi enerjiye hassas süreçlerin bu durumdan daha fazla etkilendiği vurgulanmıştır.

3.8. *D. melanogaster* moleküler düzeyde Analizler

3.9. *D. melanogaster* tek hücre alkali jel elektroforezi (SCGE/KOMET) testi



Şekil 3.12. Hasarlı bir hücrede baş ve kuyruk gösterimi (Singh vd. 1988)

KOMET testi, DNA hasarını hücresel düzeyde hızlı ve hassas bir şekilde belirlemek için geliştirilmiş bir mikrojel elektroforez yöntemidir (Nandhakumar ve Parasuraman 2011; Speit ve Rothfuss 2012). 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından tanımlanan bu yöntem, elektroforez sonrası boyanmış hücre çekirdeklerinin kuyruklu yıldız (comet) benzeri görünümünden adını almıştır (Singh vd. 1988). Her bir örnekte en az 50-100 hücre analiz edilerek, özellikle DNA kırıklarının yanı sıra onarım kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Komet testinin temel amacı, tek hücre düzeyinde DNA hasarını doğrudan, kantitatif ve görsel olarak tespit etmektir. Bu yöntem, kimyasallar, radyasyon, toksinler ve oksidatif stres gibi içsel ve dışsal etkenlerin DNA üzerinde yarattığı tek zincir kırıkları (SSBs) gibi genotoksik etkileri hücresel bazda belirlemeye olanak tanır (Collins 2004; Olive ve Banáth 2006). Kısacası, komet testi sayesinde bir hücrenin DNA'sının zarar görüp görmediği, ne kadar hasar aldığı ve hasarın

türü tespit edilebilir. Bir hücre elektroforez koşullarına maruz kaldığında, nükleoid adı verilen bir yapı ortaya çıkar. Bu yapı, iki ana bölümden oluşur: Baş (Head) ve Kuyruk (Tail). Baş kısmı, DNA'nın büyük bir kısmını içeren ve yoğun bir şekilde boyanmış bölgedir; burada bozulmamış, çift sarmallı DNA bulunur. Kuyruk kısmı ise DNA hasarı sonucu oluşan parçalanmış DNA segmentlerinin elektrik alanı etkisiyle baştan uzaklaşarak oluşturduğu bölgedir. Hasarın miktarı arttıkça, kuyruk daha uzun ve parlak hale gelir. Baş ve kuyruk oranı, DNA hasarının şiddeti hakkında doğrudan bilgi sağlar. Komet analizinde şu parametreler kullanılır; Kuyruk Uzunluğu, kuyruğun başından sonuna kadar olan mesafeyi gösterir ve DNA'nın ne kadar uzaklaştığını belirtir. Kuyruk DNA Yüzdesi, toplam DNA'nın ne kadarının kuyrukta bulunduğunu gösterir ve genellikle en güvenilir parametre olarak kabul edilir. Kuyruk momenti ise, kuyruk uzunluğu ile kuyruk DNA yüzdesinin çarpımıdır; hem hasar miktarını hem de dağılımını dikkate alır (Collins 2004; Olive ve Banáth 2006).

Çizelge 3.5. Komet deneyinin kullanıldığı alanlar ve amaçları

Amaç	Açıklama
Genotoksisite Tespiti	İlaç, kozmetik, gıda katkıları veya çevresel kimyasalların DNA hasarı potansiyelinin araştırılması (Dusinska ve Collins 2008).
DNA Onarım Kapasitesinin Ölçülmesi	Hasar sonrası hücrenin ne kadar sürede DNA'yı onarabildiğini test etmek için kullanılır (Collins ve Azqueta 2012)
Çevresel Maruziyetin Değerlendirilmesi	Tarım ilaçları, ağır metaller, hava kirliliği gibi ajanlara maruz kalan bireylerde DNA hasarı belirlenir.
Radyasyonun Etkisi	UV, X-ışını, gama ışını gibi radyasyon kaynaklarının DNA üzerinde oluşturduğu zarar tespit edilir (Choucroun vd. 2001).
Hastalıkların Mekanizmasının Aydınlatılması	Kanser, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklarda DNA hasar düzeyleri analiz edilir (Tice ve Strauss 1995).

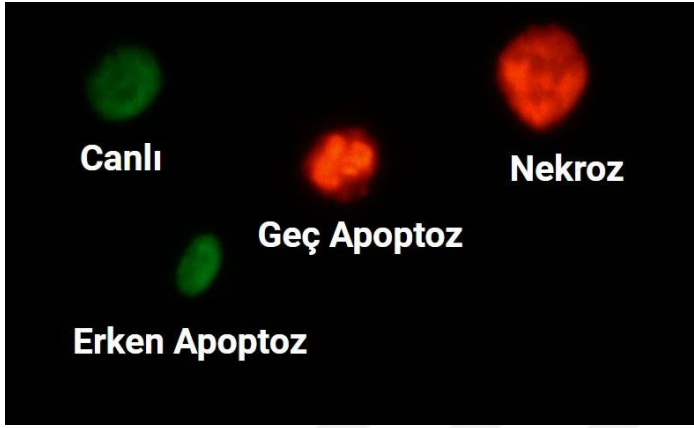
Bu tez kapsamında Yüksek şeker ve yüksek kafein maruziyetinin genotoksik etkileri KOMET testi ile değerlendirilmiştir. Deneyin aşamaları aşağıda detaylıca verilmiştir;

1. *D. melanogaster* Oregon R⁺ hattına ait bireylerden 8 saatlik yumurtalar toplanmıştır.

2. Yumurtalar, 72 ± 4 saate ulaşana kadar gelişmeye bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, larva içeren şişeler musluk suyu altında yıkanmış ve larvalar ince gözenekli bir elek yardımıyla ayrılmıştır.
3. 72 ± 4 saatlik larvalar (3. larval evrenin başı), yüksek şekerli ve kafeinli besin ortamlarına aktarılmıştır. Her konsantrasyon için üç tekrarlı olacak şekilde deneysel gruplar oluşturulmuştur.
4. Larvalar, ergin birey haline gelinceye kadar uygulama ortamında tutulmuştur. Ergin bireyler tüplerde toplanarak $+4$ °C'de saklanmıştır.
5. Pens yardımıyla, her gruptan ergin bireyler seçilmiş ve kafaları ayrılarak beyin dokuları izole edilmiştir.
6. Her konsantrasyon için 20 bireyin 3 tekrardan 80 bireyin kafa izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
7. Beyin dokularının izolasyonu ringer solüsyonu içerisinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen beyinler 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
8. Santrifüjleme işlemi uygulanmış, ardından üstteki süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Tüplere soğuk 40 µL PBS ve 160 µL düşük erime noktalı agaroz (LMA) eklenmiştir.
9. Önceden hazırlanarak oda sıcaklığında bekletilen normal erime noktalı agaroz (NMA) ile kaplanmış lamalar üzerine 120 µL'lik karışım yayılmış ve lamel ile kapatılarak 10 dakika süreyle soğuk levha üzerinde bekletilmiştir.
10. Lameller dikkatlice uzaklaştırılmış ve 80 µL LMA ikinci katman olarak lamalar üzerine tekrar yayılmıştır. Tekrar lamel ile kapatılmış ve 10 dakika daha soğuk ortamda bekletilmiştir.
11. Lameller yeniden uzaklaştırılmış, lamalar $+4$ °C'de en az 1 saat süreyle lizis solüsyonunda inkübe edilmiştir.
12. Bu sürenin sonunda lamalar, elektroforez tamponu içeren bir tankta 30 dakika bekletilmiş ve ardından elektroforez koşulları altında (25 V, 300 mA, 30 dakika) yürütülmüştür.
13. Elektroforez işleminden sonra lamalar, tris tamponu ile $+4$ °C'de 5'er dakikalık iki yıkama ile nötralize edilmiştir.
14. Her lam üzerine 50 µL'lik etidyum bromür çözeltisi (500 µL distile su + 750 µL EtBr) damlatılmış, lamel ile kapatılmış ve 20 - 30 dakika boyunca $+4$ °C'de inkübe edilmiştir.
15. Her doz grubundan rastgele seçilen en az 50 hücre, 400x büyütmeli floresan mikroskop (Nikon Eclipse E200) altında incelenmiş ve Komet-IV (sürüm 4.11) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.
16. Yazılım aracılığıyla, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk yoğunluk değerleri otomatik olarak hesaplanmıştır.
17. Elde edilen sonuçlar negatif kontrol grubuyla karşılaştırılarak anlamlı farklılıklar istatistiksel testlerle (One-way ANOVA) değerlendirildi.

3.10. Akridin Oranj /etidyum bromid boyama ile hücre canlılığı ölçümü

Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromid (EB) boyaları kullanılarak gerçekleştirilen çift boyama yöntemi, nöronal hücrelerde apoptozu hızlı ve morfolojik olarak belirlemek için kullanılan klasik bir floresan tekniktir. Bu yöntem sayesinde canlı hücreler, erken apoptoz aşamasındaki hücreler, geç apoptoz aşamasındaki hücreler ve nekrotik hücreler kolaylıkla ayırt edilebilir (Ribble vd. 2005). Akridin Oranj, hem canlı hem de ölü hücrelerin DNA'sına bağlanarak floresan mikroskop altında yeşil bir parlama oluşturur. Öte yandan, Etidyum Bromid yalnızca zar bütünlüğü bozulmuş hücelere nüfuz eder ve DNA ile bağlandığında kırmızı-turuncu floresans yayar. Bu temel farklılık, hücre ölümünün evrelerinin mikroskop altında ayrıştırılmasını sağlar (Mironova vd. 2007).



Şekil 3.13. Floresan mikroskop altında farklı renkleri veren hücreler (Kasibhatla ve Tseng 2003)

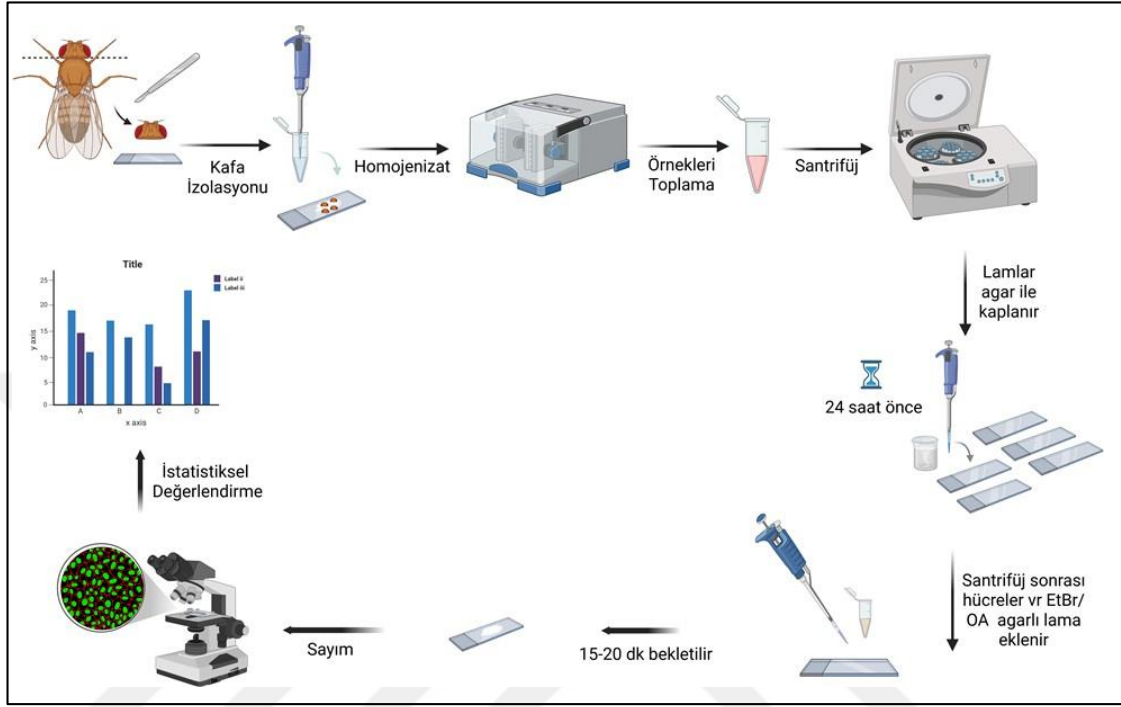
AO/EB yöntemi ile: Canlı hücreler; yeşil floresanslı, homojen ve sağlam nükleus

Erken apoptotik hücreler; yoğun yeşil floresans, kromatin yoğunlaşması, Geç apoptotik hücreler; turuncu-kırmızı floresans, parçalanmış nükleus, Nekrotik hücreler; düzensiz ve parlak kırmızı-turuncu nükleer yapı olarak görünürler (Ribble vd. 2005; Kasibhatla ve Tseng, 2003).

Bu teknik, hücre sabitlemesi gerektirmediği için canlı hücreler üzerinde uygulanabilir, düşük maliyetli ve hızlı sonuç alınabilen bir yöntemdir. Özellikle sinir hücreleri gibi yapısal olarak hassas hücrelerde canlılığı ortaya koymada avantaj sunar (Mironova vd. 2007). Çalışma kapsamında ölü ve canlı hücreleri ortaya koymak için yapılmıştır. Apoptoz ve nekroz kaynaklı ölümler dikkate alınmayıp sadece ölü hücre olarak sayım gerçekleştirilmiştir.

Çalışma süresince gerçekleştirilen deneylerde kafa homojenizatu kullanılmışken, bu çalışmada doğrudan ergin bireylerden beyin izolasyonu yapılmıştır. *Drosophila* beyinlerinin yaklaşık 100.000 hücre içerdiği ve bu hücrelerin %90'ının nöronlardan oluştuğu bildirilmektedir (Davie vd. 2018). Bu çalışmada izole edilen beyinlerdeki hücre ölüm oranı değerlendirilmiştir. Floresan DNA'ya bağlanan boyalar (örneğin AO/EB boyama), hücre zarından geçerek çekirdeğe ulaşmaları sayesinde, floresan ışık mikroskopisi ile birlikte kullanıldığında; basitliği, doğruluğu ve hızlı sonuç verme özellikleri nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir. AO boyası tüm hücelere girerek

çekirdeği yeşil renkte boyarken, EB yalnızca membran bütünlüğü bozulan hücrelere geçerek çekirdeği kırmızı renge boyar (Smith vd. 2012). Bu çalışmada, her bir uygulama grubu için dört farklı konsantrasyon ve kontrol grubu olarak ultra saf su kullanılmıştır.



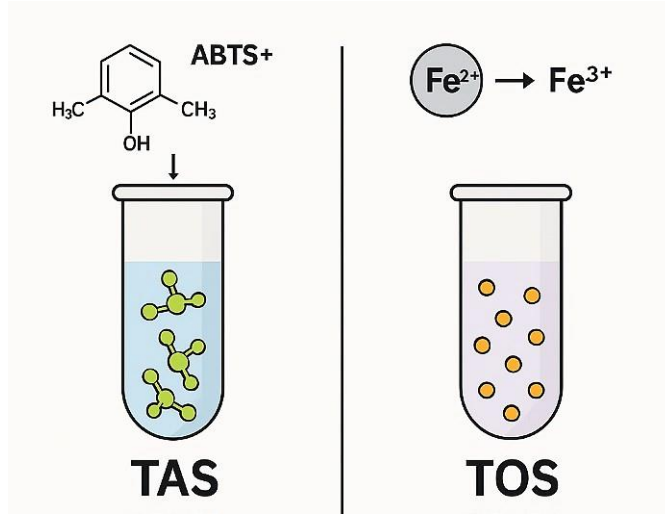
Şekil 3.14. Akridin Oranj deney aşamaları gösterimi

1. *D. melanogaster* Oregon R⁺ hattına ait bireylerden 8 saatlik yumurtalar toplanmıştır.
2. Yumurtalar, 72±4 saate ulaşana kadar gelişmeye bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, larva içeren şişeler musluk suyu altında yıkanmış ve larvalar ince gözenekli bir elek yardımıyla ayrılmıştır.
3. Elde edilen larvalar, deney gruplarına ait farklı konsantrasyonlardaki besiyerlerine 1-2 mikrospatül (yaklaşık 500-1000 birey) aktarılmıştır.
4. 72±4 saatlik larvalar (3. larval evrenin başı), yüksek şekerli ve kafeinli besin ortamlarına aktarılmıştır. Her konsantrasyon için üç tekrarlı olacak şekilde deneysel gruplar oluşturulmuştur.
5. Larvalar, ergin birey haline gelinceye kadar uygulama ortamında tutulmuştur.
6. Pupadan çıkan bireyler, çıkışlarının ardından 5. güne kadar standart besiyerinde bulunan yeni şişelere aktarıldı ve 5 günlük ergin bireylerden beyin izolasyonu gerçekleştirildi. Ergin bireyler tüplerde toplanarak +4 °C'de saklanmıştır.
7. Pens yardımıyla, her gruptan ergin bireyler seçilmiş ve kafaları ayrılarak beyin dokuları izole edilmiştir. Beyin hücreleri, Tito vd. (2016) protokolüne uygun şekilde izole edilmiştir.
8. Her konsantrasyon için 20 bireyin 3 tekrardan 80 bireyin kafa izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

9. Acridine orange (AO) ve etidyum bromid (EB) boyalarının stok çözeltileri kullanılarak, her birinin son derişimi 50 µg/mL olacak şekilde fosfat tamponlu salin (PBS) ile seyreltilerek toplam hacmi 1 mL olan AO/EB boyama solüsyonu hazırlanmıştır.
10. İzole edilen beyin hücreleri ile hazırlanan AO/EB çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak, önceden normal erime noktalı agaroz (NMA) ile kaplanmış lamalar üzerine yayılmıştır.
11. Boyanan hücreler, floresan mikroskop ile incelenmiştir. Mikroskobik analizde; canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise turuncu-turuncu-kırmızı renk ile ayırt edilmiştir (Smith vd. 2012).
12. Her deney grubu için analizler üç tekrarlı olarak yürütülecek ve her tekrarda en az 100 hücre sayılarak değerlendirme yapılmıştır.
13. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS yazılımı kullanılacaktır. İlk olarak, verilerin normal dağılıma uyup uymadığı normalite testi ile belirlenecektir. Veriler normal dağılım gösterdiği takdirde, uygulamalar arası farkın anlamlılığı tek yönlü ANOVA (One-way ANOVA) ile analiz edilecek ve gruplar arası karşılaştırmalar Dunnett çoklu karşılaştırma testi ile yapılacaktır. Verilerin normal dağılmadığı durumlarda ise Kruskal-Wallis testi uygulanacaktır.

3.11. Toplam antioksidan seviyesi /toplam oksidan seviyesi ölçülmesi

Total Antioksidan Seviyesi (TAS), biyolojik numunelerdeki toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesini olanak sağlar. Vücutta meydana gelen reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı koruma görevini üstlenen antioksidan bileşiklerin tümünün birikimli etkisini belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. Bu analiz, numunedeki antioksidanların belirli bir radikal türünü (genellikle ABTS*+ gibi) ne ölçüde baskılayabildiğini ölçerek gerçekleştirilir. Sonuçlar genellikle mmol Trolox eşdeğeri/L cinsinden ifade edilir (Erel 2004). Total Oksidan Seviyesi (TOS) ise biyolojik numunelerdeki toplam oksidan bileşiklerin miktarını tespit eder. Bu test, oksidan maddelerin demir-iyon kompleksi ile oluşturduğu renk değişimi esasına dayanır. Oksidan maddeler tarafından oksitlenen demir, kromojenik bir substratla etkileşerek renkli bir bileşik oluşturur. Bu renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür ve sonuçlar µmol H₂O₂ eşdeğeri/L cinsinden verilir (Erel 2005). TAS ve TOS verileri birlikte değerlendirildiğinde, vücudun oksidatif stres durumunu yansıtan Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplanabilir. OSI şu formül ile elde edilir: $OSI = (TOS / TAS) \times 100$ Bu oran, antioksidan savunma kapasitesine göre oksidan yükünü göstererek oksidatif denge hakkında bilgi verir (Yazar 2023).



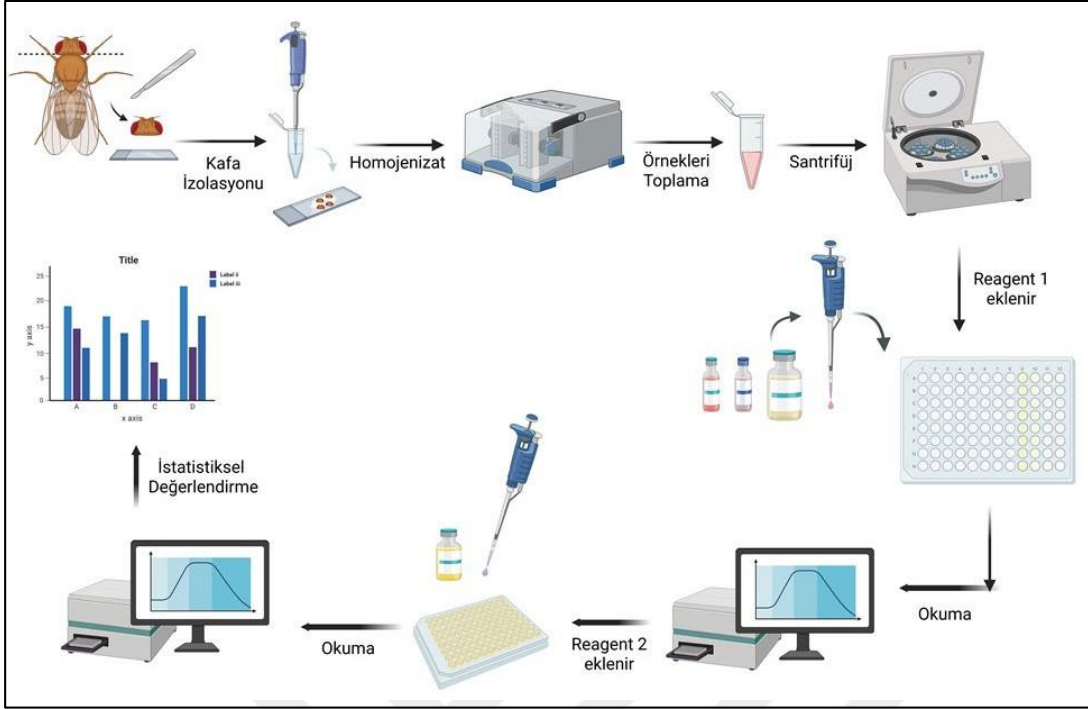
Şekil 3.15. TAS/TOS Prensibi (Erel 2004)

TAS (Total Antioksidan Seviyesi) Erel (2004) tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntemle yapılır. Prensibi şudur:

- ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikali oluşturulur. Örnekteki antioksidanlar, bu mavi-yeşil renkli radikali nötralize ederek rengini açar. Renk açılma derecesi spektrofotometrik olarak ölçülür (660 nm). Trolox eşdeğeri üzerinden antioksidan kapasite hesaplanır. Bu yöntem, antioksidanların birlikte ve sinerjik etkisini ölçer (Erel 2004).

TOS (Total Oksidan Seviyesi) Erel (2005) tarafından geliştirilmiştir. Prensibi:

- Örnekteki oksidanlar, Fe²⁺ iyonlarını Fe³⁺'a oksitler.
 - Fe³⁺ iyonları kromojenik bir madde (ksilenol orange) ile kompleks oluşturur → mor renk
 - Renk yoğunluğu spektrofotometre ile ölçülür (530 nm).
 - Hidrojen peroksit eşdeğeri (µmol H₂O₂ eq./L) olarak ifade edilir. Bu yöntem oksidan yükünü toplamda ve birlikte ölçer. OSI (Oksidatif Stres İndeksi)
- OSI = (TOS / TAS) × 100 formülüyle hesaplanır. Bu oran, organizmadaki oksidatif dengenin bozulup bozulmadığını gösterir. Yüksek OSI; oksidatif stres artışıyken düşük OSI; Antioksidan savunma yeterli anlamına gelmektedir (Yazar 2023).



Şekil 3.16. TAS/TOS deney aşamaları gösterimi

TAS ve TOS Deneyi için;

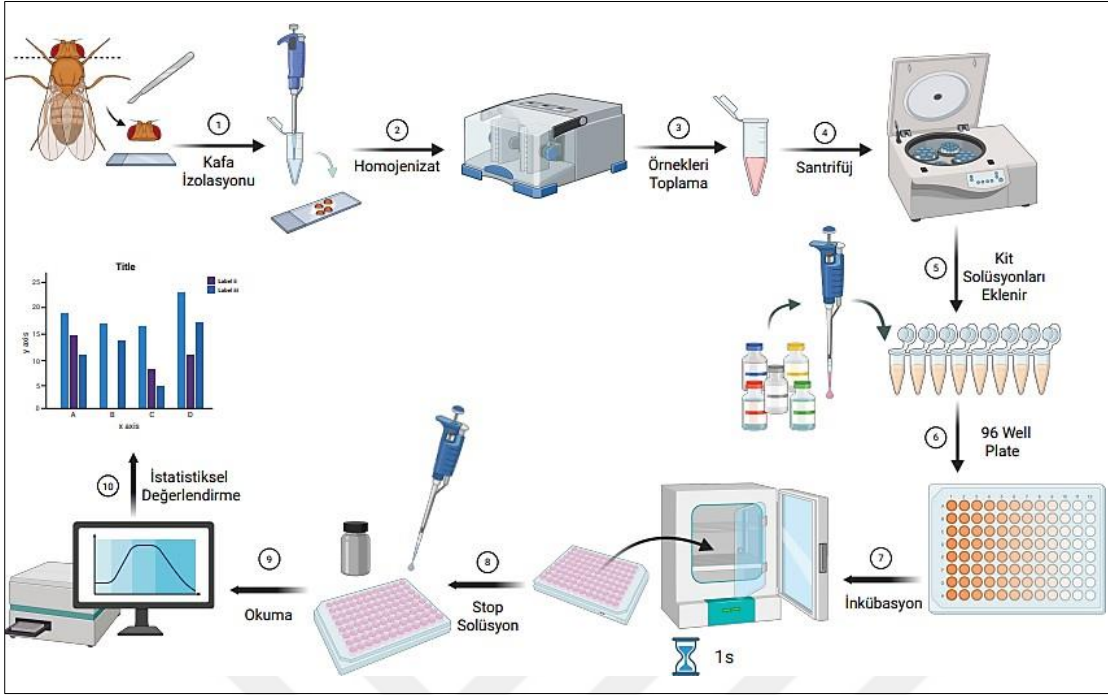
1. *D. melanogaster* Oregon R+ hattından 8 saatlik yumurtalar toplanmıştır.
2. Toplanan yumurtalar 72 ± 4 saatlik (3. larval evre başlangıcı) olduklarında yüksek şekerli ve kafeinli besin konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır.
3. Maruziyet, 72 ± 4 saatlik larvalar farklı konsantrasyonlarından oluşan *Drosophila* besin ortamına aktarılması ile gerçekleştirilmiştir.
4. TAS/TOS deneyi için BCA testine göre gerekli seyreltme işlemleri yapılmış olan 200 µl kafa homojenizatı TAS/TOS kit protokolü dikkate alınarak spektroskopik ölçümler için kullanılmıştır.
5. Toplam antioksidan durumu (TAS mmol Trolox Eq / L) ve 2. Toplam oksidan durumu (TOS µmol H₂O₂ Eq/L), kit üreticisinin talimatlarına dayanarak Erel (2005) tarafından bildirilen yönteme göre belirlenmiştir.
6. Oksidatif stres düzeyi oksidatif stres indeksi ($OSI = TOS/TAS$) kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.
7. İstatistiksel değerlendirmelerde SPSS programı kullanılarak öncelikle verilerin normal dağılım gösterip göstermediği normalite testi ile belirlendi, normal dağılım gösteriyorsa uygulamalar arası farkın önemli olup olmadığı One-way ANOVA'da Dunnett çoklu karşılaştırma testi ile normal dağılım göstermiyor ise Kruskal Wallis testi ile test edildi.

3.12. Tiyoarbitürik asit ile lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

Tiyoarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) testi, biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan ve güvenilirliği yüksek bir analiz yöntemidir (Draper ve Hadley 1990). Bu yöntem, lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) düzeyini ölçmeyi amaçlar (Esterbauer vd. 1991). MDA, tiyoarbitürik asit (TBA) ile etkileşime girerek renkli bir kompleks oluşturur ve bu kompleksin absorbansı genellikle 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür (Ohkawa vd. 1979; Dasgupta vd. 2014).

Biyolojik örneklerin analizi sırasında, lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi amacıyla sıklıkla Tiyoarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) testi uygulanır. Bu yöntem, lipid peroksidasyon sürecinin son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA)'nın seviyesini ölçmeyi hedefler (Esterbauer vd. 1991; Catalan vd. 2018). MDA'nın tiyoarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleksin absorbansı, genellikle 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür (Ohkawa vd. 1979; Dasgupta vd. 2014). Deneysel uygulamada, biyolojik numuneler genellikle trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilip santrifüj edilir. Elde edilen süpernatant, TBA içeren çözeltiyle karıştırılarak belirli bir sıcaklıkta inkübe edilir ve MDA-TBA kompleksi ölçülebilir hale gelir (Yagi 1987). Ancak yöntemin bazı sınırlamaları vardır; TBA yalnızca MDA ile değil, diğer reaktif aldehitlerle de reaksiyona girdiğinden testin spesifikliğı düşüktür (Grotto vd. 2009). Bu sebeple, TBARS yöntemi yalnız başına kullanılmamalı; sonuçlar diğer oksidatif stres belirteçleri ile desteklenerek yorumlanmalıdır (Del Rio vd. 2005).

TBARS testi, lipid peroksidasyonunun bir yan ürünü olan MDA'nın TBA ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturması prensibine dayanır. Bu kompleksin absorbansı, genellikle 530 - 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Ohkawa vd. 1979). Deney kapsamında kullanılan kit BT-Lab markasına ait E0726Hu katalog nolu ürünü ile yapılmıştır.



Şekil 3.17. Lipid peroksidasyonu deney aşamaları gösterimi

Lipid peroksidasyonu Deneyi için;

1. *D. melanogaster* Oregon R⁺ hattına ait bireylerden 8 saatlik yumurtalar toplanmıştır.
2. Yumurtalar, 72±4 saate ulaşana kadar gelişmeye bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, larva içeren şişeler musluk suyu altında yıkanmış ve larvalar ince gözenekli bir elek yardımıyla ayrılmıştır.
3. Elde edilen larvalar, deney gruplarına ait farklı konsantrasyonlardaki besiyerlerine 1–2 mikrospatül (yaklaşık 500 - 1000 birey) aktarılmıştır.
4. 72±4 saatlik larvalar (3. larval evrenin başı), yüksek şekerli ve kafeinli besin ortamlarına aktarılmıştır. Her konsantrasyon için üç tekrarlı olacak şekilde deneysel gruplar oluşturulmuştur.
5. Larvalar, ergin birey haline gelinceye kadar uygulama ortamında tutulmuştur.
6. Pupadan çıkan bireyler, çıkışlarının ardından 5. güne kadar standart besiyerinde bulunan yeni şişelere aktarıldı ve 5 günlük ergin bireylerden kafa izolasyonu gerçekleştirildi. Her konsantrasyon için 20 kafa elde edildi. 3 tekrardan toplam 60 kafa izole edildi. Ergin bireylerin kafaları tüplerde toplanarak +4 °C'de saklanmıştır.
7. Lipid peroksidasyonunun belirlenebilmesi için BCA testine uygun olarak seyreltme işlemi uygulanan 200 µl'lik kafa homojenizati, 20 µm'lik filtreden geçirildi.
8. Elde edilen 100 µl filtrat, 100 µl TBA çözeltisi ile karanlık ortamda inkübe edildi ve 535 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değeri ölçüldü.
9. Deneyler üç tekrar halinde gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde SPSS yazılımı kullanıldı; öncelikle verilerin normal dağılım gösterip göstermediği normalite testiyle belirlendi. Veriler normal dağılım gösterdiği takdirde gruplar arası fark One-Way ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi; normal dağılım göstermeyen veriler ise Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi.

3.13. *Drosophila*'da davranışsal parametrelerle nörotoksisite analizi

3.14. *Drosophila melanogaster* davranış deneyleri ve beslenme kaynaklı nörodavranışsal etkilerin değerlendirilmesi

D. melanogaster, kısa yaşam döngüsü, düşük bakım maliyeti, genetik manipülasyonlara uygunluğu ve genetik olarak iyi tanımlanmış yapısıyla, nörodavranışsal toksisite çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen bir model organizmadır (Rand 2010; Akins 1991). Bu organizma ile yapılan davranış deneyleri, sinir sistemi üzerindeki doğrudan ve dolaylı etkilerin değerlendirilmesi için kritik bir öneme sahiptir (Suh vd. 2017; Montgomery vd. 2014). Deneysel çalışmalarda kullanılan davranış testleri arasında larval sürünme, yetişkin bireylerde tırmanma yetisi, ışığa yönelim, çiftleşme davranışı, hareketlilik düzeyi, ani uyarana tepki ve soğuk şoktan kurtulma gibi çok çeşitli yöntemler yer almaktadır (Das vd. 2024; Cabrita vd. 2022; Podratz vd. 2011).

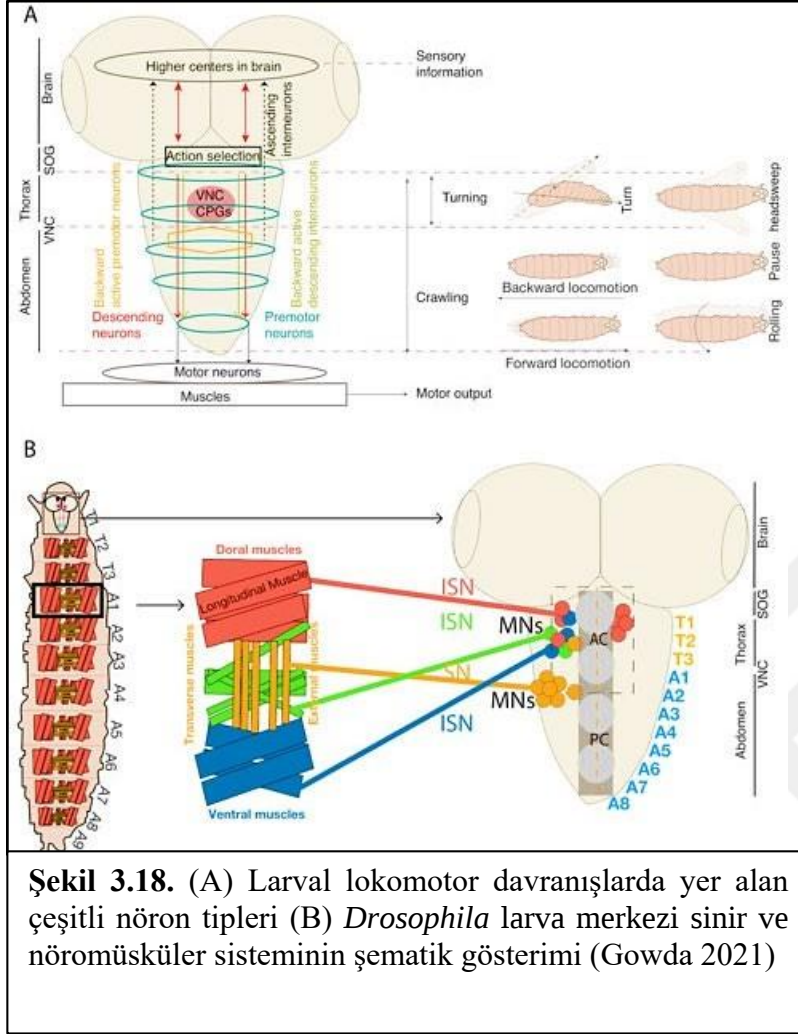
D. melanogaster larvaları, beslenme düzeylerine son derece duyarlıdır. Bu durum yalnızca genel gelişimi değil aynı zamanda nörogelişimsel süreçleri de doğrudan etkiler (Demir ve Demir 2024). Larval dönemde yetersiz veya zararlı ajanlara maruz kalınan beslenme koşulları, imajinal disklerdeki hücre proliferasyonunu ve farklılaşmayı sekteye uğratabilir (Beamish vd. 2023). İmajinal diskler, erişkin yapıları (göz, kanat, anten vb.) oluşturma yanı sıra sinir sisteminin erken oluşumunda yer alan nöral progenitör hücreleri de içerir (Mishra vd. 2023).

İmajinal disklerindeki gelişimsel bozukluklar, gelişimin ileri safhalarında ortaya çıkan nöroanatomik yapıları ve böylece nöronal işlevselliği doğrudan etkileyebilir (Cabrita vd. 2022). Özellikle nörotoksisite çalışmaları kapsamında yapılan davranış testlerinde larval evredeki beslenme durumunun nöronal yolların gelişimini etkilediği ve bunun da erişkin bireyde motor beceriler, ses algısı veya kaçınma gibi davranışsal parametrelerde bozulmalara yol açtığı gösterilmiştir (Anushree vd. 2023; Welch ve Mulligan 2022). Bu bağlamda *Drosophila* davranış deneyleri, beslenme kaynaklı ya da çevresel ajanların sinaptik iletim, motor koordinasyon ve bilişsel işlevler gibi nörolojik süreçlerdeki değişimlerini incelemek için son derece duyarlı ve çok yönlü bir test sunmaktadır (Eom vd. 2017; Rand 2010; Mishra vd. 2023).

Tüm davranış deneylerinde ortak olacak şekilde aşağıdaki prosedür izlenmiştir;

- Tüm deneyler için *D. melanogaster* Oregon R+ genetik hattı kullanıldı.
- *Drosophila* Oregon R+ genetik hattından 8 saatlik yumurtalar toplandı.
- Toplanan yumurtalar 72±4 saatlik (3. larval evre başlangıcı) olduklarında yüksek şekerli ve kafeinli besin konsantrasyonlarına maruz bırakıldı.
- Maruziyet, 72±4 saatlik larvalar belirlenen konsantrasyonlardan oluşan besin ortamına aktarılması ile gerçekleştirilmiştir.
- Her konsantrasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde deneyler planlanmıştır.
- Ayrıca tüm deney gruplarında negatif kontrol grubu olarak konsantrasyonların hazırlanmasında kullanılan distile su uygulaması yapılmıştır.
- Negatif kontrol grubundan elde edilen sonuçlar ile istatistiksel karşılaştırma SPSS One Way Anova programında yapılmıştır.

3.15. Larval sürünme deneyi



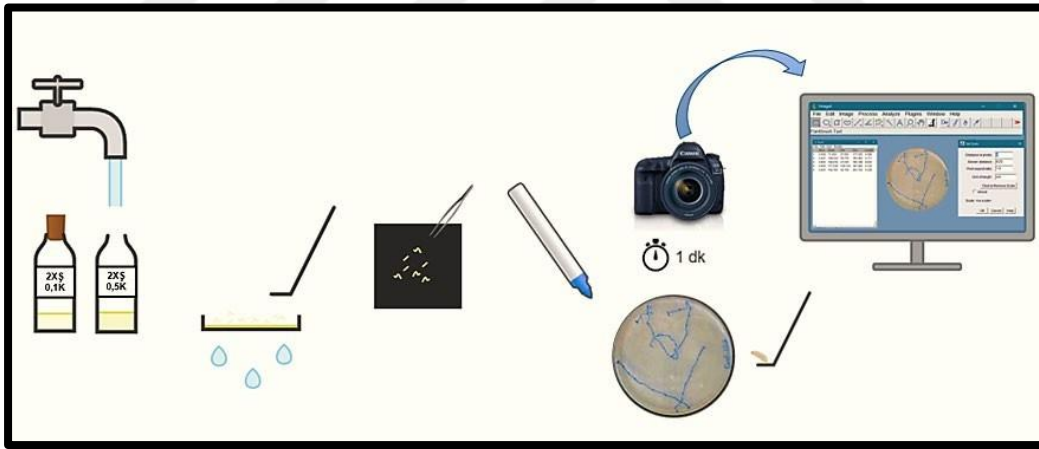
D. melanogaster larvalarında gözlenen sürünme davranışı, abdominal ve toraksal segmentlerde düzenli olarak sıralanmış olan kasların merkezi sinir sistemi (MSS) tarafından kontrol edilen ritmik kasılmalarıyla sağlanmaktadır (Dhar vd. 2020; Gowda vd. 2021). Larval MSS, anatomik olarak iki ana bileşene ayrılır: subözofageal ganglion (SOG) ve ventral sinir kordonu (VNC); bu yapılar birlikte hareket komutlarının üretilmesi ve duyuşal bilgilerin işlenmesini düzenler (Clark vd. 2018). Larvaların kas anatomisine bakıldığında karşılıklı çift bantlaşmış kas yapısı karşımıza çıkmaktadır (Şekil 3.18). Bu bantlaşmaya yakından bakıldığında yatay, dikey ve çaprazlama kas grupları yer almaktadır. Bu kas gruplarının her biri merkezi sinir sisteminin farklı elemanları tarafından kontrol edilmektedir. Sürünme davranışı, ileri yönlü hareketi esas alır. Larvalar yaklaşık % 99,8 oranında öne doğru yalnızca % 0,2 oranında geri doğru hareket eder. Bu yönsel asimetri, motor devrelerin ileri hareketi önceleyen yapısıyla açıklanmaktadır (Gowda vd. 2021). Bu motor davranış, segmental motor nöronlar ile kas lifleri arasında kurulan bağlantılar sayesinde ortaya çıkar ve sinaptik etkinlikler, sürünme fonksiyonunun koordinasyonunda kritik rol oynar (Demir ve Demir 2024). Larval sürünme testi, segmentler arası hareketin pozisyon algısına dayalı geri bildirim, motor devre bütünlüğü ve sinaptik iletkenlik gibi çoklu nörolojik alt sistemlerin bütünsel bir çıktısı olduğundan

nörotoksisite çalışmaları için hassas bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Cabrita vd. 2022).

Çevresel ya da kimyasal ajanlarla indüklenen nöronal hasar durumlarında bu bağlantılarda aksama görülmekte ve larvaların sürünme performansında belirgin azalmalar saptanmaktadır (Anushree vd. 2023). Sürünme sırasında oluşan motor bozukluklar, sıklıkla merkezi sinir sistemi kaynaklı fonksiyonel aksaklıklarla ilişkilendirilir (Kohsaka 2023). Dolayısıyla larval sürünme davranışı sinir-kas etkileşiminin bozulmasını erken dönemde saptamak için işlevsel ve yüksek duyarlılığa sahip bir davranışsal gösterge olarak değerlendirilmektedir (Nichols ve Becnel 2012).

3.16. Larval sürünme (crawling) deneyi aşamaları

Deney de kullanılacak petrilere % 2'lik agar yayılmıştır. Her deney tüpüne 1-2 spatül kadar larva eklendi. Her uygulama için 3 tekrar yapıldı. Bu deney çalışması 24 saatlik uygulama sonrası gerçekleştirilmiştir. Her uygulama içerisinde 15'er larva olmak üzere toplamda 45 larvanın 1 dakika içerisindeki aldığı yol kayıt edildi. Petrilerin görüntüsü fotoğraf makinesiyle çekilerek Image-J uygulamasından santimetre cinsinden ölçümü gerçekleştirildi (Şekil 3.19). Deney sonucu elde edilen veriler SPSS 20 paket programında one-way ANOVA (Dunnet) test yöntemi ile değerlendirilmiştir (Dhar vd 2020).



Şekil 3.19. Larval sürünme deney sürecinin gösterimi

3.17. *D. melanogaster* larval ağırlık

D. melanogaster larvalarında ağırlık ölçümü, organizmanın gelişimsel büyüme hızını ve genel fizyolojik durumunu değerlendirmede temel bir parametredir (Mirth ve Riddiford 2007). Bu ölçüm üçüncü evrede yapılmaktadır. Çünkü bu evrede larvalar, besin alımını maksimum düzeye ulaştırarak vücut kütlelerinin en yüksek seviyesine ulaşır ve kısa süre sonra pupaya dönüşüm sürecine girer. Bu nedenle bu dönem, beslenme, metabolik yanıtlar ve toksik etkilerin büyüme üzerindeki birikimli etkilerini değerlendirmek açısından en uygun zamandır (Tennessen vd. 2014) ve ağırlık farklılıkları sistemik stresleri veya çevresel etkileri daha belirgin şekilde yansıtır (Callier ve Nijhout 2011).

3.18. Larval ağırlığın sinir sistemi gelişimine etkisi

D. melanogaster larvalarında sinir sistemi gelişimi yüksek düzeyde enerji tüketen biyolojik süreçler olan hücre çoğalması, farklılaşması ve sinaptogenez ile doğrudan ilişkilidir (Frank vd. 2013; Chou vd. 2020; Duhart ve Mosca 2022). Bu süreçlerin sağlıklı biçimde ilerlemesi, larvanın somatik büyümesine ve dolayısıyla vücut ağırlığındaki artışa katkı sağlar. Sinir sistemi gelişiminde oluşan bozukluklar larval büyüme hızında düşüş ve ağırlık kazanımında gerileme ile sonuçlanabilmektedir (Beamish vd. 2023). Nöronal farklılaşma ve beyin hücrelerinin düzenli gelişimi, larvanın çevresel uyaranlara tepkisi, beslenme davranışı ve öğrenme kapasitesi gibi nörolojik işlevlerle yakından ilişkilidir. Bu sistemlerin işlev bozukluğu, fizyolojik büyümeyi sekteye uğratarak larval ağırlığın azalmasına neden olabilmektedir (Cabrita vd. 2022).

Gelişim sürecinde nörotoksik bileşiklere maruz kalınması hem merkezi sinir sisteminde morfolojik ve fonksiyonel bozulmalara hem de larval dönemde büyüme yetersizliği gibi fenotipik sonuçlara yol açar. Bu bağlamda larval ağırlık, sinir sistemi gelişimindeki aksaklıkları değerlendirmede dolaylı fakat anlamlı bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Vu vd. 2023).

3.19. Larval ağırlığın hareket davranışı üzerine etkisi

Larvaların hareket edebilmesi için kaslarının ve sinir bağlantılarının iyi gelişmiş olması gerekir. Bu sistemlerde sorun varsa hem hareketlerinde bozulma olur hem de büyümeleri yavaşlar (Zhang vd. 2023). Vücuda zarar veren maddelere maruz kalan larvalar hem daha az hareket eder hem de yeterince ağırlık artışı olmaz. Bu kas ve sinir sisteminin düzgün çalışmadığını gösterir (Anushree vd. 2023). Hareket bozukluklarıyla birlikte gözlenen düşük ağırlık, larvanın genel sağlığının da bozulduğunu gösteren önemli bir işarettir (Rand 2010).

3.20. Gelişim üzerindeki etkileri

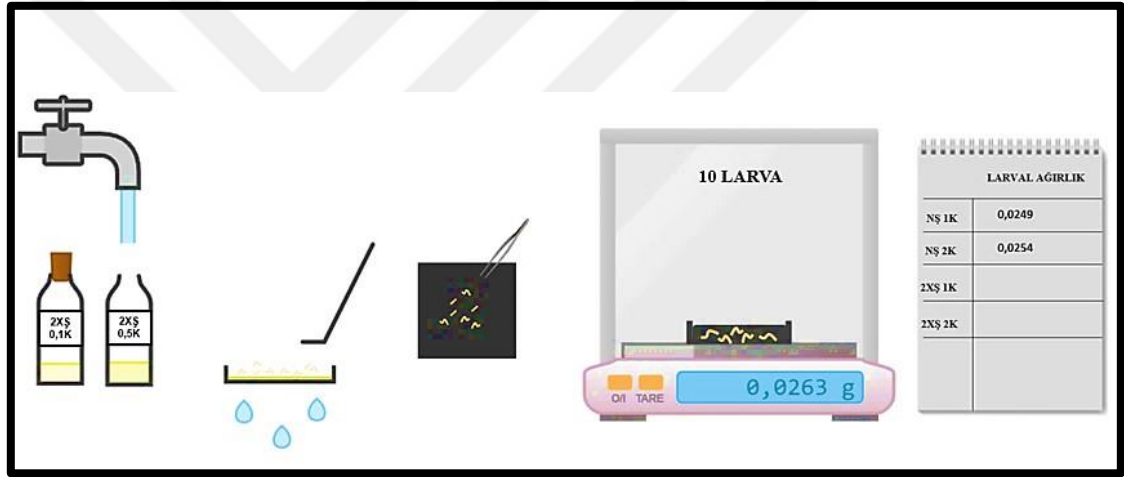
Toksisite analizlerinde larval ağırlık kimyasal ajanların sistemik etkilerini değerlendirmek için kullanılır. Ağır metaller (örneğin kadmiyum, kurşun) ya da pestisitler gibi toksik maddelere maruz kalan larvalar genellikle oksidatif stres, hücre ölümleri veya hormon bozuklukları, azalmış büyüme oranı ve ağırlık kaybı ortaya çıkmaktadır (Mishra vd. 2023; Dos Santos vd. 2024). Bu durum hücresel stres, hormonal bozulma ve metabolik dengesizliklerin dolaylı bir göstergesidir (Rand 2010). Larval ağırlık ayrıca davranışsal toksisite deneyleriyle birlikte kullanıldığında gözlenen motor ya da nörolojik bozuklukların fizyolojik alt yapısını destekleyici bir ölçüt sunar. Örneğin hem davranışsal gecikme hem de düşük ağırlık, gelişimsel nörotoksisiteye işaret eder (Anushree vd. 2023). Bu nedenle larval ağırlık ölçümleri genellikle lokomotor analizler, sürünme testleri ve metabolik parametrelerle birlikte değerlendirilerek çok yönlü biyolojik etki analizleri yapılır (Texada vd. 2020).

Larvaların ağırlığı bize aşağıdaki konularda bilgi verir;

- Ne kadar beslendikleri ve büyüdüğü → daha çok beslenen larva daha hızlı büyür (Zhang vd. 2023).
- Gelişimlerinin ne kadar sürdüğü → gecikme varsa genellikle stres veya zararlı etki vardır (Cabrita vd. 2022).
- Hareket edip edemedikleri → hareket az ise kas ve sinir sistemi etkilenmiş olabilir (Vu vd. 2023).

3.21. Larval ağırlık deneyi

Her uygulama için 3 şişe tekrar yapıldı. Bu 3 şişe ısıtıldı ve içerisinden olabildiğince besiyerinden temizlenmiş 10'ar larva alınarak toplamda 30 larvanın hassas terazide ölçümü gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.20). Elde edilen sonuçlar SPSS 20 paket programında One-way ANOVA (Dunnet) test yöntemi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.20. Larval ağırlık deneyi aşamaları

3.22. *D. melanogaster* pupa pozisyon deneyi

Düşük maliyetli, gözleme dayalı ve canlıya zarar vermeyen yapısıyla pupa pozisyon deneyi, *Drosophila*'da gelişimsel toksisite değerlendirmesi için güçlü ve yaygın kullanılan davranışsal testlerden biridir (Rand vd. 2010).

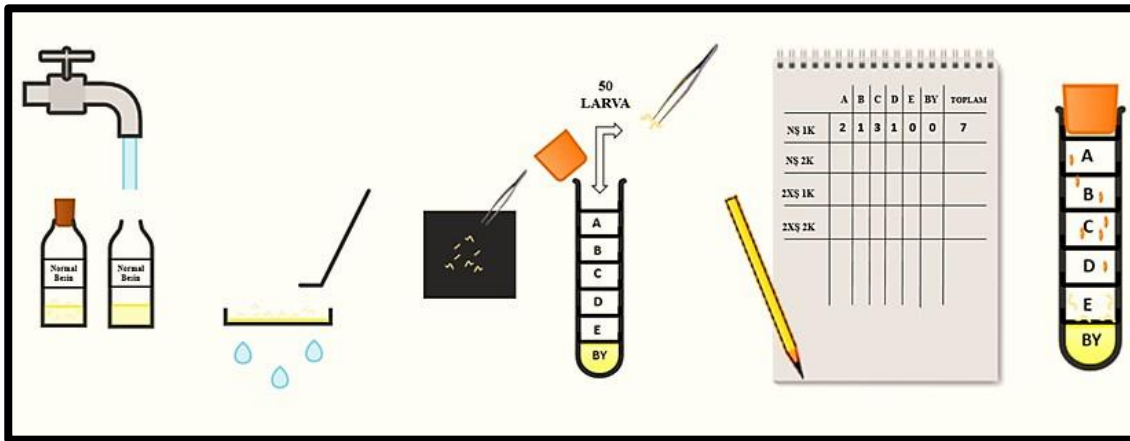
D. melanogaster pupa pozisyonu, larvaların puplaşmadan önce sürünerek ulaştıkları yükseklik seviyesine göre konumlandıkları bir davranış ölçütüdür (Rand vd. 2014). Bu davranış, larvaların çevresel koşullara karşı verdikleri motor ve yönelimsel tepkileri yansıttığı için gelişimsel toksisite ve çevresel stres çalışmalarında hassas bir biyobelirteç olarak kullanılır (Affleck ve Walker 2019).

Deneyisel uygulamada, larvalar genellikle standart bir besin ortamında büyütülür ve pupa evresine ulaştıklarında besin yüzeyinden yukarıya doğru tırmanarak pupa oluştururlar. Bu pupa pozisyon davranışı sayısal olarak gruplandırılarak değerlendirilir (Peterson ve Long 2018). Normal koşullarda pupaların çoğu besin yüzeyinin üst kısmına konumlanırken toksik ajanlara maruz kalan larvalar genellikle daha düşük konumlarda pupa oluşturur. Bu durum motor işlev bozukluğuna veya yönelim mekanizmalarında bozulmaya işaret eder (Anushree vd. 2023). Özellikle arsenik gibi ağır metallerin akut maruziyeti sonucunda pupaların yükseklik dağılımı değişmekte bu da nörolojik ve gelişimsel bozuklukların davranışsal düzeyde ortaya konmasına olanak sağlamaktadır (Anushree vd. 2023). Ayrıca bu yöntem stresin doğrudan ölümcül olmayan ama alt eşik etkilerini gözlemlemek için de uygundur. Çünkü pupa yüksekliği maruziyet sonucu hayatta kalan bireylerde uygulanan ajanın fizyolojik etkilerini yansıtır (Polak vd. 2004).

Pupa pozisyon analizi, bireylerin çevresel stres etkenlerine karşı gelişimsel bozukluk, defekt olmuş vücut yapısı ve puplaşma davranışındaki değişiklikler gibi farklı tepkiler verdiğini göstermek için kullanılmıştır (Polak vd. 2004; Raj vd. 2024; Niu vd. 2025). Bu yönüyle deney yalnızca çevresel faktörleri değil aynı zamanda genetik duyarlılıkları da ortaya koymak için etkilidir.

3.23. Pupa pozisyon deneyi aşamaları

Uygulama sonrası larvalar su yardımıyla elek ile besinden toplanır. *D. melanogaster* larvası (50 adet) birbirine eşit uzaklıkta (1,3 cm'lik) 5 bölüme ayrılan (A-B-C-D-BY: Besin yüzeyi) 50 ml'lik etekli falcon tüpüne konuldu. Daha sonra larvaların hangi bölgede pupa oluşturduğu kayıt edildi (Şekil 3.21). Bu deneyin sonuçları SPSS 20 paket programında ki kare testi ile değerlendirilmiştir (Fauzi vd. 2020).



Şekil 3.21. Pupa pozisyon deneyi aşamaları

3.24. *D. melanogaster* ergin ağırlık ölçümü ve larval ağırlığa ek değeri

Bir toksik ajanın uygulanmasından sonra ergin *D. melanogaster* bireylerinin ağırlığını ölçmek maddenin gelişim süreci üzerindeki toplam etkisini değerlendirmek için

kritik bir yöntemdir. Bu ölçüm, ajanın sadece larval gelişim döneminde değil aynı zamanda pupaya dönüşüm ve ergin oluşum sırasında da organizmada kalıcı etkiler bırakıp bırakmadığını gösterir (Marcus Fiumera 2016).

Örneğin, bazı kimyasallar larval ağırlığı azaltmasa bile hormonal sinyal yollarını veya metabolik rezervleri (glikojen, lipid, protein) etkileyerek erişkin bireylerin boyutunun küçülmesine, kütle kaybına ya da yaşam süresinde azalmaya neden olabilir (Chen vd. 2019).

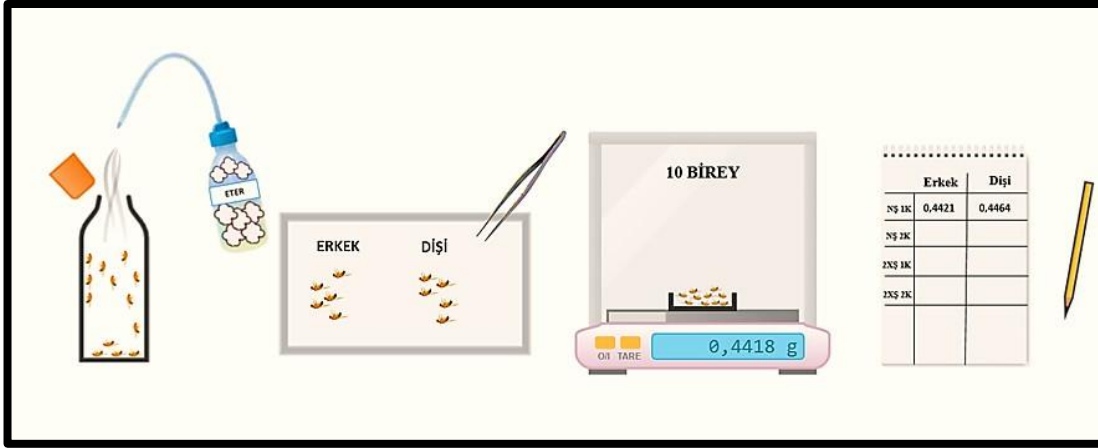
Bu rezervler, larval evrede beslenme sırasında biriktirir ve enerji kaynaklarını vücutlarında depolar (Stefanyshyn ve Strilbytska 2024). Pupa döneminde besin alımı durduğunda larval dönemde biriktirilen bu rezervler organizmanın metamorfoz sürecinde enerji sağlamak amacıyla kullanılır (Rehman ve Varghese 2021). Eğer uygulanan bir ajan bu rezervlerin birikimini engeller ya da fazla tüketilmesine neden olursa pupa gelişim süreci yetersiz kalabilir ve metabolik dengesizlikler oluşur (Strilbytska ve Semaniuk 2022). Sonuç olarak ergin bireyler daha düşük ağırlıkta, zayıf yapıda ya da işlevsel kusurlarla ortaya çıkar çünkü yeterli enerji rezervi olmadan tamamlanan metamorfoz hem morfolojik hem de fizyolojik bozukluklara yol açmaktadır (Yamada vd. 2019).

Özetle metabolik rezervler bireyin gelişimini tamamlayıp erişkin hale gelebilmesi için bulundurması gereken biyokimyasal enerji stoğudur ve bu stokların eksikliği ergin ağırlığın azalmasına, enerji dengesinin bozulmasına ve üreme başarısızlığına yol açmaktadır (Klepsatel vd. 2020). Bu nedenle ergin ağırlık yalnızca büyüme oranının değil aynı zamanda enerji kullanım etkinliğinin, hücresel stresin ve üreme potansiyelinin bir çıktısı olarak değerlendirilmektedir (Weiner vd. 2014).

Larval ağırlık tek başına gelişimin o anlık bir kesitini verirken ergin ağırlık, tüm gelişim evrelerinin bütüncül sonucunu yansıtır. Özellikle pupa dönemindeki dönüşüm süreçlerinin (örneğin larval yağ dokusunun dönüşümü) etkilerini analiz etmek açısından erişkin evrede ölçüm yapmak gereklidir (Butterworth ve Bodenstein 1965). Ayrıca ergin ağırlık, yaşam boyu kalıcılığı olan toksik etkileri (örneğin endokrin bozulmalar, oksidatif stres ya da davranışsal değişiklikler) belirlemekte de kullanılmaktadır (Wiseman vd. 2013; Rix ve Cutler 2022; El-Din ve Ghareeb 2023). Örneğin karbon nanomalzemelere maruz kalan larvalar erişkin evrede normal gelişim gösterse bile erginlerde hareket kaybı, kilo düşüşü ve ölüm oranında artış gibi sonuçlar gözlemlenmiştir (Liu vd. 2009). Bu bağlamda ergin ağırlık ölçümü larval ölçümlerin ötesine geçerek ajanın gelişimsel, metabolik ve davranışsal etkilerinin toplam bir göstergesi olarak kabul edilmektedir ve çoğu toksisite analiz protokolüne dahil edilmesi önerilmektedir (Wang vd. 2010).

3.25. Ergin ağırlık deneyi aşamaları

Yabanıl tip yumurtalar toplanarak deney tüpü içerisine konuldu. Her uygulama için 1 tane deney tüpü kullanıldı. *D. melanogaster*, 3. Larval evreye geldiğinde deney için 1-3 spatül larva deney tüpüne bırakıldı ve kullanılan uygulama maddesine maruz bırakıldı.



Şekil 3.22. Ergin Ağırlık deney aşamaları

Ergin bireyler oluşuncaya kadar larvalar uygulama maddesi ile beslenmesi gerçekleştirilir. Oluşan ergin bireyler uygulama tüpünden alınıp eterizasyon tekniği ile bayıltıldı. Her konsantrasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde 10 erkek 10 dişi birey olmak üzere toplamda 30 erkek ve 30 dişi birey hassas terazi de ölçüldü (Şekil 3.15). Deney sonucu SPSS 20 paket programında Two-way ANOVA test yöntemi aracılığıyla değerlendirilmiştir.

3.26. *D. melanogaster* Negatif jeotaksis deneyi

Negatif jeotaksis, *D. melanogaster*'in düşme veya titreşim gibi ani bir uyarıdan sonra yerçekimine zıt yönde (yukarıya) hareket etme davranışdır (Ali vd. 2011). Bu refleks, hem duyusal algılama, hem de hareket yanıtının organize edilmesi açısından sinir sistemi ve kas sistemi arasında sağlıklı bir ileti gerektirir (Taylor ve Tuxworth 2019).

Bu davranışın temel mekanizması şu şekilde işler;

- Dış uyaran (örneğin tüpün dibine düşme), öncelikle sineğin vücudundaki mekanosensör hücreler tarafından algılanır. Bu hücreler, sineğin yer değiştirdiğini ve pozisyonunun değiştiğini tespit eder.
- Bu algı sinyalleri, duyusal sinirler aracılığıyla sineğin merkezi sinir sistemine (özellikle ventral sinir kordonuna) iletilir.
- Merkezi sinir sistemi bu bilgiyi işler ve uygun bir motor yanıt oluşturur.
- Motor sinir hücreleri bu yanıt bacak kaslarına iletir ve sinek yukarıya doğru tırmanma-uçma davranışını başlatır.

Bu süreç boyunca hem sinir hücreleri arasındaki sinaptik iletişim hem de kasların bu sinyallere yanıt verme kapasitesi etkili bir şekilde çalışmalıdır. Eğer herhangi bir noktada sinirsel iletim zayıflarsa (örneğin toksik madde maruziyeti, yaşlanma veya genetik mutasyon nedeniyle), tırmanma-uçma refleksi yavaşlar, gecikir ya da hiç gerçekleşmez (Rhodenizer vd. 2008).

Bu süreç boyunca hem sinir hücreleri arasındaki sinaptik iletişim hem de kasların bu sinyallere yanıt verme kapasitesi etkili bir şekilde çalışmalıdır. Çünkü negatif jeotaksis gibi refleks hareketler, duyuşsal algının merkezi sinir sisteminde işlenmesi ve motor nöronlar aracılığıyla kaslara doğru yanıtın iletilmesini gerektirir (İliadi ve Boulianne 2010; Mishra vd. 2023).

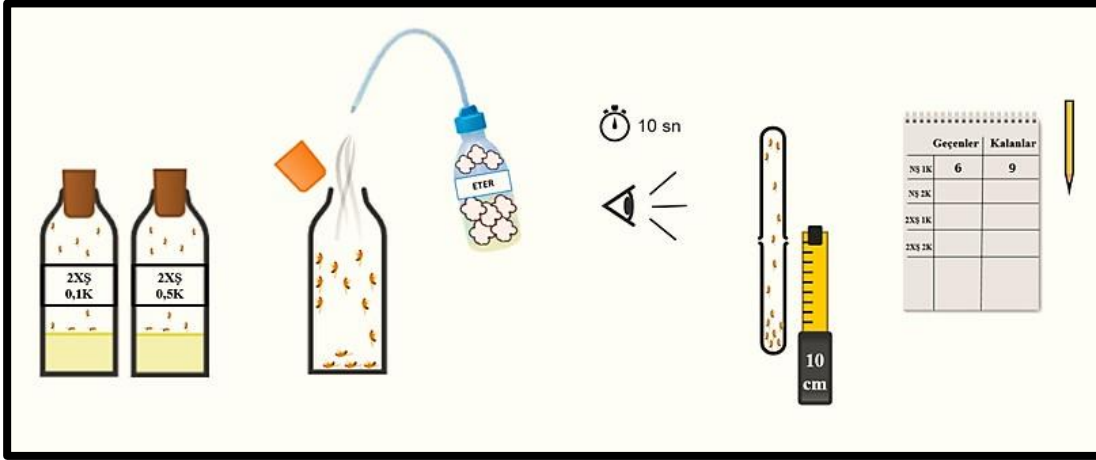
Bu yöntem sayesinde bireylerin kas gücü, refleks yanıt süresi ve nöromotor koordinasyonu hakkında nicel veri elde edilir (Mukherjee 2020; Cabrita vd. 2022; Büschges ve Ache 2025). Negatif jeotaksis ölçümleri yaşla ilişkili motor kayıpların saptanmasında yaygın olarak kullanılmakta olup yaşlanma süreci boyunca azalan hareket kabiliyetini güvenilir şekilde ortaya koymaktadır (Yusuf vd. 2024). Ayrıca *Parkinson* ve *Alzheimer* hastalıklarının modellendiği *D. melanogaster* bireylerindeki negatif jeotaksiste azalma nörodejeneratif etkilerin doğrudan bir göstergesi olarak rapor edilmiştir (Moulin vd. 2021; Rahul ve Siddique 2022).

Eğer herhangi bir noktada sinirsel iletim zayıflarsa (örneğin toksik madde maruziyeti, yaşlanma veya mutasyon nedeniyle), tırmanma-uçma refleksi yavaşlar, gecikir ya da hiç gerçekleşmez. Yaşlanmayla birlikte hem sinaptik fonksiyonlar zayıflamakta hem de motor sinyallerin kaslara iletimi gecikmektedir bu da negatif jeotaksis performansında anlamlı düşümlere yol açmaktadır (Rhodenizer vd. 2008; Jones ve Grotewiel 2011; Hu vd. 2020). Bu refleksin zayıfladığı gözlenerek motor disfonksiyonun ve sinir sistemi hasarının davranışsal çıktıları değerlendirilmektedir (Abdulkaki ve Al-Deeb 2022).

3.27. Negatif jeotaksis deney yapılışı

Deney için gerekli uygulamalar yapıldıktan sonra 3 tekrarlı olacak şekilde 30 birey toplamda 90 ergin birey deney için kullanılmıştır. Deney yapılma aşamasına geçildiğinde *D. melanogaster* eter ile bayıltılıp 3 tekrarlı 30 birey olacak şekilde besiyeri içermeyen ve 10 cm uzunluğa sahip tüpler içerisine konuldu. Sineklerin Eter etkisinden çıkması için 3 saat kadar bekletildi ve süre sonunda kendine gelen sineklerin tüpün dibine inmesi için zemine 3 kez vuruldu. Tüp üzerine başka bir boş tüp koyuldu ve sineklerin tüpün alt kısmına inmesi sağlandı. Tüpün dibinden 30 saniye içerisinde 10 cm'nin üzerine geçen, üstte bulunan tüpe geçen, sinekler kayıt edildi (Şekil 3.16). Negatif jeotaksis

deneyinden elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 20 paket programında one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) test yöntemi ile değerlendirilmiştir (Manjila ve Hasan 2018).



Şekil 3.23. Negatif jeotaksis deney aşamaları

3.28. *D. melanogaster* ömür uzunluğu deneyi

D. melanogaster, kısa yaşam döngüsü (~60-90 gün), kolay yetiştirme koşulları ve genetik manipülasyona açıklığı nedeniyle yaşlanma araştırmaları için ideal bir model organizmadır. Ömür uzunluğu deneyi, belirli sayıda ergin sineğin çıkışından itibaren belirli aralıklarla izlenerek ne kadar süre hayatta kaldıklarının ölçülmesidir (Linford vd. 2013).

Deney başlangıcında aynı gün yumurtadan çıkan aynı yaşta ve aynı şartlar altında ergin hale gelen bireyler seçilir. Sinekler, genellikle 20-50 birey içeren tüplere yerleştirilir ve her 2-5 günde bir taze besin ortamına aktarılır ve ölen bireyler sayılarak yaşam eğrileri oluşturulur (Jafari 2010). Ömür uzunluğu, yalnızca yaşam süresinin uzunluğunu değil aynı zamanda yaşlanma hızını, stres dayanımını ve genel fizyolojik durumu yansıtır. Özellikle besin içeriği, genetik mutasyonlar, çevresel toksinler veya farmakolojik ajanlar gibi faktörlerin yaşam süresine etkisi bu yöntemle karşılaştırılabilir şekilde değerlendirilmektedir (Kim vd. 2011).

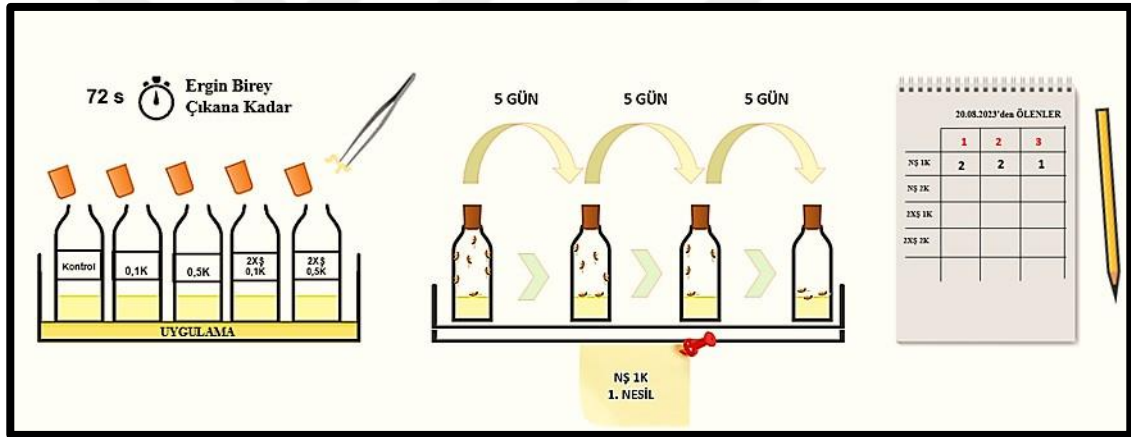
Bu deney aynı zamanda “healthspan” sağlıklı yaşam süresi kavramının da analizine imkân verir. Örneğin bir ajan yaşam süresini uzatıyorsa bununla birlikte hareket kabiliyeti, stres toleransı ya da üreme kapasitesi gibi parametrelerde de iyileşme olup olmadığına bakılmaktadır (Rogers vd. 2012; Shindyapina vd. 2022; Banse vd. 2024).

Bazı kimyasal maddeler, organizmaya akut toksik etki göstermeyebilir fakat uzun süreli maruziyet sonucunda yaşam süresini kısaltabilir. Bu durumda ömür uzunluğu deneyleri, subletal (ölümcül olmayan) ancak zararlı etkileri ortaya koymakta kullanılmaktadır (Holsopple vd. 2023). Örneğin düşük dozda pestisit ilk başta sinekleri öldürmeyebilir ancak bu sineklerin ömürlerini önemli ölçüde kısaltmaktadır (Deans ve Hutchison 2022; Martelli vd. 2022; Ullah vd. 2024).

Drosophila'nın genetik yapısı insan yaşlanma mekanizmasıyla ilgili birçok yolakla (örneğin: insülin/*IGF-1*, *TOR*, *FOXO*, *Sir2*) ortaktır (Wang 2018; Jiang vd. 2019; Tabibzadeh 2021). Bu genlerdeki mutasyonlar yaşam süresini uzatabilir ya da kısaltabilir. Ömür uzunluğu deneyi bu değişimlerin etkisini test etmede temel yöntemdir (Bauer vd. 2004; Spoor 2018; Lee ve Lee 2022). Örneğin *Sir2* geninin aşırı ekspresyonu ile yaşam süresinin uzadığı öte yandan insülin yolunun aşırı aktive edilmesinin yaşam süresini kısalttığı gösterilmiştir (Lee vd. 2010).

3.29. Ömür uzunluğu deney yapılışı

Her uygulama için 3 tekrar yapıldı. Seçilen 70 ± 4 saatlik 50 adet larva deney tüplerine aktarıldı. Ergin bireyler pupadan çıktıktan sonra 5 günde bir yeniden besiyeri hazırlanır ve hazırlanan besiyerlerine uygulama maddesi eklenerek canlı bireyler bir sonraki deney tüpüne aktarıldı. Her aktarım sonrası hangi tüpte ne kadar canlının öldüğü not edildi. Bu deney, tüp de bütün sinekler ölene kadar devam ettirildi. Bu deney sonucunda veriler SPSS 20 paket programında One way Anova test yöntemi ile değerlendirilmiştir (Linford vd. 2013).



Şekil 3.24. Ömür uzunluğu deneyinin aşamaları

3.30. *D. melanogaster* iki yönlü besin analizi

D. melanogaster'de uygulanan iki yönlü besin analizi deneyi, sineklere aynı anda iki farklı besin (örneğin şekerli ve kafeinli çözeltiler) sunularak hangi seçeneğe yöneldiklerinin davranışsal olarak ölçüldüğü temel bir tekniktir (Sellier 2010). Bu yöntem duyu sistemlerinin ve bunlara bağlı nörolojik ağların besin tercihi üzerindeki etkilerini anlamak için kritik öneme sahiptir (Apostolopoulou vd. 2016). Özellikle genetik olarak müdahalelere açık olması nedeniyle *D. melanogaster*, tat ve koku reseptörlerinin fonksiyonel rollerini incelemek adına ideal bir model organizmadır (French vd. 2015).

Bu deneyin en sık kullanıldığı durum sineklerin yüksek enerji içeriği nedeniyle şekerli çözeltileri tercih edip potansiyel toksisite barındıran kafeinli çözeltilerden kaçınıp kaçınmadıklarını analiz etmektir (Vosshall ve Stocker 2007). Şekerli çözeltiler *Gr43a*

gibi tat reseptör nöronları (GRN) tarafından tespit edilerek merkezi sinir sistemine pozitif sinyaller gönderirken kafein *Gr66a* gibi acı reseptörleri tarafından algılanarak kaçınma davranışına neden olmaktadır (Masek ve Keene 2016). Tat ve koku sinyalleri merkezi sinir sistemine iletdikten sonra subesofageal ganglion ve antennal lob gibi özel yapılar tarafından işlenir ve bu sayede besin yönelimi gerçekleşmektedir (Herrero 2012). Bu sinyaller, beynin karar alma merkezlerinde işlenip değerlendirilerek davranışa dönüşür ve deney boyunca sineğin tercih ettiği çözeltinin belirlenmesini sağlar (Li 2025). Bu sistemin nörogenetik temeli *D. melanogaster*'de yaklaşık 60 farklı tat reseptör geninin özel olarak ifade edilmesine ve görev paylaşımı yapmasına dayanır (Cobb vd. 2009). Kafein gibi acı bileşenlerin saptanmasında görev alan bu nöronlar aynı zamanda öğrenme ve hafıza süreçleri ile ilişkilidir ve bu da *D. melanogaster* 'yi sadece bir davranış modeli değil aynı zamanda bir nörobilim platformu hâline getirir (Ghosh 2020).

Hayvanlarda kemosensasyon, çevreden gelen kimyasal ipuçlarını tanımayı sağlayan temel bir duyuşal süreçtir ve bu sistem organizmaların uygun besin kaynaklarını seçmesini ve toksik bileşiklerden kaçınmasını mümkün kılar (Komarov ve Sprecher 2022). Kemosensasyon iki ana bileşene ayrılır: tat (gustation) ve koku (olfaction), bu iki sistem farklı kemoreseptör aileleri ve sinirsel yollarla algıyı yönetir (Joseph ve Carlson 2015). Meyve sinekleri ve sivrisinekler gibi böcekler, çevresel kimyasal sinyallere karşı oldukça gelişmiş kemosensör sistemlere sahiptir (Keesey 2022). Böceklerde tat alma, “gustatory sensilla” olarak adlandırılan ve ağız, bacak ve antenlerde bulunan yapılar sayesinde gerçekleşmektedir (King ve Gunathunga 2023). Koku nöronları ise anten ve maksiller palp üzerinde bulunarak çevredeki kimyasalları algılar (Mansourian 2018). *Drosophila*'da bu yapılar, şeker, tuz, amino asitler, ekşi ve acı gibi tat modalitelerini ayırt etmekte görevli tat reseptör nöronlarını içerir (Shrestha ve Lee 2023). Koku alma sistemi ise özellikle anten ve maksiller palp bölgelerinde yer alan olfaktör reseptörlerle uçucu bileşikler algılayarak, besin ve konak tespiti gibi davranışları yönlendirir (Ruedenauer vd. 2023). Sivrisinekler gibi hematofag türlerde kemosensör sistemler, konak seçimi için insan teri ve nefesindeki karbondioksit gibi bileşikler saptamaya özelleşmiştir (Anholt 2020). Bu nedenle böceklerdeki tat ve koku reseptörlerinin evrimsel çeşitliliği, yalnızca beslenme değil aynı zamanda üreme, yuvalama ve kaçınma davranışları gibi karmaşık yaşam stratejilerinin düzenlenmesinde de merkezi bir rol oynar (Depetris-Chauvin ve Galagovsky 2015).

1. *Drosophila* Oregon R⁺ hattına ait bireylerden 8 saatlik yumurtalar toplanmıştır.
2. Yumurtalar, 72±4 saate ulaşana kadar gelişmeye bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, larva içeren şişeler musluk suyu altında yıkanmış ve larvalar ince gözenekli bir elek yardımıyla ayrılmıştır.
3. Elde edilen larvalar, deney gruplarına ait farklı konsantrasyonlardaki besiyerlerine 1–2 mikrospatül aktarılmıştır.
4. 72±4 saatlik larvalar (3. larval evrenin başı), 2 kat yüksek şekerli besin ortamlarına aktarılmıştır.
5. 20 şişe şekerli besinde larvalar ergin hale gelene kadar uygulama ortamında tutulmuştur.
6. Ergin hale gelen 3-5 günlük bireyler gün öncesinden hazırlanmış % 1'lik agarlı şişelere alındı.

7. Ergin bireyler 18 saat besin ortamından uzak sadece agarlı şişelerde bekletilerek aç bırakıldı.
8. Deney sabahı 72 well plate içerisinde farklı uygulama kimyasallarının çeşitli konsantrasyonlarını içeren % 1 agarozlu besin ortamları hazırlandı. Bu ortamlardan biri yalnızca 2 mM sakkaroz içerirken diğerleri 2 mM sakkaroz ek olarak belirlenen konsantrasyonlarda uygulama kimyasalı bulunuyordu.
9. Bu gıda kaynakları 0.125 mg/mL mavi renklendirici (Brilliant blue FCF) ve 0.1 mg/mL kırmızı renklendirici (sülforhodamin B) gıda boyaları ile karıştırılarak 72 kuyucuklu mikrotitre kaplarına zikzak desende dağıtılır (Rimal vd. 2020; Shrestha ve Lee 2021).
10. 18 saatin sonunda erginler eter ile bayıltılarak 30 erkek 30 dişi olmak üzere toplam 60 birey 72 well plate içerisine alındı.
11. Bireyler ayılıncaya kadar beklenildi. Ayıldıktan sonra 120 dakika 25 °C’de % 60 nem de ve karanlıkta bekletildi.
12. Süre sonunda bireyler +4°C de buzdolabında muhafaza edildi. Bireyler buzdolabı içerisinde 7 güne kadar kalabilir. Dolaptan çıkardıktan hemen sonra stereo mikroskop altında sayım yapıldı.
13. Sonuçlar dahilinde $(P.I.) = (NB + 0,5NP)/(NR + NB + NP)$ formülünden gıda seçim indeksi hesaplandı. Renksiz bireyler hesaplama dahil edilmedi. Mavi (NB), kırmızı (NR) veya (NP) mor abdomenli sinekler olarak sınıflandırılır.



4. BULGULAR

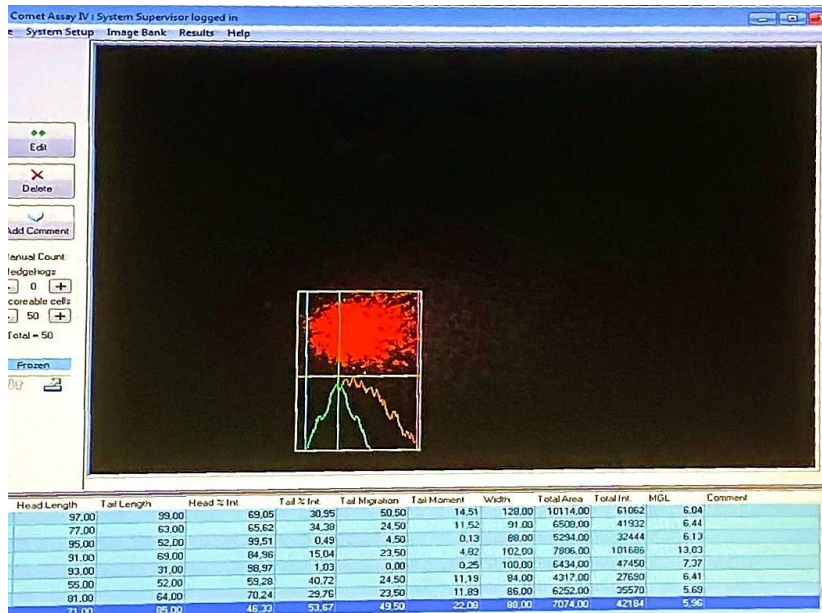
4.1. *D. melanogaster* moleküler çalışmalar

4.2. *D. melanogaster* beyin hücrelerinde tek hücre jel elektroforez (KOMET) testi

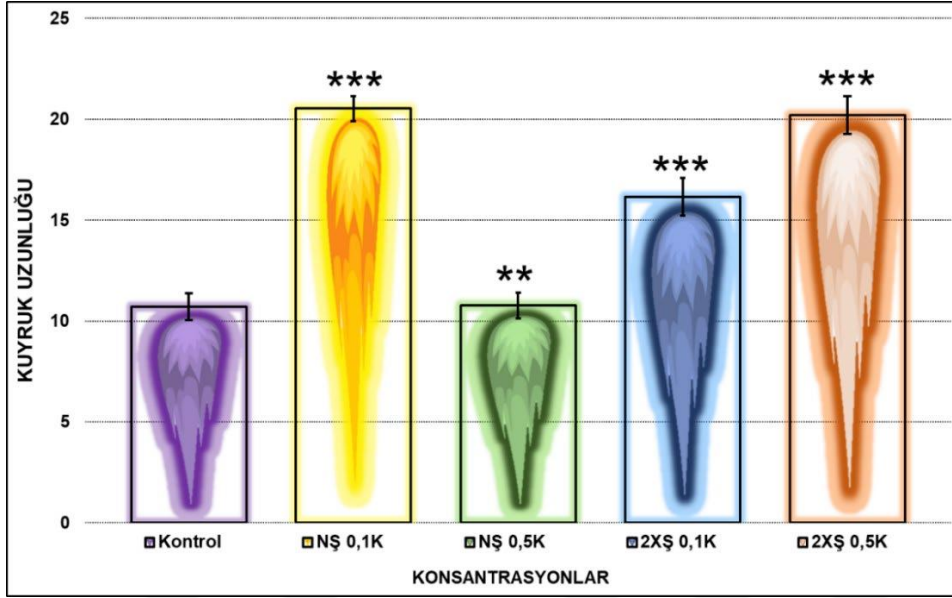
Komet testine ilişkin verilerin analizinde baş uzunluğu, baş yoğunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk göçü, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti gibi birçok parametre vardır (Şekil 4.1) fakat literatürde DNA kırıklıklarını değerlendirirken üç temel parametre öne çıkmaktadır: kuyruk uzunluğu (μm), kuyruk yoğunluğu (%) ve kuyruk momenti (kuyruk uzunluğu $\times$ kuyruk yoğunluğu). Bu parametreler arasında, DNA hasar düzeyini niceliksel olarak yansıttığı için kuyruğun yoğunluğu en yaygın tercih edilen değerlendirme ölçütüdür. Dozlar arttıkça kontrole kıyasla tüm parametrelerde (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti) istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir.

- Kuyruk uzunluğu bakımından çalışılan bütün dozlarda (NŞ 0,1K - NŞ 0,5K - 2XŞ 0,1K - 2XŞ 0,5K) kontrol grubuna kıyasla istatistiksel önemde artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).
- Kuyruk yoğunluğu bakımından kontrole kıyasla 2XŞ 0,1K anlamlı fark gözlemlenmiştir. Diğer taraftan NŞ 0,5K ve 2XŞ 0,5K dozlarında ise kuyruk yoğunluğunda kontrole kıyasla yüksek oranda artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).
- Kuyruk momenti sonucunda kontrole kıyasla uygulanan bütün dozlarda DNA kırıkları bakımından istatistiksel önemde anlamlı bir fark belirlenmiştir (Şekil 4.4).

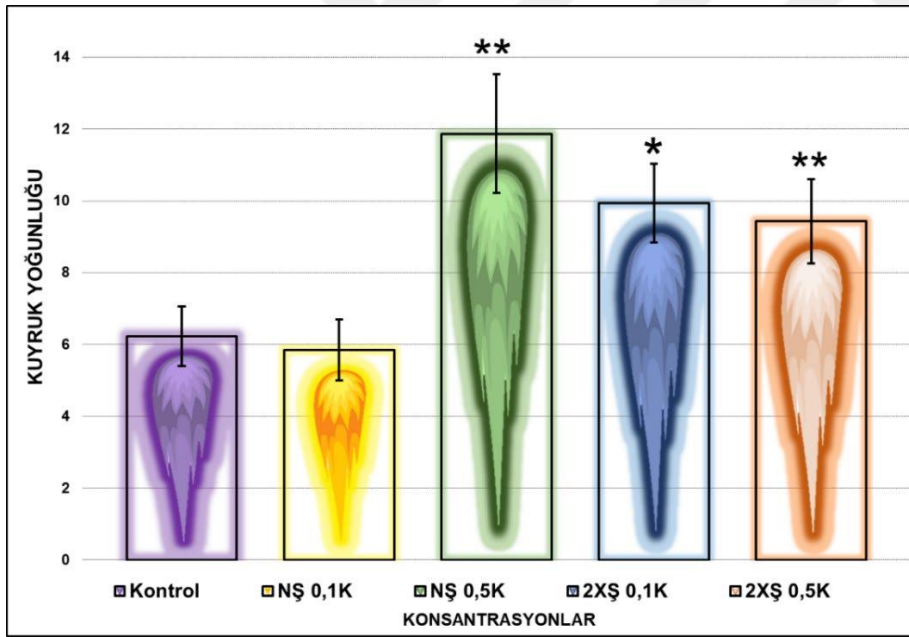
Kontrol grubu, Lewis besin ortamına göre hazırlanmış optimum besinde gelişen *D. melanogaster* bireylerinden alınan sonuçlar. Tüm sonuçlar negatif kontrole göre karşılaştırılmıştır (* $p < 0,05$). Hazırlanan preparatlardaki DNA hasarı Nikon Eclipse E200 ışık mikroskobunda COMET Assay (Comet assay IV version 4.11) yazılımından elde edilen veriler ile hesaplanmıştır. Her konsantrasyon için 50 beyin hücresi sayılmıştır. Elde edilen veriler SPSS programında One-way ANOVA ile değerlendirilmiştir.



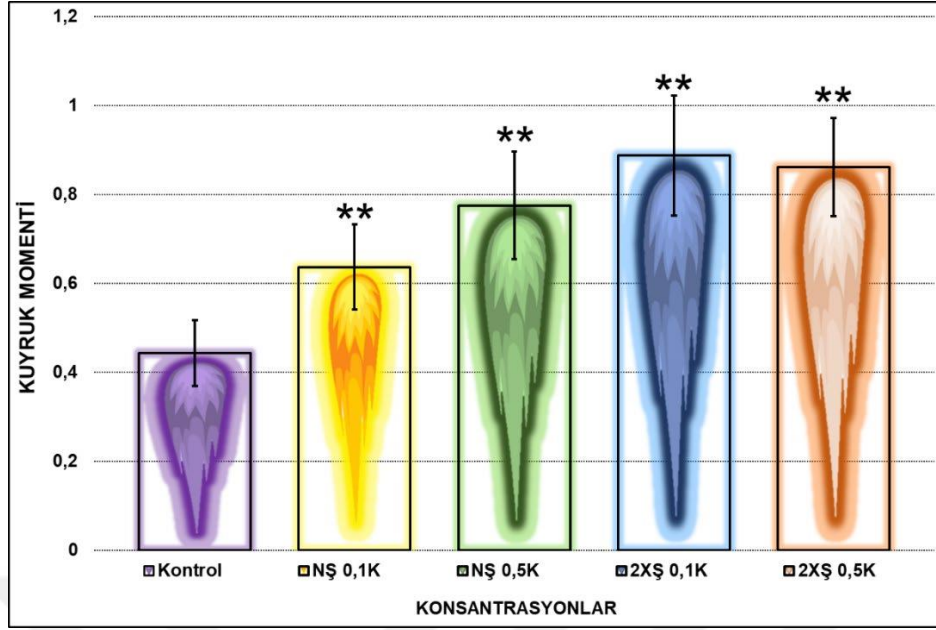
Şekil 4.1. COMET assay IV programında ölçümü ve değerlendirme parametreleri



Şekil 4.2. Beyin KOMET kuyruk uzunluğu bakımından konsantrasyonlar (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)



Şekil 4.3. Beyin KOMET kuyruk yoğunluğu bakımından konsantrasyonlar (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)

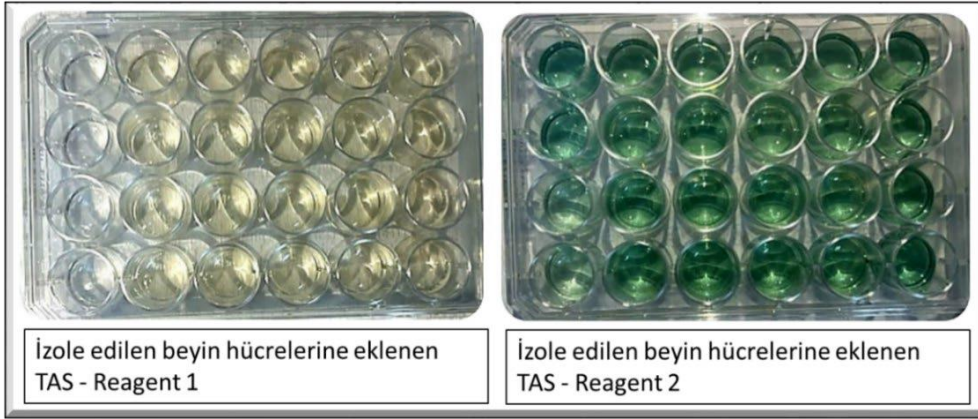


Şekil 4.4. Beyin KOMET kuyruk momentini bakımından konsantrasyonlar (*0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001)

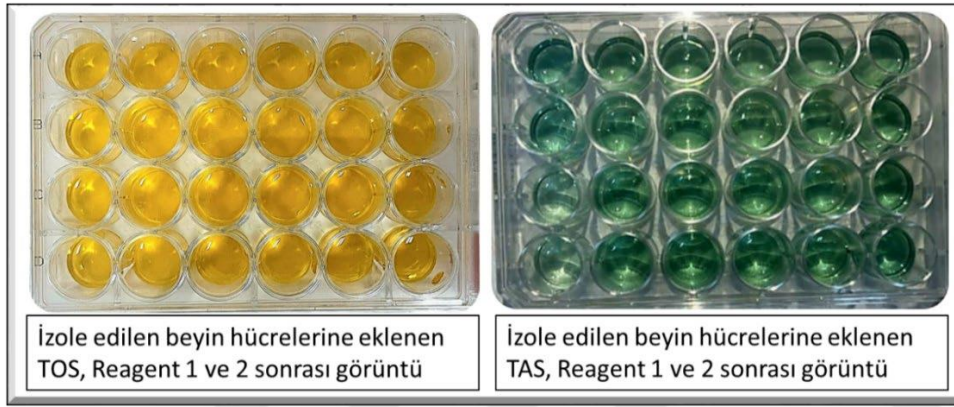
D. melanogaster beyin komet çalışmasında uygulanan dozlar için (Kontrol, NŞ 0,1K, NŞ 0,5K, 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K) üç parametrede de (kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentini) kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı fark gözlemlenmiştir. Bu bağlamda kullanılan dozların istatistiksel olarak anlamlı nörotoksik etkisinin olduğu sonucu elde edilmiştir.

4.3. *D. melanogaster* beyin hücrelerinde total antioksidan (TAS) ve total oksidan (TOS) ölçümü

Uygulanan konsantrasyonlar sonucunda *D. melanogaster* beyin hücrelerinde toplam antioksidan ve toplam oksidan miktarlarının ve oksidatif stres indeksinin ölçümü TAS/TOS kiti kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Oksidatif stres ve redoks dengesizliği düzeyini belirlemek için OSI (Oksidatif Stres İndeksi) hesaplandı. TAS, tüm antioksidanların toplam aktivitesini gösterirken; TOS, reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzeyini yansıtır. OSI ise bu iki parametreye dayanarak oksidatif stres seviyesini ortaya koyar. OSI, TOS'un TAS'a oranı olarak belirlenir ve şu formül ile ifade edilir: $OSI = \frac{TOS [\mu\text{mol/L}]}{TAS [\mu\text{mol/L}]} \times 100$. OSI değerinin yüksek olması, antioksidan savunmaya kıyasla oksidatif süreçlerin baskın olduğunu gösterir (Erel 2005; Polat vd. 2023). Bütün ölçümler Thermo multiskan spektrofotometre ile yapılmıştır. Elde edilen veriler SPSS programında One-way ANOVA ile değerlendirilmiştir.



Şekil 4.5. Toplam Antioksidanın spektrofotometrede ölçüme hazırlanmış deney aşaması



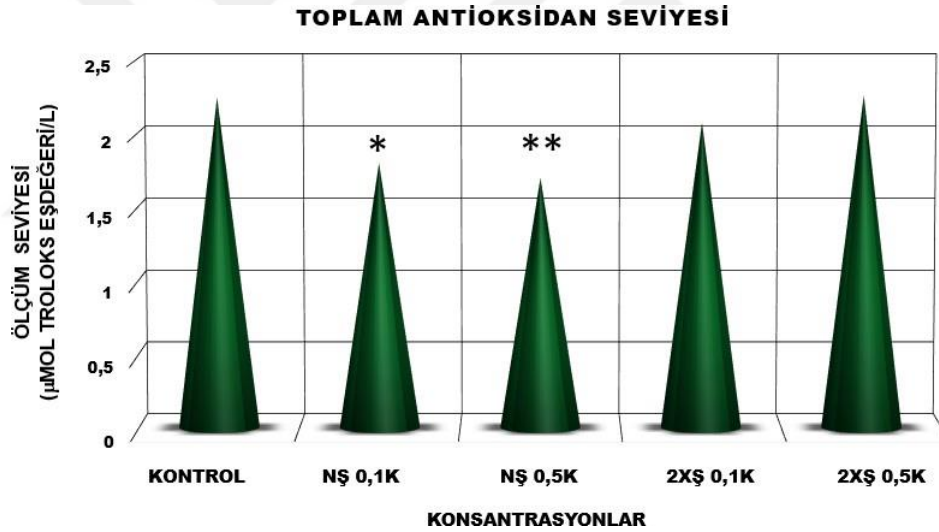
Şekil 4.6. TAS ve TOS ölçüm öncesi görüntüsü

TAS/TOS deneyinden elde edilen veriler dahilinde;

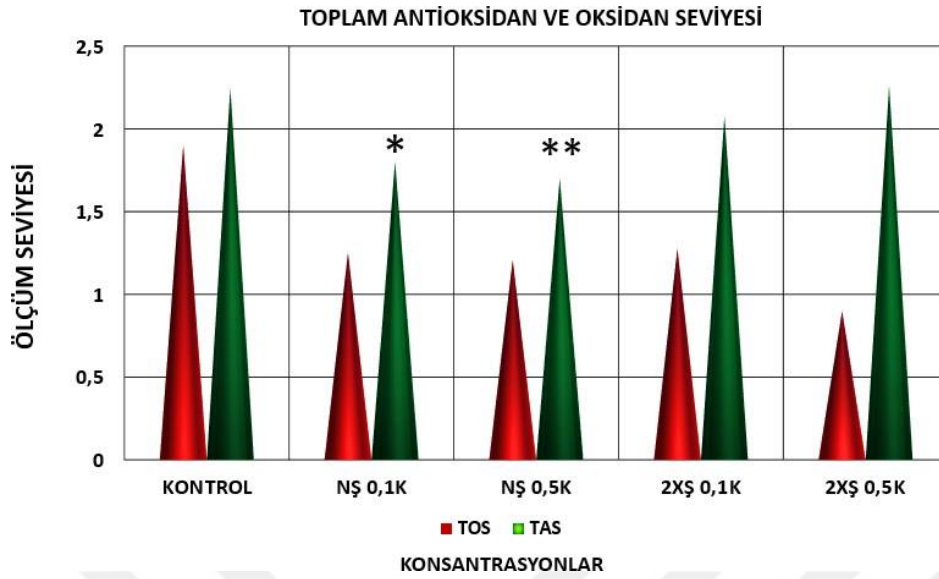
- Toplam oksidan seviyelerinin (TOS) seviyesinde konsantrasyonların etkisi istatistiksel anlamlı fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.7).
- Toplam antioksidan seviye (TAS) ölçüm sonuçlarına göre kontrole kıyasla 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K dozlarında anlamlı fark gözlemlenmemiştir. NŞ 0,1K için anlamlı fark vardır. NŞ 0,5K için ise yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).
- Oksidatif stres İndeksi (OSİ) sonuçlarına göre dozlar arttıkça kontrole kıyasla OSİ değerinin azaldığı ortaya konmuştur fakat istatistiksel anlamlı fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.9).



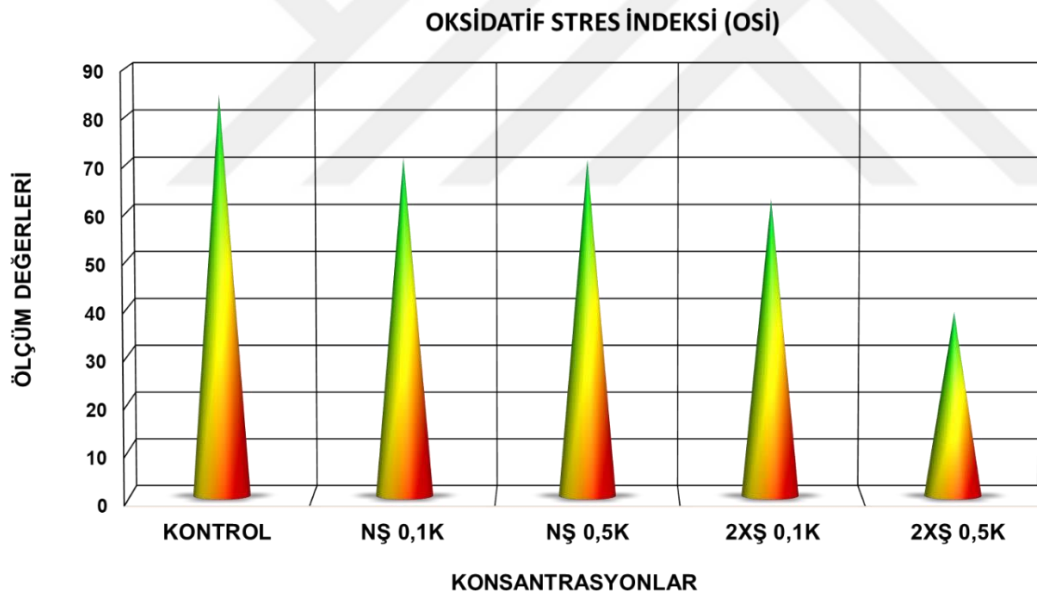
Şekil 4.7. *D. melanogaster* beyin hücreleri için kullanılan dozlardaki toplam oksidan seviyesinin gösterimi (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)



Şekil 4.8. *D. melanogaster* beyin hücreleri için kullanılan dozlardaki toplam antioksidan seviyesinin gösterimi (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)

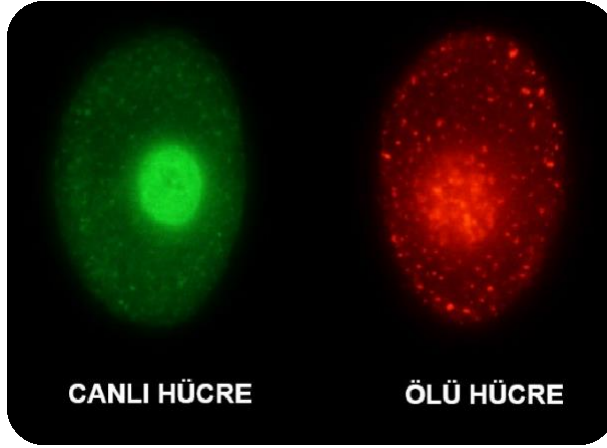


Şekil 4.9. *D. melanogaster* beyin hücreleri için kullanılan dozlardaki toplam oksidan ve antioksidan seviyesinin gösterimi (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)



Şekil 4.10. *D. melanogaster* beyin hücreleri için kullanılan dozlardaki oksidatif stres indeksinin gösterimi (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)

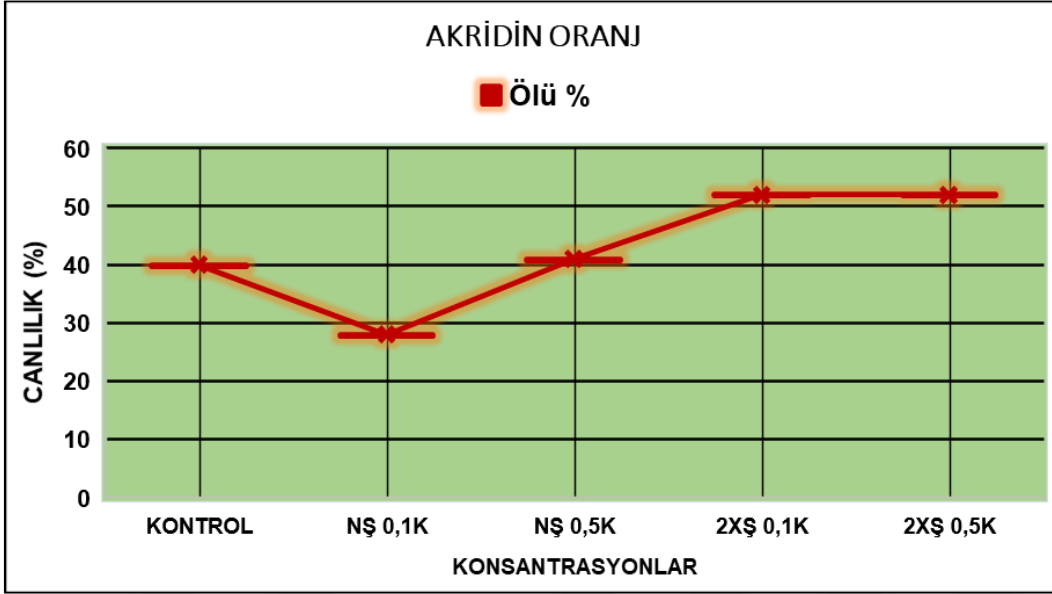
4.4. *D. melanogaster* beyin hücrelerinde akridin oranj ölçümü



Şekil 4.11. Canlı ve ölü hücreden yayılan yeşil ve kırmızı yansıma

D. melanogaster beyin hücrelerinde hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Akridin Oranj canlı hücrelerde yeşil, Etidyum Bromid ise sadece membranı bozulmuş, ölü hücrelerde kırmızı floresans verir. Yapılan boyama sonucunda, canlı hücreler yeşil, apoptotik hücreler turuncu ve nekrotik hücreler kırmızı renkte gözlemlenmiştir. Bu sayede hücre popülasyonundaki canlı ve ölü hücreler net şekilde ayırt edilebilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan 5 konsantrasyon için akridin oranj testi uygulanmıştır. Her konsantrasyon için 100 hücre sayılmıştır. Sayım floresan ışık mikroskopunda gerçekleştirilmiştir.

- Kontrole grubuna kıyasla dozların konsantrasyonu arttıkça canlılık yüzdesi giderek azalmıştır.
- NŞ 0,1K konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla azalma gözlemlenmiştir.
- Konsantrasyonlar arttıkça ölü hücre sayısı artmıştır.

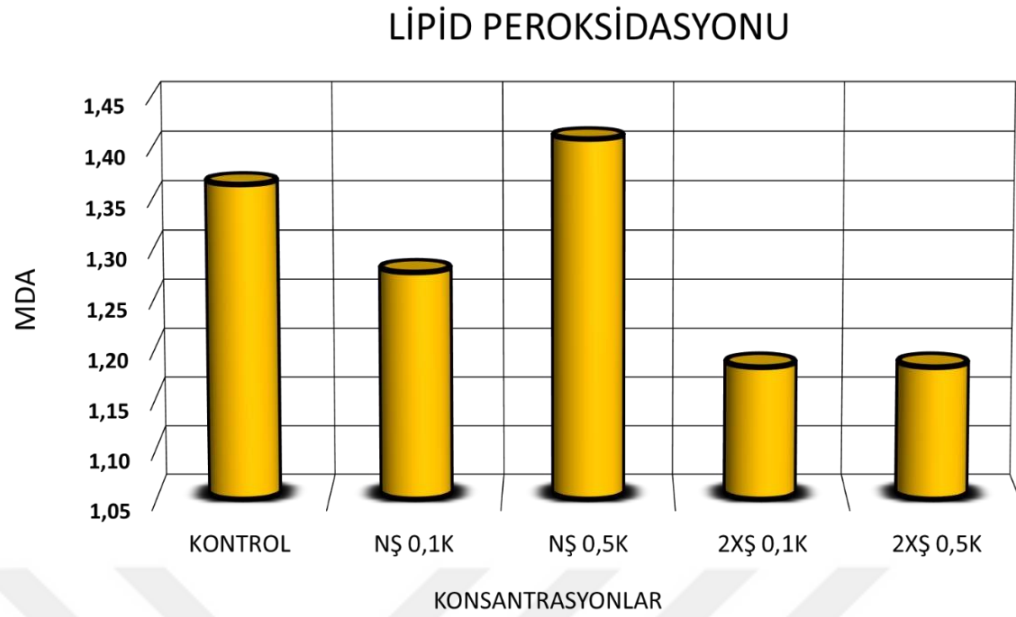


Şekil 4.12. *D. melanogaster* beyin hücrelerinde ölüm yüzdesinin gösterimi (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

4.5. *D. melanogaster* beyin hücrelerinde tiyobarbitürik asit ile lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

D. melanogaster'in beyin hücrelerinde lipid peroksidasyon düzeyleri, tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntemle peroksidasyona uğrayan lipidlerin son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarı ölçülerek hücresel oksidatif hasar düzeyi belirlenmiştir. Lipidler yalnızca hücre zarında değil aynı zamanda lipid damlacıkları, organel zarları ve sinyal iletim yollarında da yer aldığından, peroksidasyon farklı hücresel bölgeleri etkileyebilir. Ancak elde edilen sonuçlara göre, uygulanan farklı dozlar arasında MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Elde edilen veriler dahilinde uygulanan dozların *Drosophila* beyin hücrelerinde belirgin bir oksidatif stres yanıtı oluşturmadığını ve lipid peroksidasyonunun anlamlı düzeyde artmadığını göstermektedir. Elde edilen veriler SPSS programında One-way ANOVA ile değerlendirilmiştir.

- Dozların lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisinde istatistiksel anlamlı fark gözlemlenmemiştir.
- NŞ 0,5K uygulamasında kontrole kıyasla az miktarda artış görülmesine karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir



Şekil 4.13. *D. melanogaster* beyin hücrelerinde yapılan lipid peroksidasyonu sonuçları (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

4.6. *D. melanogaster*de gerçekleştirilen davranış deneyleri

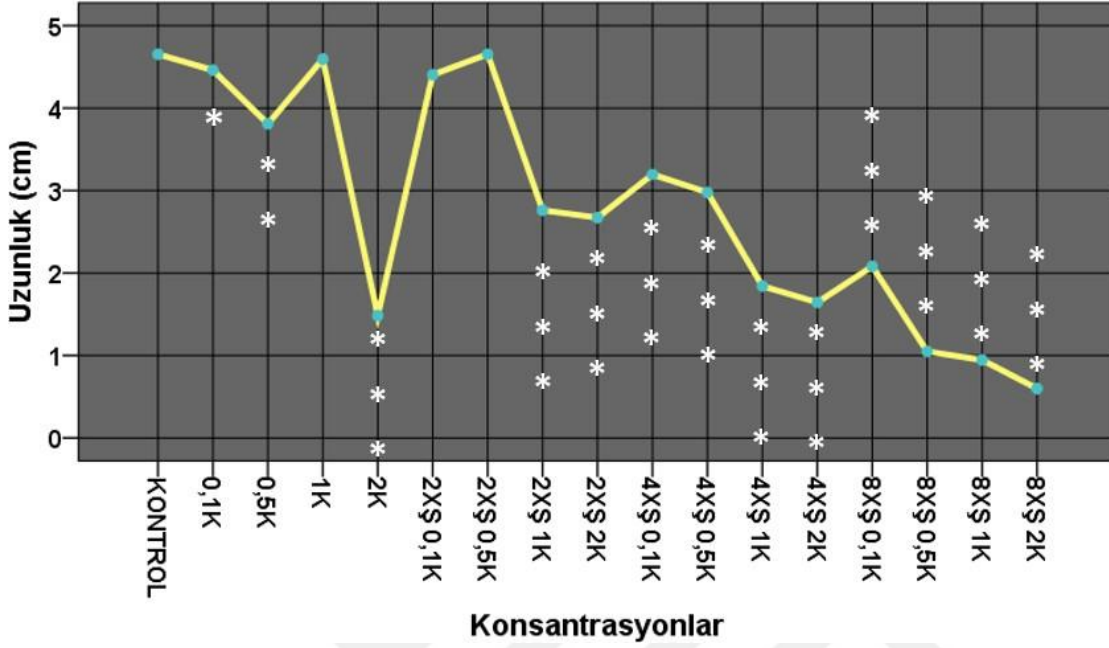
4.7. *D. melanogaster* larval sürünme

D. melanogaster larvaları, ritmik kas kasılmalarıyla sürünerek hareket eder. Bu hareket, merkezi sinir sistemi ve proprioseptif (canlının kendi vücut pozisyonunu ve kas gerilimini algılama yetisi) geri bildirimle düzenlenir (Heckscher vd. 2012). Sürünme sırasında çevreyi keşfetmek için yön değiştirirler (Berni vd. 2012). Neuromekanik modeller bu hareketin fiziksel temellerini açıklar (Sun vd. 2022). Bu model, nöromotor hastalıkların incelenmesinde kullanılır (Günther vd. 2016). Deney için 3. larval evrede 24 saat uygulama ajanına maruz kalan bireylerin %2'lik agar üzerinde 1 dakika içerisindeki kat ettikleri yolu ölçülmektedir.

- Larval sürünme deneyinde One way Anova testine göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.
- Kontrole kıyasla 0,1K anlamlı fark ortaya koymuştur.
- Kontrole kıyasla 0,5K dozu için yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir (** 0,001 < P < 0,01).
- 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K dozlarında kontrole kıyasla anlamlı fark gözlemlenmemiştir.
- 2K - 2XŞ 1K - 2XŞ 2K - 4XŞ 0,1K - 4XŞ 0,5K - 4XŞ 1K - 4XŞ 2K - 8XŞ 0,1K - 8XŞ 0,5K - 8XŞ 1K - 8XŞ 2K dozlarında kontrol grubuna kıyasla çok yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir (** P < 0,001).

Larval sürünmenin 1. nesil sonuçlarına bakıldığında kontrol grubu yaklaşık olarak 4,6 cm sürünme gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Sadece kafein uygulamalarında bu uzunluk ortalama 4,1 cm olarak bulunmuştur. 2 kat şeker uygulamalarında larval sürünme ortalama 3,5 cm. olarak gözlemlenmiştir 4 kat şeker uygulamalarında sürünme uzunluğu

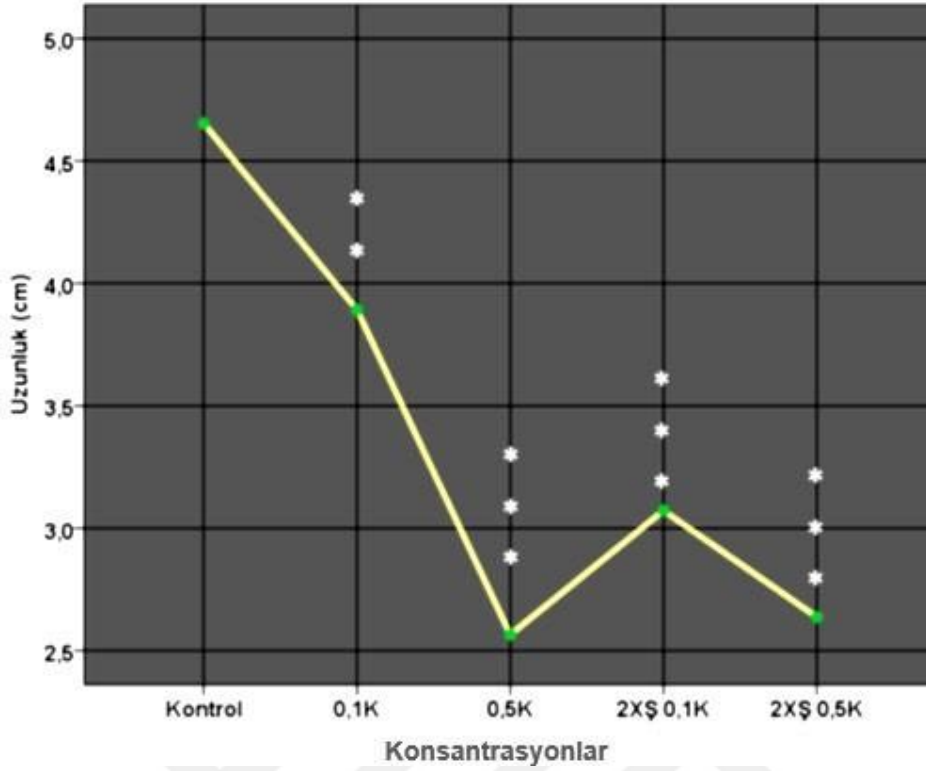
ortalama 3 cm uzunluğa sahiptir. 8 kat şekerin kafeinli grubunda ise sürünme uzunluğunun 1,9 santimetreye kadar düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. Larval sürünme 1. nesil deneyinin grafiksel gösterimi. Kontrole kıyasla anlamlı fark ortaya koyulmuştur (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

D. melanogaster 3. nesil larval sürünme sonuçlarına bakıldığında kontrol grubu ortalama 4,6 cm değer alırken yalnız kafein uygulamasında sürünme uzunluğu ortalama 3,2 cm görülmüştür. 2 kat şeker ortalama 1,9 cm sürünme gerçekleştirilmiştir. Ek olarak 2 kat şekerin 1. nesil deney sonuçlarına bakıldığında ortalama 3,5 cm değer aldığı ortaya koyulduğundan nesil ilerledikçe çalışma dozlarının etkisi larval sürünme uzunluğuna daha çok yansıdığı gözlemlenmiştir. 4 kat şeker ise ortalama 3,3 cm sürünme gerçekleştirmiştir.

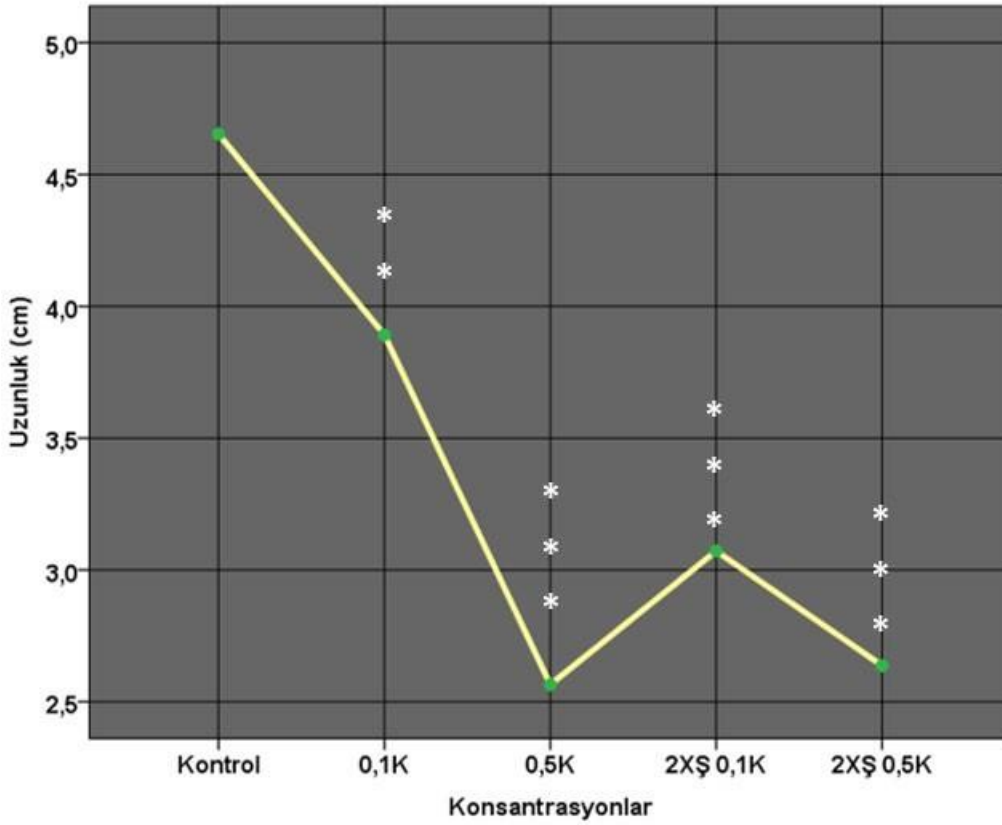
- Uygulanan dozlarda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür.
- Kontrole kıyasla 0,1K dozunda yüksek anlamlı fark görülmüştür.
- 0,5K - 2XŞ 0,1K - 2XŞ 0,5K - 4XŞ 0,1K - 4XŞ 0,5K dozlarında kontrol grubuna kıyasla çok yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir.



Şekil 4.15. Larval sürünme 3. nesil deneyinin grafiksel gösterimi. Kontrole kıyasla anlamlı fark ortaya koyulmuştur (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

Larval sürünme 5. nesil deney sonuçlarına bakıldığında kontrol grubu ortalama 4,5 cm sürünme uzunluğuna sahipken tek başına kafein uygulamaları ortalama 3,1 cm değer almıştır. 2 kat şeker uygulamaları

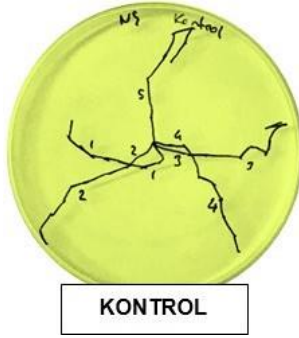
- Larval sürünme 5. nesil dozları kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya koymaktadır.
- Kontrol grubuna kıyasla 0,1K dozu anlamlı fark ortaya koymuştur.
- 0,5K - 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K dozlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel çok yüksek anlamlı fark görülmüştür.



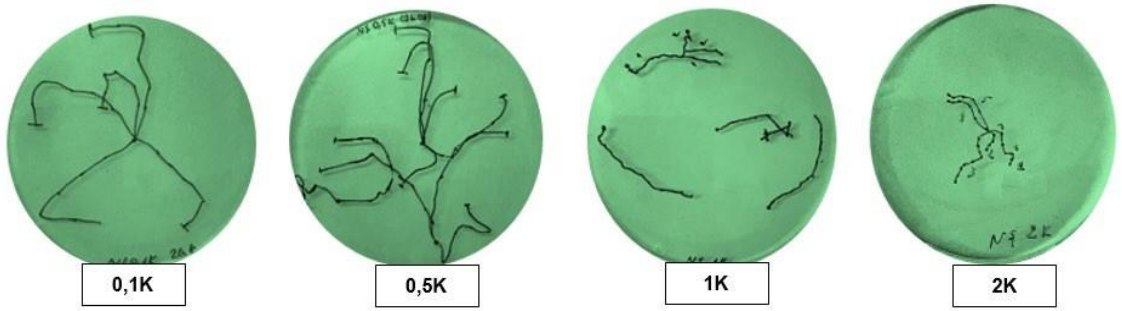
Şekil 4.16. Larval sürünme 5. nesil deneyinin grafiksel gösterimi. Kontrole kıyasla anlamlı fark ortaya koyulmuştur (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

Larval sürünmenin 1. neslinin konsantrasyonlar arasındaki farkına bakıldığında görsellik olarak da sonuçların hem uzunluk hem de manevra sayısı bakımından değişiklik gösterdiği de görülmüştür (Şekil 4.17 - 4.21.). Manevra sayısının artması anormal sürünmenin ortaya çıkışıyla bağlantılı olmakla beraber bu durumun nörolojik bozukluklarla, motor kontrol bozukluklarıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Jakubowski vd. 2012; Greaney 2025).

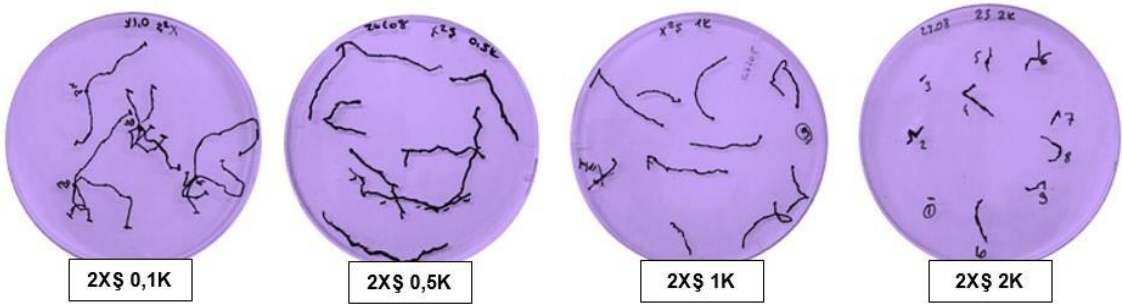
4.7.1. Larval sürünme görüntüleri



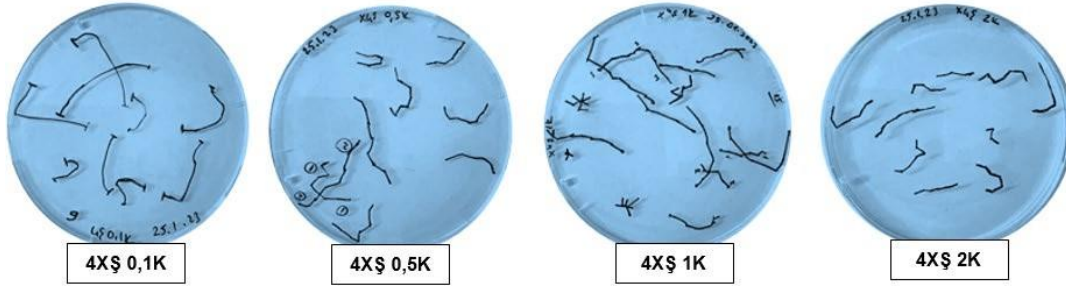
Şekil 4.17. Kontrol grubunun 1. nesil larval sürünme görüntüsü



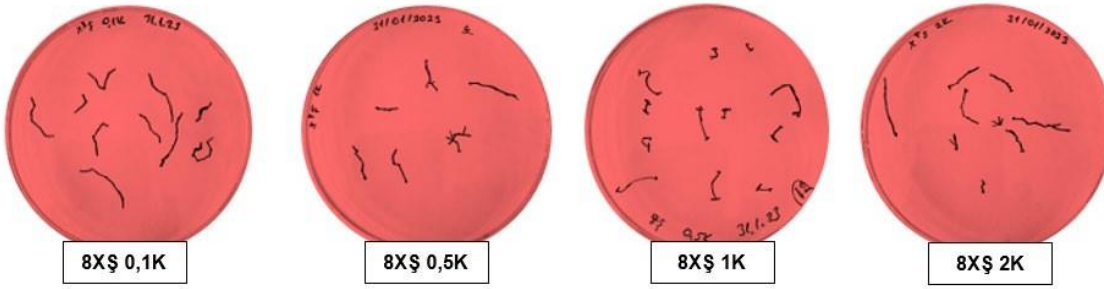
Şekil 4.18. Sadece kafein uygulanan grupların 1. nesil larval sürünme görüntüleri. Kafein miktarı arttıkça larvaların kat ettiği yolun giderek azaldığı görülmektedir



Şekil 4.19. 2 kat şeker ve kafein uygulanan grupların 1. nesil larval sürünme görüntüleri



Şekil 4.20. 4 kat şeker ve kafein uygulanan grupların 1. nesil larval sürünme görüntüleri



Şekil 4.21. 8 kat şeker ve kafein uygulanan 1. nesil larval sürünme görüntüleri

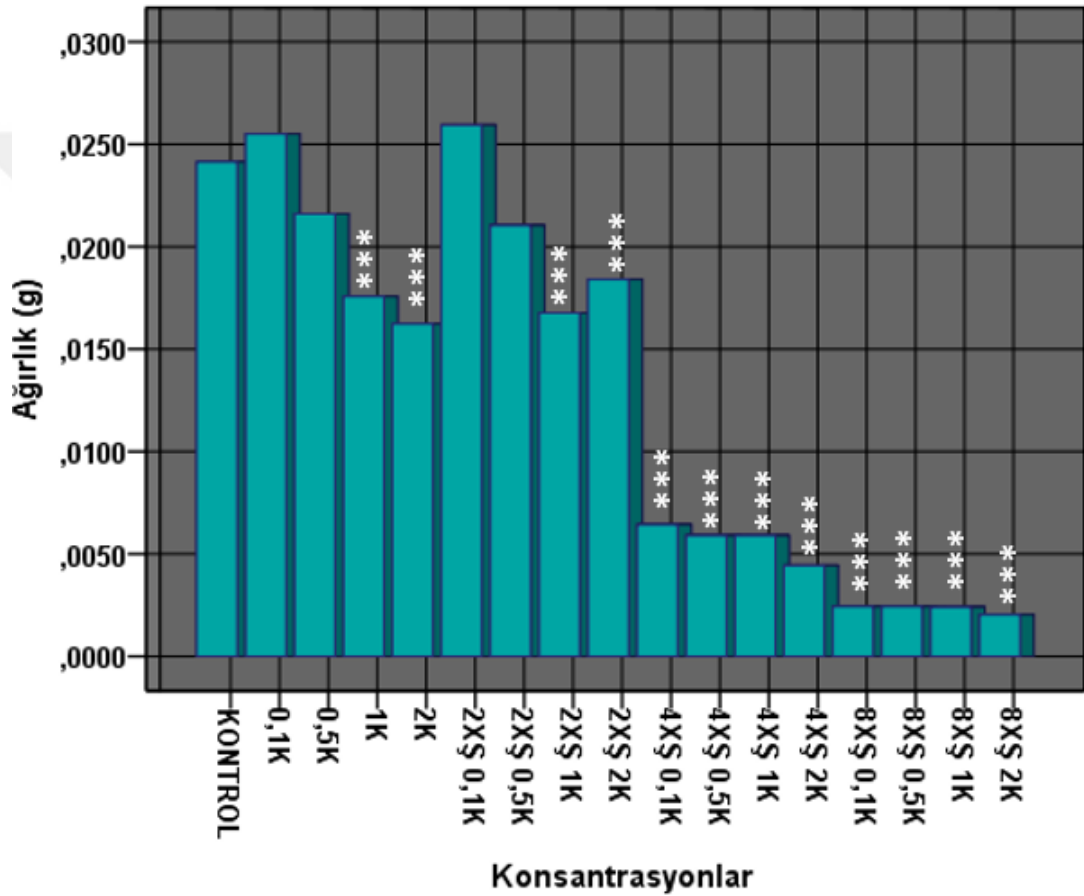
4.8. *D. melanogaster* larval ağırlık

D. melanogaster larvalarının ağırlığı, gelişimsel evreye ve çevresel koşullara bağlı olarak değişir. Üçüncü instar evresinde larvalar genellikle 1-2 mg ağırlığa ulaşabilir. Lipit içerikleri ağırlıklarının yaklaşık %15'ini oluşturur (Church ve Robertson 1966). Ağırlık, büyüme oranları ve beslenme durumu gibi faktörlerle yakından ilişkilidir (Bakker 1959). Kritik metamorfoz eşiği de belirli bir larval ağırlığa ulaşıncaya kadar tetiklenir (Mirth vd.2005). Larvaların 24 saatlik maruziyeti sonucunda 1. 3. ve 5. nesil deneylerinin verileri elde edilmiştir. Larval ağırlığın 3. ve 5. nesil verilerinde 4 kat şekerin ve 8 kat şekerin kafeinli konsantrasyonlarında bireyler elde edilemediği için bu konsantrasyonlar için sonuçlar elde edilememiştir.

Larval ağırlık 1. nesil sonuçlarında larvalar sadece kafein uygulanan konsantrasyonlarda kontrole kıyasla düşük kafein dozunda ağırlığın arttığı yüksek kafein dozunda ağırlığın düştüğü gözlemlendi. Kafeinin 2 kat şeker ile birlikte uygulandığı konsantrasyonda 2XŞ 0,1K için kontrole kıyasla ağırlık artış gösterirken diğer konsantrasyonlarında ağırlığın azaldığı gözlemlendi. 4 kat şekerin kafein birlikteliğinde larval ağırlık fazla düşüş gösterirken 8 kat şekerin kafeinli konsantrasyonlarında ağırlığın kontrole kıyasla çok daha fazla düştüğü gözlemlendi.

- Larval ağırlık dozları kontrole kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir.
- Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 1K - 2K - 2XŞ 1K - 2XŞ 2K - 4XŞ 0,1K - 4XŞ 0,5K - 4XŞ 1K - 4XŞ 2K - 8XŞ 0,1K - 8XŞ 0,5K - 8XŞ 1K - 8XŞ 2K dozlarında istatistiksel olarak çok yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir.

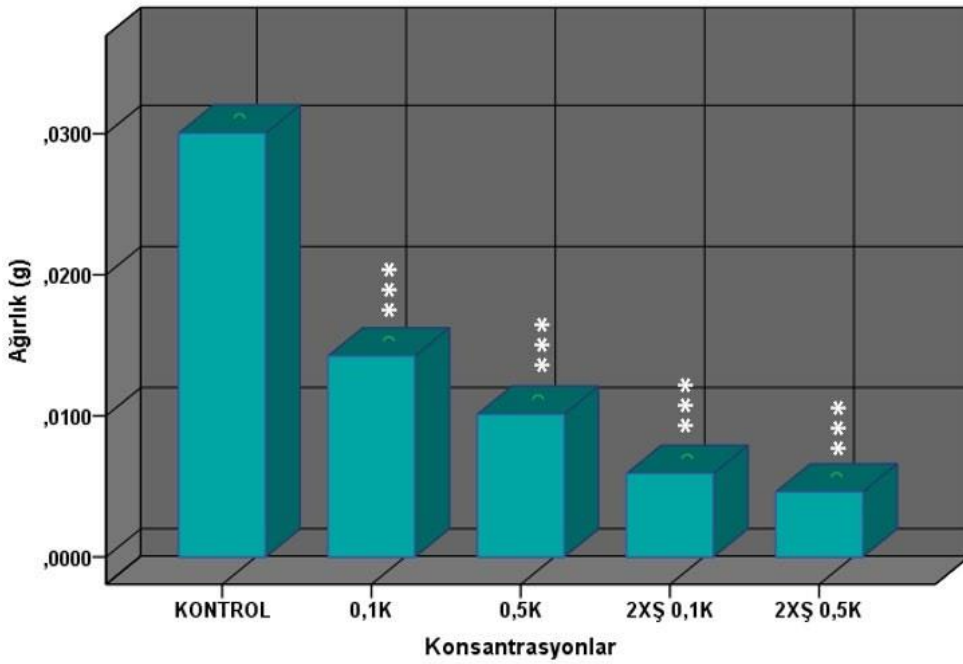
Sadece kafein uygulamasının yapıldığı deney grubunda kontrole kıyasla ağırlık düşmüştür. 2 kat şekerin kafeinli konsantrasyonlarında kafein miktarı arttıkça larval ağırlığın istatistiksel anlamda düştüğü gözlemlenmiştir. Sadece kafein ve 2 kat şeker + kafein uygulamalarında, kafeinin 1K ve 2 K uygulamalarında kontrol grubuna kıyasla çok yüksek anlamlı azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 4.22. Larval ağırlık 1. nesil sonuçları (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

Larval ağırlık 3. nesil deney sonucunda tek başına kafein uygulaması ve 2 kat şeker + kafein uygulaması sonucunda kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir.

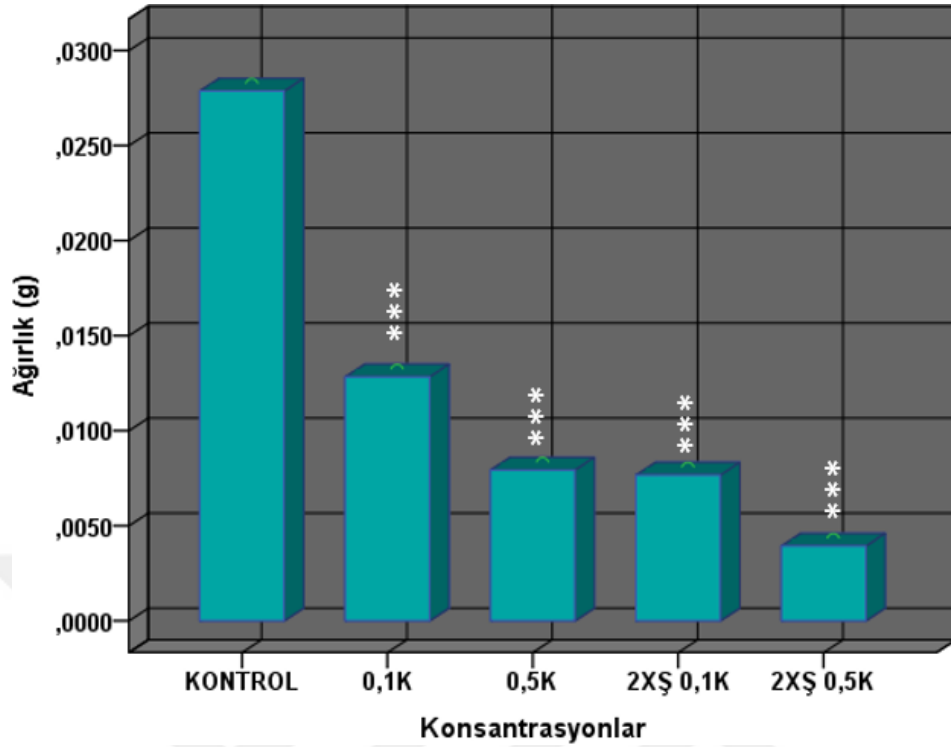
- *D. melanogaster* larval ağırlık için dozların kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı fark ortaya koyduğu gözlemlenmiştir.
- Kontrol grubuna göre 0,1K - 0,5K - 2XŞ 0,1K - 2XŞ 0,5K dozlarında istatistiksel olarak çok yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir (*** P < 0,001).



Şekil 4.23. Larval ağırlık 3. nesil sonuçlarının grafiksel gösterimi (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)

Larval ağırlık 5. nesil deney sonuçlarında kontrol grubuna kıyasla ağırlık miktarında azalma gözlemlenmiştir. Ağırlık azalması 3. nesil ile kıyaslandığında çok fazla fark gözlemlenmemiştir fakat 1. nesil ile kıyaslandığında ağırlık azalması daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

- Larval ağırlık 5. nesil deney sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir.
- 0,1K - 0,5K - 2XŞ 0,1K - 2XŞ 0,5K dozlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel çok yüksek anlamlı fark görülmüştür.



Şekil 4.24. Larval ağırlık 5. nesil deney sonuçları (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

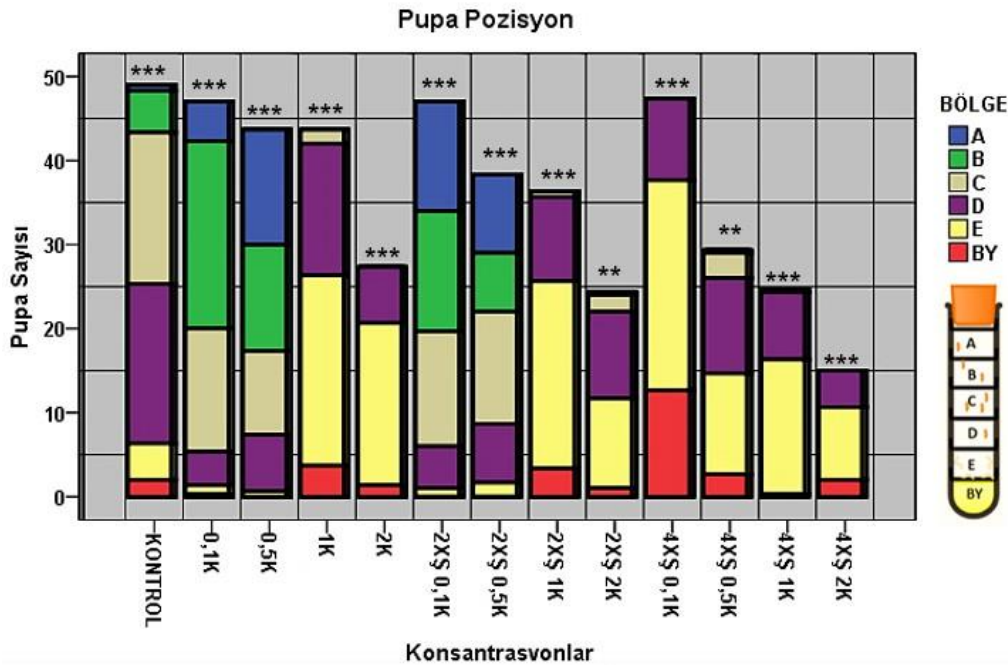
D. melanogaster larvaları sürekli olarak yeme, büyüme ve depolama yaptığından beslenme çalışmalarında güvenilirlikle kullanılmaktadır. Bunun yanında yetişkinlerde cinsiyete bağlı olarak bulunan fizyolojik farklılıklardan da yoksunlardır (Musselman vd 2011). *D. melanogaster* farklı yaşam döngüleri boyunca farklı metabolik ihtiyaçlar duyar. Örneğin larva aşamasında vücut kütlesi 200 kat artar (Mattila ve Hietakangas 2017). Bu nedenle besinsel farklılıkların belirlenmesinde *D. melanogaster* larvaları model organizma olarak kullanılmaktadır (Baker ve Thummel 2007). Larval ağırlık sonuçlarına bakıldığında bireylere kafein uygulaması gerçekleştirildiğinde düşük dozda kafein uygulaması bile ağırlığın yüksek oranda düşmesine sebep olurken 2 kat şekerli uygulama grubu bu ağırlığın daha da düşmesine neden olmaktadır. Bu süreçte larvaların ağırlıklarının düşmesi bireylerin yeterli miktarda beslenemediğini ve gelişimsel açıdan gerilemeye gittiğinin de işareti olmuştur.

4.9. *D. melanogaster* pupa pozisyon deneyi

Pupa pozisyon larvaların pupa oluşturma başarısını ortaya koyan, nörotoksisiteyi ve gelişimsel nörotoksisiteyi değerlendiren bir parametredir. Normal şartlarda 25°C’de genellikle 11 gün kadar sürer (Ashburner ve Roote 2007; Chen vd. 2013). Fakat uygulama konsantrasyonları sonucunda bu süre normal besinle beslenen bireylere oranla 2-3 gün kadar gecikme göstermiştir. Larvaların pupa oluşturmak için belli bir yol kat ederek besinden uzaklaşıp bulunduğu tüpün üst kısımlarına pupa oluşturmaktadır. Pupa oluşturmak için kat edilen mesafe bireyin genetik özellikleri, nem seviyesi ve çevresel etmenler gibi dış faktörler etkili olmaktadır (Beltrami vd 2010; Narasima vd 2015).

Normal şartlarda beslenmesi optimum konsantrasyonda ve miktarda olan larvalar beslenmelerini sağlıklı bir şekilde gerçekleştirebilir ve gelişimi beklenen sürede tamamlanır. Optimum şartlarda beslenme ile her bölge arası 1,3 cm olacak şekilde 6 bölgeye ayrılan 50 ml'lik falcon tüplerinde larvalar özellikle üst bölgelerde (A, B ve C) pupa oluşturmaktadır. Fakat beslenme kaynaklı larvaların ağırlıklı olarak pupa oluşturduğu bölgeler ve pupa oluşturma başarısı değişmiştir. Pupa pozisyon deneyi 3. ve 5 nesil için 1K - 2K - 2XŞ 1K - 2XŞ 2K - 4XŞ + kafein ve 8XŞ + kafein dozlarında bireyler elde edilemediği için bu dozlar deneye tabi tutulamamıştır. Pupa pozisyon 1. nesil deney sonuçlarında kontrol grubunda B-C-D-E-BY bölgelerinde pupa olduğu gözlemlenmiştir. Tek başına kafein uygulamalarında kafein miktarı arttıkça D ve E bölgelerinde daha çok pupa gözlemlenmiştir. 2 kat şekerin 0,1K ve 0,5K dozlarında A bölgesinde de pupa miktarı görülmüştür. 2 kat şeker 1K dozundan itibaren 4 kat şeker 2K dozuna kadar ağırlıklı olarak D ve E bölgesinde pupa gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bu dozlarda besin yüzeyinde oluşan pupalarda gözlemlenmiştir.

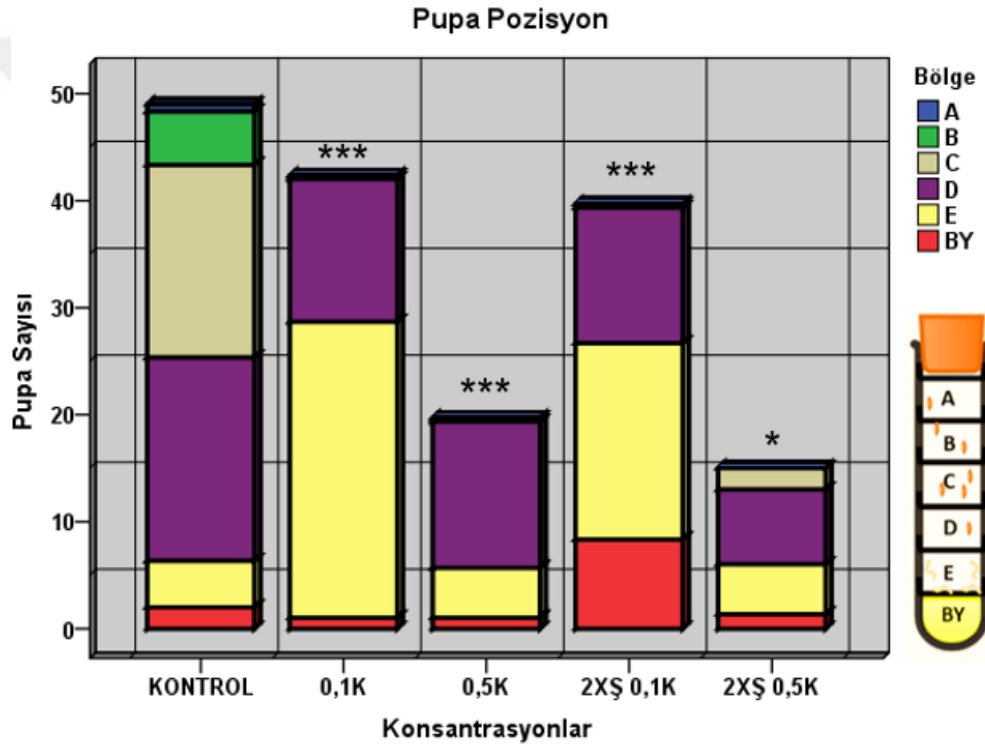
- Çalışma kapsamında dozlar ve bölgeler için pupa oluşturma başarısı istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir.
- Veriler ki-kare testinde standardized residuals sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre 1. nesil pupa pozisyon deneyinde A- B- C- D- E- BY bölgelerinin hepsinde çok yüksek anlamlı fark ortaya koymuştur ($***|Z| > 3,29$).
- Konsantrasyonlara bakıldığında 4XŞ 0,5K ve 2XŞ 2K yüksek anlamlı fark ortaya koymuştur ($**|Z| > 2,58$).
- Diğer dozlar (0,1K - 0,5K - 1K- 2K - 2XŞ 0,1K - 2XŞ 0,5K - 2XŞ 1K - 4XŞ 0,1K - 4XŞ 0,5K - 4XŞ 1K - 4XŞ 2K - 8XŞ 0,1K - 8XŞ 0,5K - 8XŞ 1K - 8XŞ 2K) çok yüksek anlamlı fark ortaya koymuştur ($***|Z| > 3,29$).



Şekil 4.25. Pupa pozisyon 1. nesil pupa oluşumunun grafik gösterimi ($***|Z| > 3,29$ - $**|Z| > 2,58$ - $*|Z| > 1,96$).

Pupa pozisyonun 3. nesil uygulamasında yoğun olarak larvalar E, D ve BY bölgesine pupa oluşturduğu gözlemlenmiştir. Nesil ilerledikçe ve konsantrasyonlar arttıkça A, B ve C bölgesinde pupa oluşumu görülmemeye başlanmıştır. Bu veriler sonucunda yüksek şeker ve yüksek kafein uygulaması sonrasında larvaların besin yüzeyinden fazla uzaklaşmadığı ve üst bölgelere ulaşmadığı gözlemlenmiştir.

- Çalışma sonucunda konsantrasyonların bölgeler üzerinde Two Way Anova sonucuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya çıkmıştır.
- Pupa pozisyon 3. nesil veri sonuçlarına göre B- C-D- E- BY bölgelerinde çok yüksek anlamlı fark görülürken ($***|Z| > 3,29$) A bölgesinde anlamlı fark görülmemiştir ($|Z| < 1,96$).
- Çalışmada yer alan 0,1K- 0,5K- 2XŞ 0,1K dozlarında çok yüksek anlamlı fark gözlemlenirken 2XŞ 0,5K dozunda anlamlı fark gözlemlenmemiştir.

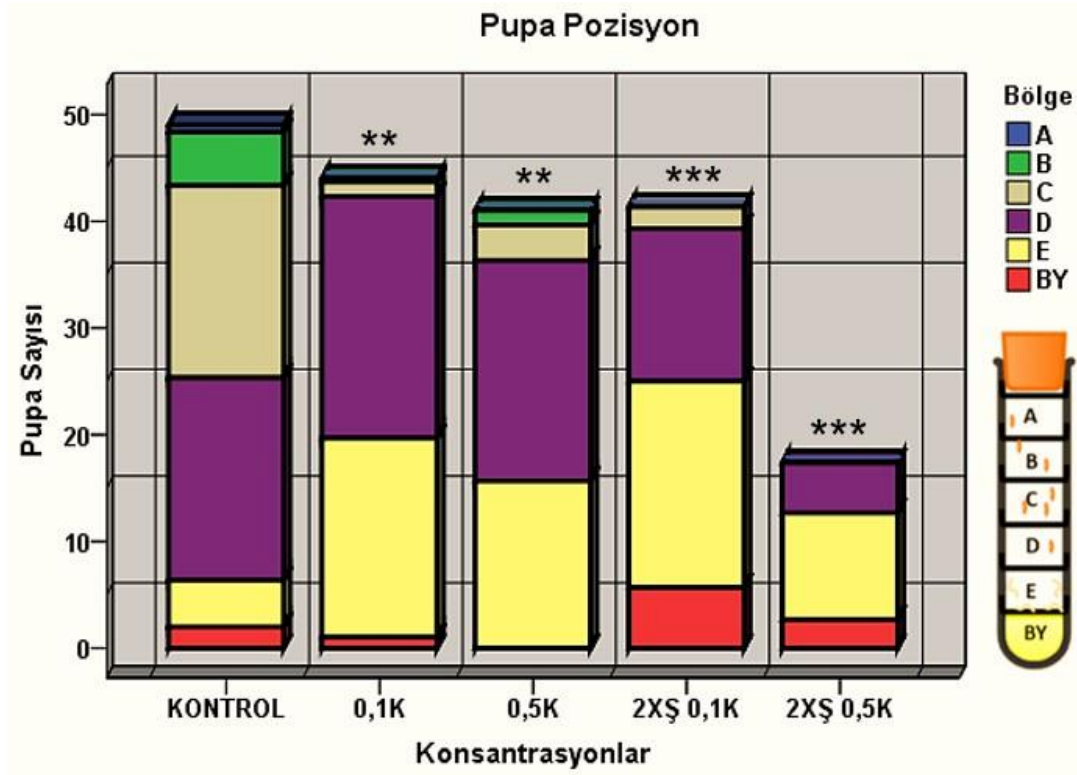


Şekil 4.26. Pupa pozisyon 3. nesil pupa oluşumunun grafik gösterimi ($***|Z| > 3,29$ - ($**|Z| > 2,58$ - ($*|Z| > 1,96$)).

Pupa pozisyon 5. nesil veriler sonucunda kafein uygulanan gruplarda pupa oluşan bölgelerin genellikle D ve E bölgesinde ağırlıklı olarak görülmüştür. A bölgesinde hiç pupa oluşumu görülmemiştir. 2 kat şeker + kafein uygulanan larvalarında yoğun olarak E ve D bölgesinde pupa oluşturduğu gözlemlenirken en yüksek konsantrasyonda A, B ve C bölgesinde pupa oluşumu görülmemiştir.

- Pupa pozisyon 5. nesil deney sonuçlarına göre konsantrasyonların bölgeler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir.

- Deney sonucuna göre bölgeler için pupa oluşturma sayısına bakıldığında D bölgesinde anlamlı fark görülmemiştir ($|Z| < 1,96$) A bölgesinde anlamlı fark gözlemlenmiştir ($*|Z| > 1,96$). B-C- E ve BY bölgelerinde çok yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir ($***|Z| > 3,29$).
- Çalışma dozlarından 0,1K ve 0,5K kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksek anlamlı fark ortaya koymuştur ($**|Z| > 2,58$). 2XŞ 01K ve 2XŞ 0,5K dozlarında ise çok yüksek anlamlı fark görülmüştür.
- Bu bulgular, hem uygulanan dozların hem de bölgesel konumların, pupaların yerleşim tercihleri üzerinde etkili olduğunu; bazı dozların bu tercihi istatistiksel olarak baskın biçimde değiştirdiğini göstermektedir.



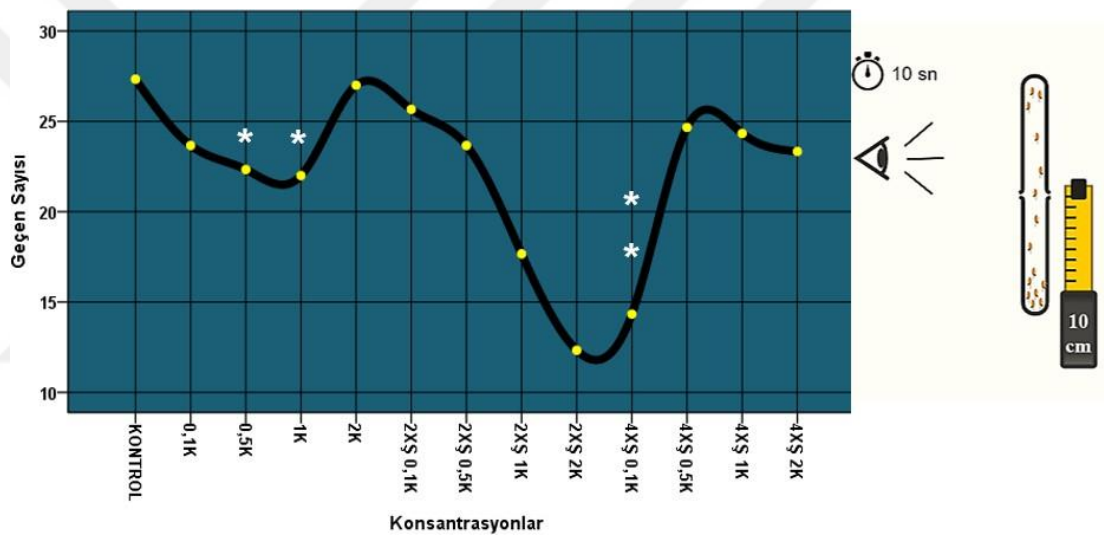
Şekil 4.27. Pupa pozisyon 5. nesil pupa oluşumunun grafik gösterimi

4.10. *D. melanogaster* negatif jeotaksis sonuçları

Birçok canlı yönlerini bulmak için Dünyanın manyetik alanını algılar ve bunu kullanma yetenekleri gelişmiştir (Naisbett-Jones ve Lohmann 2022). Uçuş becerisi *Drosophila* bireylerinde yaş arttıkça azaldığı gözlemlenmiştir (Arking ve Wells 1990; Goddeeris vd. 2003). *dAdoR* mutant *D. melanogaster* bireylerinde kafein alımının yine uyanıklık durumunu ortaya çıkartması dopamin senteziyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Nall vd. 2016). Kafein alımı ile dopaminin neden olduğu uyanıklık durumu sonucunda *D. melanogaster* bireylerinin uçuş becerisi olumsuz etkilenebilmektedir (Philyaw 2022). Negatif jeotaksis deneyi yüksek şeker ve yüksek kafeinin *D. melanogaster* bireylerindeki etkisinin davranış ve lokomotor aktivitesi üzerindeki potansiyel etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan bir parametredir (Grotewiel vd 2005).

Negatif jeotaksis 1. nesil deney sonuçlarında toplam 30 bireyden 25'in üstünde bireyin kontrol grubunda üst tüpe geçtiği gözlemlenmiştir. Kafein miktarı arttıkça geçen birey sayısında azalma görülürken en yüksek kafeinli konsantrasyonda kontrole yakın sonuç elde edilmiştir. 2 kat şekerin kafeinli konsantrasyonlarında kafein miktarı arttıkça geçen birey sayısı giderek azaldığı tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonlarda minimum geçen sayısı 10 - 15 değerleri arasına kadar düşmüştür. 4 kat şeker kafeinli gruplarında ise kafein miktarı arttıkça geçen birey sayısında azalış görülmüştür.

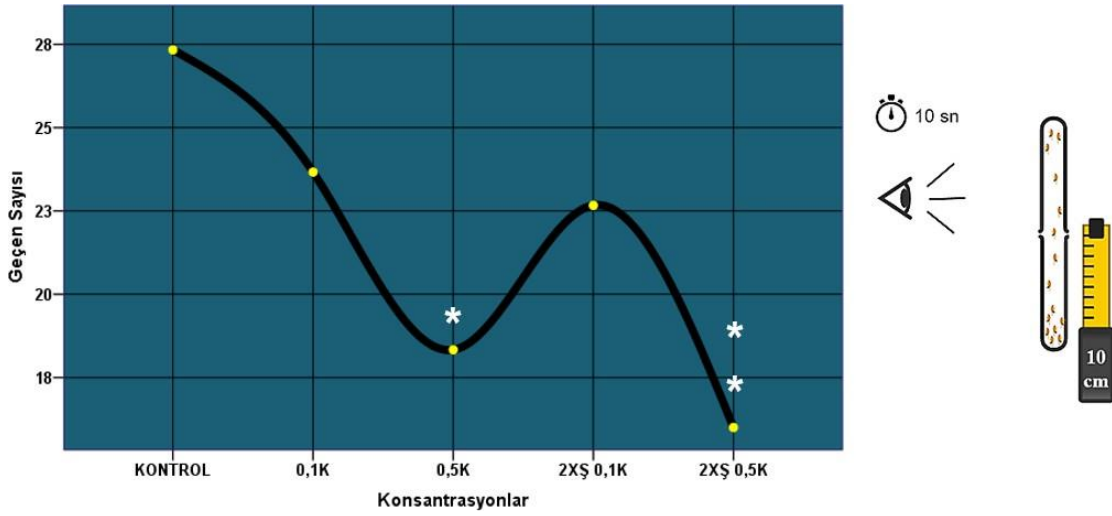
- Negatif jeotaksis 1. nesil deney sonucunda One-Way Anova sonucunda istatistiksel olarak sonuçlar anlamlı fark ortaya çıkmıştır.
- Tukey dunnet sonucunda kontrole kıyasla 0,1K - 2K - 2 kat şeker + kafein - 4XŞ 0,5K - 4XŞ 1K - 4XŞ 2K dozlarında anlamlı fark gözlemlenmemiştir. 0,5K ve 1K dozlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı fark görülürken 4XŞ 0,1K dozunda kontrole kıyasla yüksek anlamlı fark görülmüştür.



Şekil 4.28. Negatif jeotaksis 1. nesil deney sonuçlarının grafiksel gösterimi (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

Uygulama konsantrasyonlarına maruz bırakılan ergin *D. melanogaster* bireyleri 3. nesil negatif jeotaksis deney verilerine bakıldığında Kontrol grubunda 30 bireyden 28 bireyin tüpün üst kısmına geçtiği gözlemlenirken kafein arttıkça geçen birey sayısının düştüğü gözlemlendi. 2 kat şekerin yüksek kafein konsantrasyonunda 30 bireyden 18 bireyin altında geçtiği gözlemlenerek minimum geçen birey sayısı elde edilmiştir.

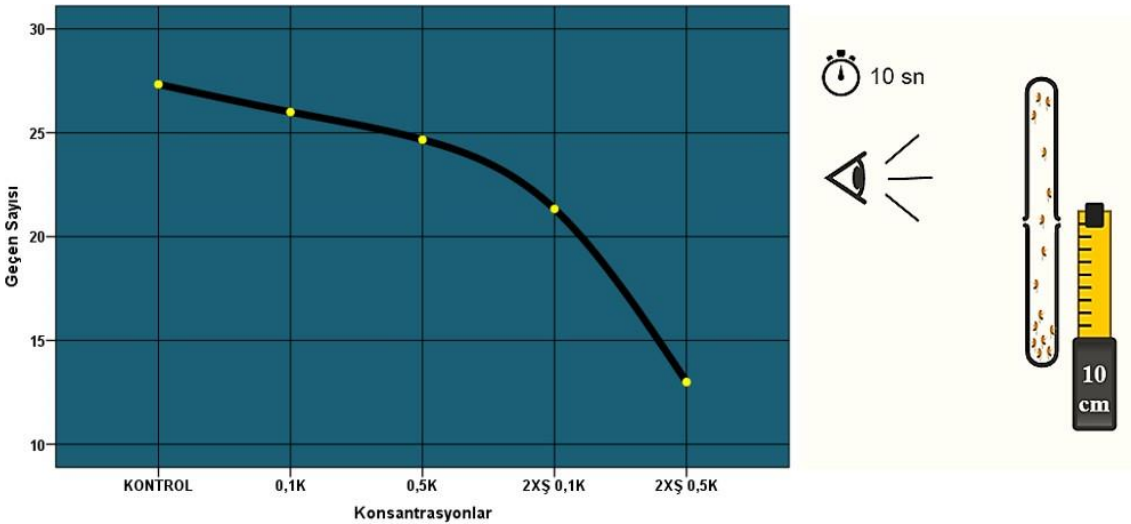
- Negatif Jeotaksis 3. nesil deney sonuçlarında konsantrasyonlar ve geçen birey sayısı bakımından yükek anlamlı fark ortaya koymuştur.
- Post-hoc dunnet veri sonuçlarına göre 0,5K kontrol grubuna kıyasla anlamlı fark ortaya koymuştur. 2XŞ 0,5K ise yine kontrole kıyasla yüksek anlamlı fark ortaya koymuştur. 0,1K ve 2XŞ 0,1K dozları kontrole kıyasla anlamlı fark görülmemiştir.



Şekil 4.29. Negatif jeotaksis 3. nesil deney sonuçlarının grafiksel gösterimi (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)

Çalışma konsantrasyonlarının bireylere maruziyeti sonucu negatif jeotaksis 5. nesil bireylerinin uçuş becerisinin kontrole kıyasla artan konsantrasyona paralel olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Deneyde 30 bireyden 15'in altında birey geçişinin olduğu 2 kat şeker 0,5K minimum değeri göstermiştir.

- One Way Anova sonucunda göre negatif jeotaksis 5. nesil deney sonucunda anlamlı fark yoktur.
- Ek olarak post-hoc dunnet testi de yapılmıştır fakat dozlar arasında anlamlı fark görülmemiştir.



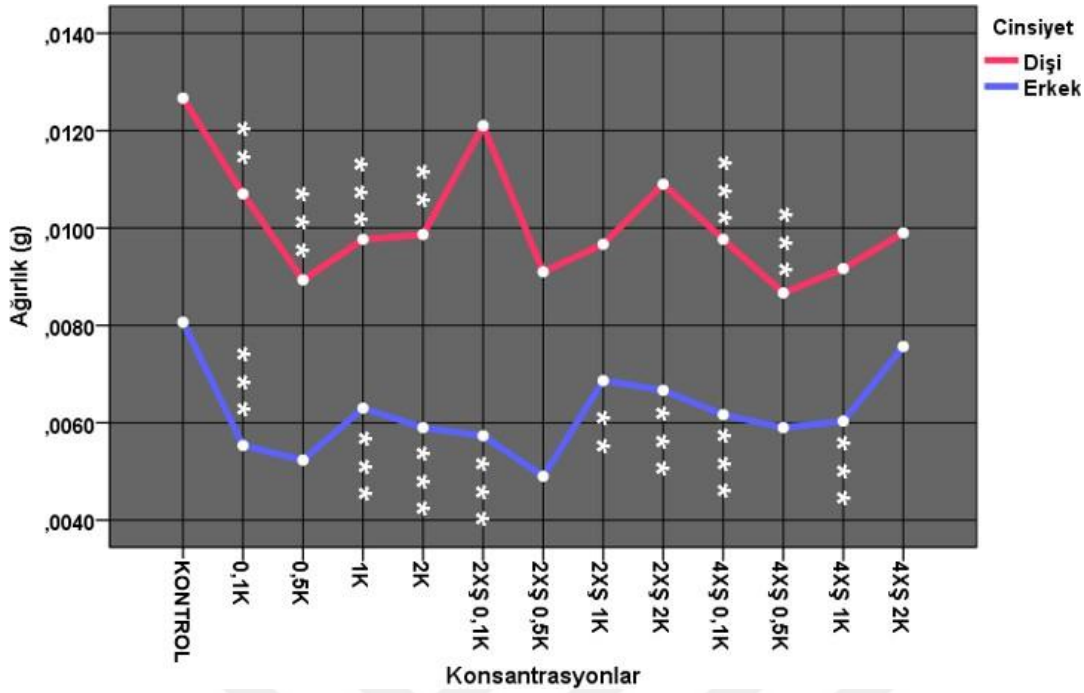
Şekil 4.30. Negatif jeotaksis 5. nesil deney sonuçlarının grafiksel gösterimi (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)

4.11. Ergin ağırlık sonuçları

D. melanogaster bireylerinde ergin ağırlıkta dişi ve erkek ayrımı gözlemlenir. Normal beslenme şartlarında dişi bireyler yumurtlama döneminden geçtikleri için vücut ağırlığı bakımından erkek bireylere oranla daha büyüktürler (Shingleton ve Masandika 2017; De Groef vd. 2021). Bu yüzden vücut büyüklükleri cinsiyet sınıflandırmayı dolaylı yoldan etkiler ve bireylerin genotipi ve fenotipi ile ilişkilidir (Handa vd 2014). Ergin ağırlık dişi ve erkek bireylerde konsantrasyonlara ve ilerleyen nesillere bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Ergin ağırlık 1. nesilde dişiler de erkekler de kafein konsantrasyonlarında ağırlıkları düşüş göstermiştir. Uygulama gruplarından 2 kat şekerin kafeinli konsantrasyonları arttıkça sadece kafein uygulamasına oranla ağırlık artışı gözlemlenmiştir. 4 kat şekerin kafein konsantrasyonları arttıkça erkek bireyler de dişi bireylerde kafein ve şeker uygulamalarına oranla ağırlıkta artış göstermiştir. Erkek bireyler artan kafein konsantrasyonu ile birlikte neredeyse kontrol grubuna yakın sonuçlar vermiştir.

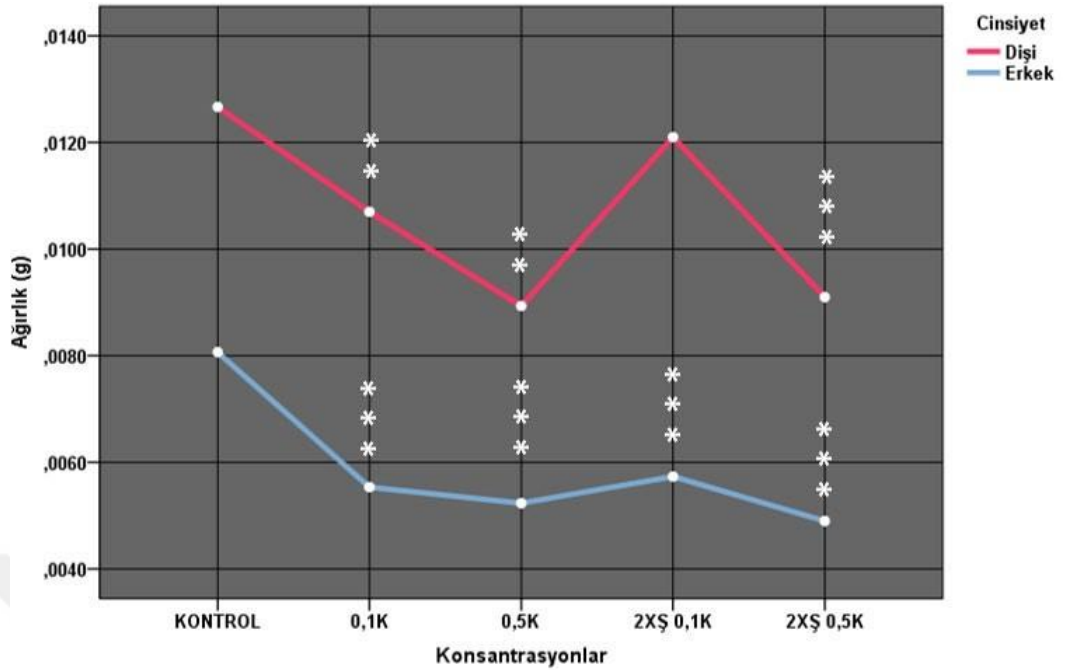
- Ergin ağırlık 1. nesil deney sonucu Two-Way Anova ile değerlendirilmiştir. Doz grupları arasında ağırlık değişiminde anlamlı fark görülmüştür. Dişi ve erkek bireyler arasında aşırı yüksek anlamlı fark görülmüştür. Ek olarak konsantrasyonların ve cinsiyete göre etkisi değişmektedir ve anlamlı bir fark ortaya koymuştur.
- Bağımsız örneklem t-testi ile değerlendirilerek erkek ve dişi ağırlığın dozlar ile birlikte anlamlılık durumu değerlendirilmiştir.
- Dişi bireylerde kontrol grubuna kıyasla 2XŞ 0,1K- 2XŞ 0,5K- 2XŞ 1K- 2XŞ 2K- 4XŞ 1K- 4XŞ 2K dozlarında anlamlı fark gözlemlenmemiştir. 0,1K ve 2K dozlarında yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir. Diğer dozlarda ise (0,5K- 1K- 4XŞ 0,1K- 4XŞ 0,5K) çok yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir.
- Erkek bireylerde kontrol grubuna kıyasla ise 0,5K- 2XŞ 0,5K ve 4XŞ 2K dozlarında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmemiştir. 2XŞ 1K dozunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek anlamlı fark görülmüştür. 0,1K- 1K- 2K- 2XŞ 0,1K- 2XŞ 2K- 4XŞ 0,1K- 4XŞ 0,5K- 4XŞ 1K dozlarında çok yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir.



Şekil 4.31. Ergin ağırlık 1. nesil deney sonucunun grafiksel gösterimi (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

Ergin ağırlık 3. nesil verilerinde erkek ve dişi bireyler sadece kafein uygulaması sonucunda kontrole kıyasla ağırlıkları azalmıştır. 2 kat şeker 0,1K konsantrasyonunda her iki cinsiyette de sadece kafeinli konsantrasyonlara oranla ağırlık artışı gözlemlendi. Dişi bireylerin ağırlık artışı erkek bireylerden daha fazla olmuştur. En yüksek doz da ise ağırlık her iki cinsiyette de 2 kat şeker 0,1K konsantrasyonuna kıyasla azalmıştır. Dişi ve erkek birey arasındaki ağırlık farkı 3. nesilde korunmuştur.

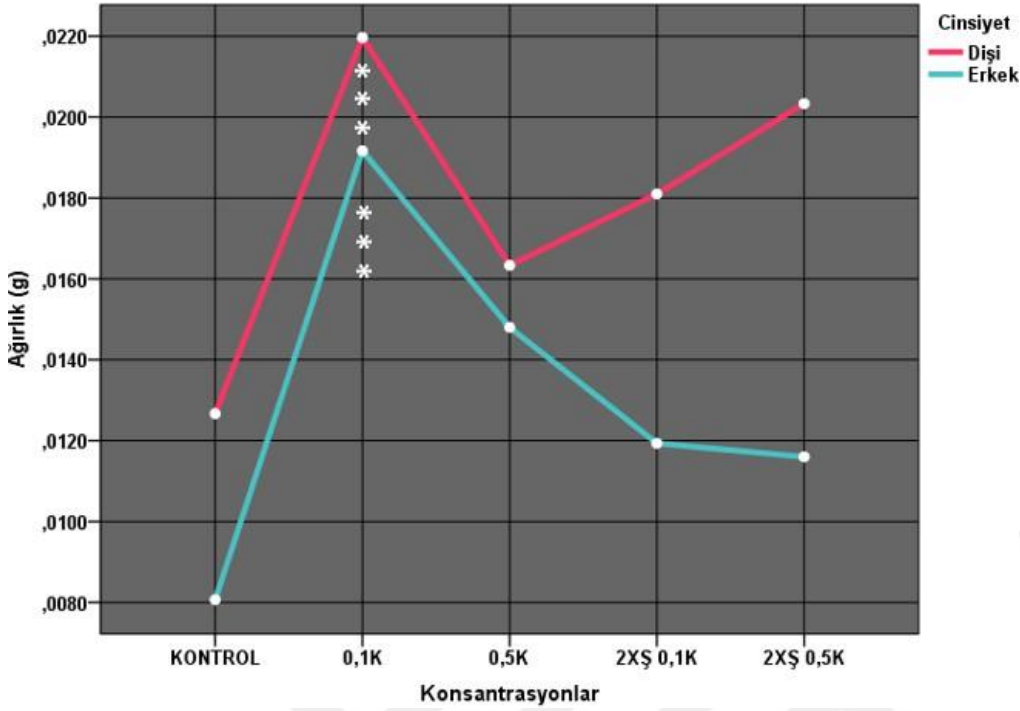
- Ergin ağırlık 3. nesil deney sonucu Two-Way Anova ile değerlendirilmiştir. Doz grupları arasında anlamlı fark görülmüştür.
- Bağımsız örneklem t-testi sonucunda dişi ve erkek bireylerin ağırlıkları arasında istatistiksel olarak çok yüksek derecede anlamlı fark görülmüştür.
- Dişi bireylerin ortalama ağırlığı erkeklerden anlamlı düzeyde fazladır.
- Dişi bireylerde kontrol grubuna kıyasla 2XŞ 0,1K dozunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı fark görülmemiştir. 0,1K ve 0,5K dozlarında kontrole kıyasla yüksek dozda anlamlı fark görülmüştür. 2XŞ 0,5K dozunda çok yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir.
- Erkek bireyler için bütün dozlar kontrol grubuyla kıyaslandığında çok yüksek anlamlı fark görülmüştür.



Şekil 4.32. Ergin ağırlık 3. nesil deney sonucunun grafiksel gösterimi (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)

Ergin ağırlık 5. nesil verileri sonucunda her iki cinsiyet için de kontrole kıyasla yaklaşık olarak 2 kat kadar artış görülmüştür. Maksimum artış 0,1K konsantrasyonunda görülürken dişi ve erkek arasındaki ağırlık farkının en aza indiği konsantrasyonda bu grupta olmuştur. Ergin ağırlığının 1. ve 3. nesilde genel olarak uygulanan konsantrasyon gruplarında azalma gösterirken 5. nesil veri sonuçlarında ağırlığın yüksek oranda arttığı görülmüştür.

- Ergin ağırlık 5. nesil deney sonucu bağımsız örneklem t-testi sonucu ile değerlendirilmiştir. Dişi ve erkek bireylerin ortalama ağırlıkları istatistiksel olarak farklı değildir ($p > 0,05$).
- Doz gruplarından 0,1K için kontrole kıyasla anlamlı fark görülmüştür. Diğer dozlar için istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmemiştir.
- Dişi ve erkek bireylerde kontrole kıyasla 0,1K dozu çok yüksek anlamlı fark vardır.

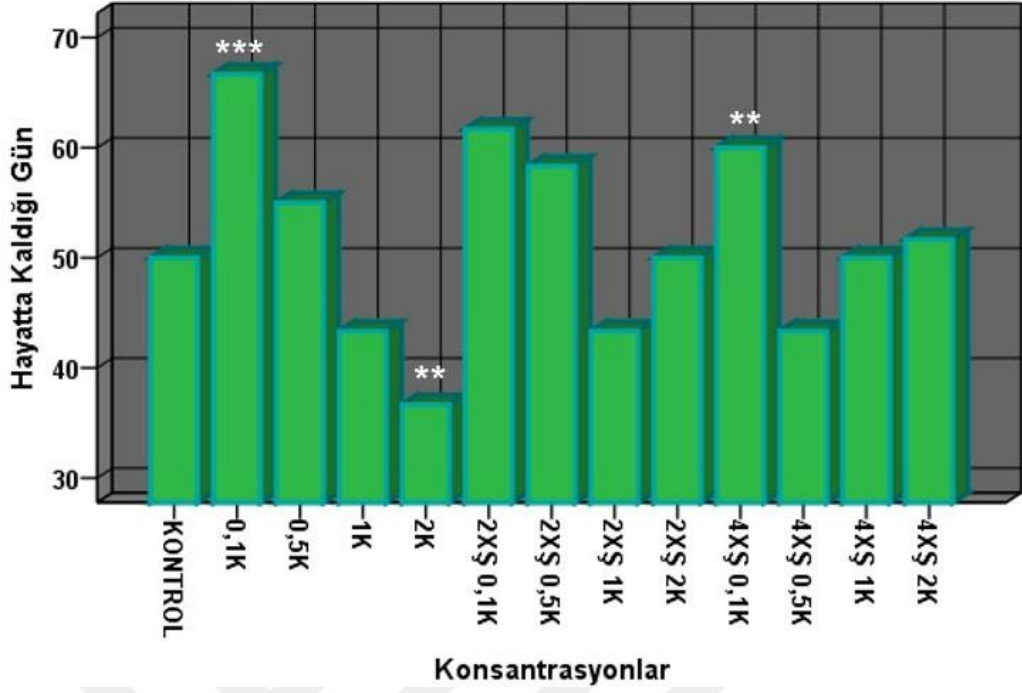


Şekil 4.33. Ergin ağırlık 5. nesil deney sonucunun grafiksel gösterimi (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

4.12. *D. melanogaster* ömür uzunluğu sonuçları

D. melanogaster bireyleri ortalama olarak yaklaşık 50 - 60 güne kadar maksimum 90 güne kadar yaşayabilmektedirler (Linford vd. 2013; Landis vd. 2020). Ömür uzunluğu genetik geçmişe, sağlık koşullarına, beslenme tarzına ve dış faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. (Yashin vd. 2016; Timmers 2020; Castruita vd. 2022). Ömür uzunluğu 1. nesil verilerinde kontrol grubu 50 güne kadar yaşarken 0,1K konsantrasyonunda maksimum değer olan 70 güne kadar yaşam süresi gözlemlenmiştir. 0,1 ve 0,5 mg/ml kafein konsantrasyonunda kontrole kıyasla ömür uzunluğu artmıştır. Kafein konsantrasyonu arttıkça ömür uzunluğu giderek azalmıştır. 2 kat şeker 0,1 ve 0,5 kafeinli konsantrasyonları kontrole kıyasla ömür uzunluğu artmıştır. 4 kat şeker 0,1k de kontrole kıyasla yaşam süresi daha fazla olmuştur. Yüksek şekerlerin kafein konsantrasyonu arttıkça ömür uzunluğunda azalma görülmüştür. En yüksek dozdaki 2 mg/ml kafein uygulama grubunda 40 gün ile minimum yaşam süresi gözlemlenmiştir.

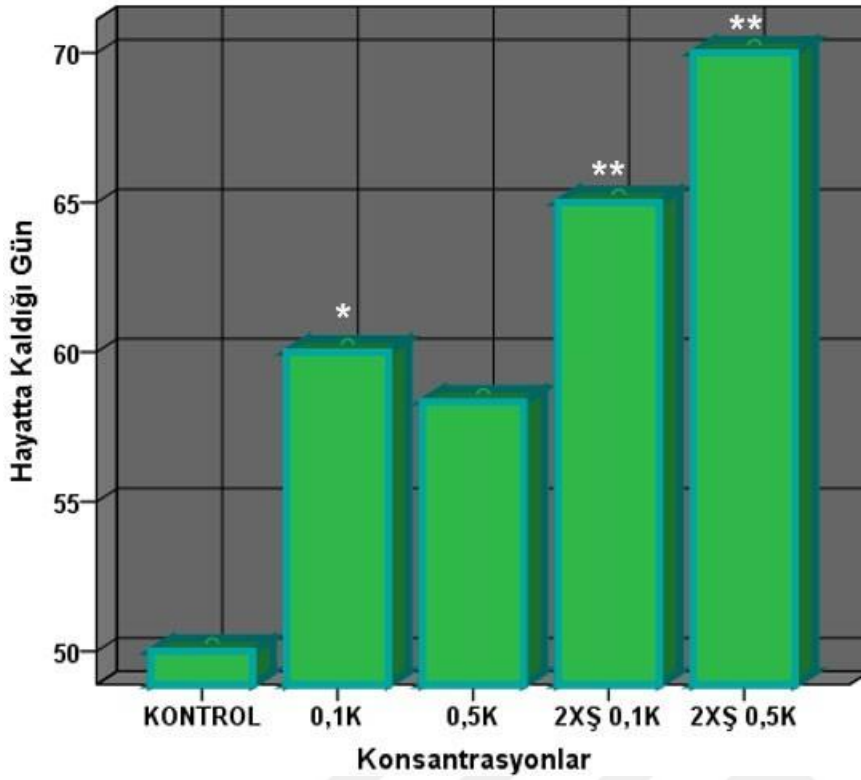
- Ömür uzunluğu 1. nesil deney sonuçları Bağımsız örneklem t-testi ile değerlendirildi. Dozlara göre yaşam sürelerinde çok yüksek anlamlı fark gözlemlenmiştir.
- Post-hoc dunnet testine göre 0,5K- 1K- 2XŞ 0,1K- 2XŞ 0,5K- 2XŞ 1K- 2XŞ 2K- 4XŞ 0,5K- 4XŞ 1K- 4XŞ 2K Dozlarında istatistiksel olarak kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı fark oluşturmamıştır.
- 2K ve 4XŞ 0,1K dozlarında istatistiksel olarak kontrol grubuna kıyaslandığında yüksek anlamlı fark görülmüştür.
- 0,1K dozunda ise kontrol grubuna kıyasla çok yüksek anlamlı fark görülmüştür.



Şekil 4.34. Ömür uzunluğu 1. nesil deney sonucunun gösterimi (* $0.01 < P < 0.05$, ** $0.001 < P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Ömür uzunluğunun 3. nesil sonuçlarında sadece kafein uygulaması ve 2 kat şekerin kafeinli uygulamalarında bireylerin yaşam sürelerinin genel olarak giderek arttığı gözlemlenmiştir. Maksimum yaşam süresi 70 gün ile 2 kat şeker 0,5K konsantrasyonunda gözlemlenmiştir.

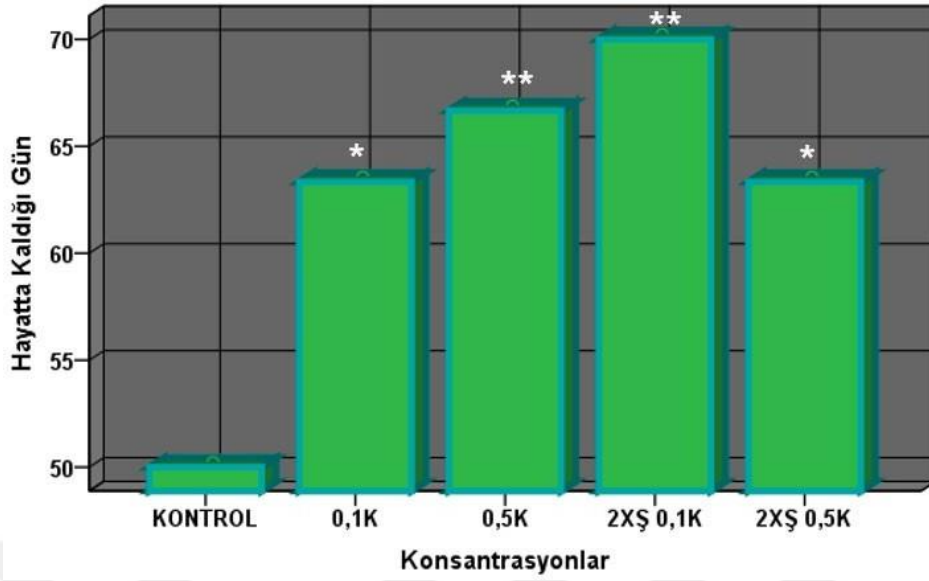
- Ömür uzunluğu 3. nesil deney verileri bağımsız örneklem t testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler dahilinde dozların ömür uzunluğu üzerine istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı fark ortaya koyduğu bulunmuştur. Bu fark ömür süresinin uygulanan doza bağlı olarak anlamlı şekilde değiştiğini gösterir.
- 0,1K dozu kontrol grubuna göre anlamlı fark oluşturmuştur ($p < 0,05$).
- 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K dozları ise yüksek derecede anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p < 0,01$).
- 0,5K dozu ise kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı fark göstermemiştir.



Şekil 4.35. Ömür uzunluğu 3. nesil deney sonucunun gösterimi (* $0,01 < P < 0,05$ - ** $0,001 < P < 0,01$ - *** $P < 0,001$)

Ömür uzunluğunun 5. nesil sonuçlarında 2 kat şeker 0,1K konsantrasyona kadar kontrole kıyasla yaşam süresinin arttığı gözlemlenmiştir. 3. nesilde 2 kat şeker 0,5K'de 70 gün ile maksimum yaşam süresi görünürken 5. nesilde 70 gün ile maksimum yaşam süresi 2 kat şeker 0,1K konsantrasyonda görülmüştür.

- 5. nesil deney verileri bağımsız örneklem t testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, dozların ömür uzunluğuna etkisi istatistiksel olarak çok yüksek anlamlı düzeyde (***) $P < 0,001$) bulunduğunu göstermektedir. Bu durum ömür süresinin uygulanan doza göre anlamlı biçimde değiştiğini ifade etmektedir.
- 0,1K- 0,5K- 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K dozları, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ömrü arttırmıştır. 0,1K ve 2XŞ 0,5K kontrole kıyasla anlamlı fark ortaya koymuştur. 0,5K ve 2XŞ 0,1K dozlarında yüksek anlamlı fark görülmüştür.



Şekil 4.36. Ömür uzunluğu 5. nesil deney sonucunun gösterimi (*0,01 < P < 0,05 - ** 0,001 < P < 0,01 - *** P < 0,001)

Yapılan çalışmalar sonucunda yüksek şeker ve yüksek kafein uygulaması gerçekleştirilen *D. melanogaster* bireyleri nesiller boyunca; larval ağırlık, larval sürünme, pupa pozisyon negatif jeotaksis, ergin ağırlık ve ömür uzunluğu olmak üzere 6 farklı parametrede değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Uygulanan konsantrasyonların etkileri farklı parametrelerde farklı şekilde ortaya çıkmıştır. Bazı parametrelerde maruz bırakılan konsantrasyonun etkisi uygulanan nesilde daha az görülürken ilerleyen nesillerde etkinin daha da arttığı görülürken bazı parametreleri değerlendirirken konsantrasyona bağlı olarak etkinin net bir şekilde gözler önüne serildiği görülmüştür.

4.13. *D. melanogaster* iki yönlü besin analizi

Besin analizinde 72 kuyucuk plate içerisine her bir dozun hem kırmızı hem mavi boya ile birlikte halini renklerin önemsiz olduğunu ortaya koymak amacıyla deneyde yer verildi. Dozlar zikzak şeklinde 72 kuyucuklu platelere koyuldu (Şekil 4.37). Kırmızı renkte uygulama kimyasalını yiyen bireylerin abdomeni kırmızı renk (Şekil 4.40), mavi renkte uygulama besinlerini yiyen bireylerin abdomeni mavi renk (Şekil 4.39) görünürken her ikisini de yiyen bireylerin abdomeni mor renkte görülmüştür (Şekil 4.41).

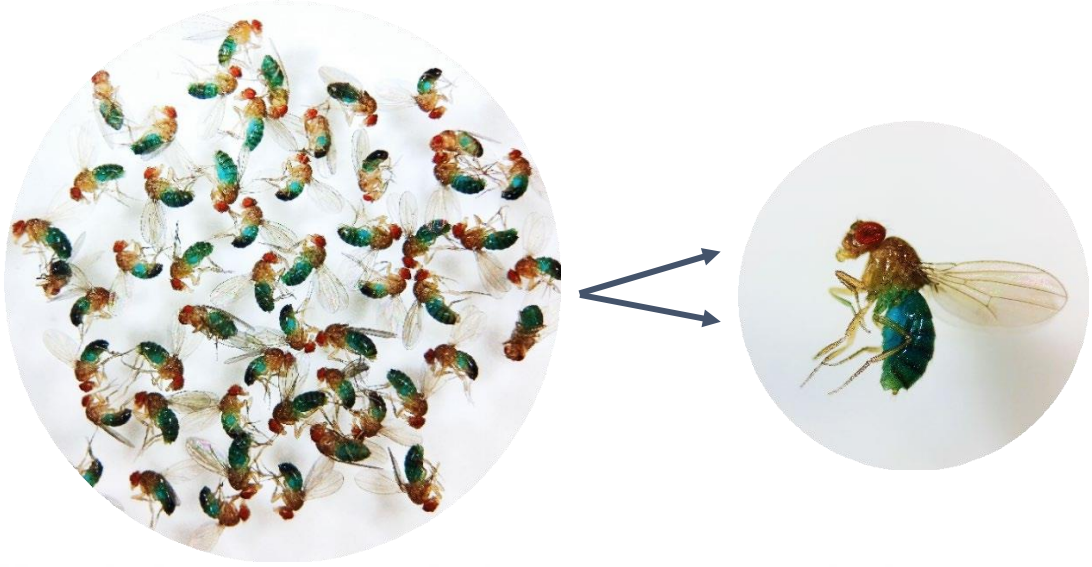


Şekil 4.37. Dozlar boyalar ile kuyucuklara zikzak şekilde hazırlandı



Şekil 4.38. Platelerin inkübatör içerisindeki görüntüsü

İnkübatör 25°C %60 nem oranına sahiptir. Deney karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Bu ortam yine renk yönelimini dışlamak adına yapılmıştır.



Şekil 4.39. Mavi besin ile beslenen bireyler ve mavi abdomen renginin gösterimi



Şekil 4.40. Kırmızı besin ile beslenen bireyler ve kırmızı abdomen renginin gösterimi



Şekil 4.41. Hem mavi hem kırmızı besinden yiyen mor renkli abdomene sahip bireyler

D. melanogaster üzerinde yapılan iki yönlü besin tercih analizlerinde, Gıda Seçim İndeksi (Preference Index, P.I.) değerleri, sineklerin belirli bir besin maddesine olan yönelimlerini değerlendirmek için kullanılır. P.I. değeri 0,5 olduğunda, sineklerin her iki besin seçeneğine eşit derecede yöneldiği kabul edilir. P.I. değerinin 0,5'ten büyük olması, sineklerin test edilen besin maddesine yöneldiğini; 0,5'ten küçük olması ise sineklerin test edilen besin maddesinden kaçındığını gösterir (Mack ve Zhang 2021).

Çizelgede mavi renk ile gösterilen kısımlar dozun mavi renk besin olarak sunulduğunu, kırmızı renk ile gösterilen kısım dozun kırmızı renk besin ile sunulduğunu temsil etmektedir.

Çizelge 3.6. Konsantrasyonlar ve besine yönelimi ifade eden PI değeri

	Doz	Sayı	Doz	Sayı	PI
1	0,1K	11	Sakkaroz	15	0,463
2	0,1K	17	Sakkaroz	9	0,4245
3	0,5K	2	Sakkaroz	44	0,0962
4	0,5K	1	Sakkaroz	42	0,9457
5	0,1K	56	0,5K	0	1
6	0,1K	49	0,5K	3	0,1167
7	NŞ	56	Sakkaroz	0	1
8	NŞ	58	Sakkaroz	1	0,0169
9	2XŞ	59	Sakkaroz	0	1
10	2XŞ	59	Sakkaroz	0	0
11	2XŞ	60	NŞ	0	1
12	2XŞ	56	NŞ	3	0,0583
13	Sakkaroz	11	Sakkaroz	11	0,500

Bu sonuçlar dahilinde; *D. melanogaster* ergin bireyleri Larval evreden ergin hale gelene kadar 2 kat şeker içeren besin ile beslenmişlerdir. Bu beslenme sonucunda maruz kaldıkları besin dozları

PI = 0,5 - her iki besine de yönelim

PI < 0,5 - Besinden kaçınma

PI > 0,5 - Besinden kaçma eğilimi göstermiştir. Bu verileri baz olarak deney değerlendirildiğinde;

- 0,1K uygulama dozu için (1 ve 2 numara), PI değerine göre bireyler besinden kaçınma davranışı göstermişlerdir. Fakat 0,5'in biraz altında yani bireyler kafeinli çözeltiye az da olsa daha az yönelmiş.

- 0,5K besin için (3 ve 4 numara), PI değerine göre sakkaroz bariz şekilde daha fazla tercih edilmiş. PI değeri 0'a yakın, bu da sakkarozun açık ara tercih edildiğini gösteriyor.
- 0,1K ve 0,5K aynı plate içerisinde 2 farklı renkte koyulduğunda (5 ve 6) bireyler 0,1K için çok güçlü tercihte bulunmuştur.
- NŞ (7 ve 8) deney dozunda PI değerine göre bireyler yüksek oranda NŞ doza yönelim gerçekleştirmişler.
- 2XŞ (9 ve 10) çalışma dozunda ise PI değeri sonucunda büyük bir fark ile bireyler 2XŞ içeren besinlere yönelim gerçekleştirmişlerdir.
- Hem NŞ hem 2XŞ dozlarının farklı renklerde yer aldığı platte bulunan bireyler ise (11 ve 12) yine 2XŞ dozu için çok güçlü tercih görülmüştür.
- Sakkaroz dozları deneyin kontrol grubu olarak yapılmıştır. PI değerine göre sonuç anlamlı çıkmıştır. Beklendiği gibi mavi ve kırmızı eşit derecede tercih edilmiştir. 13 Numaralı satırda yer alan sakkaroz deney sisteminde renk etkisinin gözlemlenmediğini yani kontrol çalışmasının düzgün çalıştığını gösterir. PI değeri 0.5'e ne kadar yakınsa, deneklerin mavi (NB) ve kırmızı (NR) gıdalar arasında tercih göstermediği yani her iki gıdanın da eşit oranda tüketildiği anlaşılır. PI değerinin 0.5'e yakın olması deney düzeneğinin güvenilirliğini teyit eder.

5. TARTIŞMA

Yüksek şeker ve kafein tüketimi, modern beslenme alışkanlıklarının önemli bir parçası haline gelmiştir (Barcelos vd. 2020). Bu bileşenlerin nörolojik sistem üzerindeki etkileri, son yıllarda hem insan hem de hayvan modellerinde bilimsel olarak yoğun şekilde araştırılmaktadır (Ruggiero vd. 2022). Şeker, özellikle rafine sakkaroz ve fruktoz formunda, uzun süreli ve yüksek miktarda alındığında hipokampusta mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve iltihabi yanıtların artışına neden olabilmektedir (Mazzoli vd. 2021). Bu tür metabolik değişiklikler, sinir hücrelerinin yapısını ve işlevini bozarak bilişsel performans kaybı, nöronal yıkım ve nörodejeneratif süreçlerin ilerlemesiyle ilişkilendirilmektedir (Fila vd. 2021).

Şekerin hücre metabolizmasında oksidatif strese yol açtığı, kafeinin ise doz bağımlı olarak farklı etkiler gösterebildiği bilinmektedir. Düşük doz kafein (yaklaşık 0,01 – 0,1 mg/mL arası), literatürde genellikle nöroprotektif ve antioksidan özellikleriyle tanımlanırken, 0,3 mg/ml ve üzeri dozlarda bu etkilerin kaybolduğu ve kafeinin nörotoksik hale geldiği rapor edilmiştir (Mateo-Fernández vd. 2016). Bu nedenle bu çalışmada kullanılan kafein dozları olası zararlı etkilerin değerlendirilmesi açısından önem arz etmektedir. Çalışma kapsamında nörotoksisiteye bağlı DNA hasarını tespit edebilmek için alkali komet testi kullanılmıştır. Bu yöntem DNA'daki zincir kırıklarını yüksek hassasiyetle belirleyerek hücresel düzeydeki genetik hasarın ölçülmesini sağlamıştır. Çalışmada uygulanan dozlar; normal şeker (91,41 mg/ml), yüksek şeker (182,81 mg/ml), düşük kafein (0,1 mg/ml) ve yüksek kafein (0,5 mg/ml) daha önceki genotoksisite araştırmalarında kullanılan dozlarla örtüşmektedir (Dambrosio 1994; Mateo-Fernández 2019).

Genotoksisite, hücredeki genetik materyalin yapısında kalıcı veya geçici değişikliklere neden olan kimyasal, fiziksel ya da biyolojik ajanların oluşturduğu etkiyi ifade eder. Genotoksik etkiler; mutasyonlar, kromozomal kırıklar, anöploidi ve baz değişimleri gibi moleküler düzeyde genom bütünlüğünü tehdit eden bozukluklara yol açabilir. Bu etkiler genellikle kanserojenite, teratojenite ve üreme toksisitesi gibi ciddi biyolojik sonuçlara neden olabilir (Eastmond vd. 2009; Ames vd. 1995). Genotoksik potansiyele sahip maddelerin tanımlanması, toksikoloji ve farmakoloji alanında kritik öneme sahiptir.

Nörotoksisite, sinir sistemi hücrelerinin maruz kaldığı kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanlara bağlı olarak yapısal veya işlevsel zarar görmesi durumudur. Bu durum hücresel düzeyde iyon dengesizlikleri, mitokondriyal disfonksiyon, nöronal sinyal iletiminde bozulma, oksidatif stres artışı ve programlanmış hücre ölümü (apoptoz) gibi çeşitli biyolojik tepkilerle kendini gösterir (Grandjean and Landrigan 2014). Nöronlar; yüksek enerji ihtiyacı, sınırlı antioksidan rezerv ve yenilenme kapasitelerinin kısıtlı olması nedeniyle toksik ajanlara karşı oldukça hassastır (Friedman 2011).

Pestisitler, ağır metaller (ör. kurşun, cıva), solventler, alkol, uyuşturucular ve bazı gıda katkı maddeleri gibi ajanlar, hem gelişimsel hem de erişkin nörotoksisitesine neden olabilir. Ayrıca yüksek şekerli ve kafeinli beslenme alışkanlıklarının kronik maruziyetle

birlikte sinir hücrelerinde ROS üretimini artırarak oksidatif DNA hasarı ve hücre canlılığında azalma ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Grandjean ve Landrigan 2014; Park vd. 2023; Sherif vd. 2024). Bu tür nörotoksik etkilerin değerlendirilmesinde moleküler biyobelirteçler, oksidatif stres ölçümleri ve DNA hasar analizleri (örneğin Komet testi) önemli araçlardır.

Bu kapsamda Komet testi (tek hücre jel elektroforezi) genotoksisite ve nörotoksisite taramalarında yaygın şekilde kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Özellikle oksidatif stres, radyasyon, ilaçlar veya çevresel kirleticilere bağlı DNA hasarlarını tespit etmekte etkili olup, hem *in vitro* hem *in vivo* sistemlerde uygulanabilir (Collins 2004). Testte değerlendirilen kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu genotoksik ve nörotoksik etkinin doz bağımlı ve zaman bağımlı profilini ortaya koyarak genotoksisite risk değerlendirmelerine katkı sağlar.

Elde edilen bulgulara göre, kuyruk uzunluğu bakımından NŞ 0,5K grubu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel önemde anlamlı fark göstermiştir. 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K gruplarında ise daha yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, yüksek şeker varlığında düşük doz kafeinin dahi DNA hasarını artırabileceğini ve iki ajanın birlikte uygulandığında sinerjistik genotoksik etki oluşturduğunu göstermektedir. Kuyruk yoğunluğu bakımından yalnızca 2XŞ 0,1K grubunda anlamlı fark gözlenirken, NŞ 0,5K ve 2XŞ 0,5K gruplarında yüksek anlamlılık saptanmıştır. Bu bulgular, DNA üzerindeki yapısal hasarın kafein dozuyla birlikte yoğunlaştığını düşündürmüştür. Uygulanan tüm doz gruplarında kuyruk momenti değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Bu parametredeki artış, DNA hasarının yalnızca belirli gruplarla sınırlı kalmadığını, tüm şeker ve kafein uygulamalarının DNA bütünlüğünü bozduğunu göstermiştir. Bu durum DNA zincirinde yaygın kırıklara ve genetik stabilitenin bozulmasına işaret etmektedir.

Elde edilen sonuçlar daha önce yapılmış olan araştırmalarla büyük ölçüde örtüşmektedir. Demir (2020) tarafından yürütülen çalışmada yüksek sakkaroz konsantrasyonlarının *D. melanogaster* hemositlerinde DNA hasarı oluşturduğu gösterilmiş; Mateo-Fernández vd. (2016) ise kafeinli içeceklerin genotoksik etkilerini farklı test sistemleriyle doğrulamıştır. Yalnızca kafein uygulanan gruplarda DNA hasarının sınırlı düzeyde olması bu kimyasalın düşük dozda nöroprotektif etki gösterdiğini düşündürmektedir (Pereira-Figueiredo ve Nascimento 2021; Ruggiero vd. 2022). Ancak yüksek şekerle birlikte verildiğinde metabolik stresin artışı kafeinin potansiyel nörotoksik etkisini açığa çıkarmış olabileceği düşünülmektedir.

Yüksek şekerli beslenme, hücresel düzeyde oksidatif stresin başlıca nedenlerinden biridir ve bu durum çeşitli biyokimyasal mekanizmalar aracılığıyla serbest radikal (ROS) üretimini artırır. Öncelikle aşırı glikoz alımı mitokondride oksidatif fosforilasyonu zorlayarak elektron taşıma zincirinde kaçaklara ve süperoksit radikali (O_2^-) oluşumuna yol açar (Yuzefovych vd. 2013; Iacobini vd. 2021). Aynı zamanda glikoz, protein ve lipidlerle etkileşime girerek ileri glikasyon ürünleri (AGEs) oluşturur. Bu bileşikler hücre yüzeyinde bulunan RAGE (AGE Reseptörü) üzerinden sinyal yollarını aktive eder ve NF- κ B aracılığıyla inflamasyonu ve ROS üretimini tetikler (Moldogazieva vd. 2019; Semchyshyn 2024). Bir diğer önemli yolak, NADPH oksidaz aktivasyonudur. Yüksek

glikoz seviyeleri bu enzim komplekslerini uyararak süperoksit üretimini doğrudan artırır (Newsholme vd. 2016; Tan ve Norhaizan 2018; Njeim vd. 2023). Tüm bu süreçler inflamatuvar sitokin salınımını (ör. TNF- α , IL-6) tetikleyerek kronik oksidatif yükü kalıcı hâle getirir (Jiang vd. 2021).

Bu biyokimyasal mekanizmalar, hücresel düzeyde ciddi hasarlarla sonuçlanabilir. Oluşan ROS, DNA'da baz oksidasyonlarına, zincir kırıklarına ve genomik dengesizliğe neden olmaktadır; özellikle nöronal hücrelerde apoptoz sürecini hızlandırır (Leyane vd. 2022). Aynı zamanda hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitleri ROS tarafından hedef alınarak lipid peroksidasyonuna, malondialdehit (MDA) ve 4-Hidroksinonenal (4-HNE) gibi toksik ürünlerin birikimine yol açar (Feillet-Coudray vd. 2009; Gaschler ve Stockwell 2017; Chandimali vd. 2025). Ayrıca proteinlerde karbonilasyon, enzim inaktivasyonu ve yapısal bozulmalar da yüksek şeker kaynaklı oksidatif stresin önemli sonuçlarındandır (Rani vd. 2016; Nowak vd. 2024). Bu bilgiler ışığında yüksek şekerli beslenmenin yalnızca metabolik dengeyi değil aynı zamanda hücresel bütünlüğü bozan çok yönlü oksidatif mekanizmaları aktive ettiğini ortaya koymaktadır.

Ek olarak nöronal hücreler, yüksek oksijen tüketimi ve düşük antioksidan rezervleri nedeniyle oksidatif strese karşı daha hassastır. Bu nedenle şeker ve kafein kombinasyonları altında bu hücrelerde DNA hasarı daha kolay tetiklenmektedir (Wang ve Michaelis 2010; Nowak vd. 2024).

Nöronal hücreler bölünmeyen (post-mitotik) yapıları nedeniyle DNA hasarlarını hücre döngüsüyle ortadan kaldıramaz. Bu yüzden yalnızca onarım mekanizmalarına bağımlıdırlar (Konopka vd. 2022; Ramadoss vd. 2025). Ancak bu hücrelerde özellikle baz eksizyon tamiri (BER) gibi yollarla sınırlı düzeyde onarım yapılabilmekte yaşla birlikte bu kapasite daha da azalmaktadır (Qin vd. 2022; Dubey ve Cary 2023). Ayrıca çift zincirli kırıkları onaran yollar (örneğin homolog rekombinasyon) bölünmeyen hücrelerde aktif değildir (Fishel vd. 2007; Shadfar vd. 2022). Bu sınırlı onarım kapasitesi, nöronların yüksek metabolik aktivitelerinden kaynaklanan oksidatif stresle birleştiğinde DNA hasarına karşı kırılganlıklarını artırmakta ve apoptoz riskini yükseltmektedir (Harrison vd. 2005; Yang vd. 2008; Jeppesen vd. 2011; Konopka ve Atkin 2022). Bunun sonucunda hücre, DNA'daki ciddi hasarı tanıyarak apoptoz gibi programlanmış hücre ölüm yollarını aktive edebilir (Silva vd. 2014; Narciso vd. 2016; Li vd. 2018;).

Yüksek şeker ve kafein alımının hücre canlılığı üzerindeki etkileri son yıllarda hem model organizma olarak *Drosophila* hem de *Drosophila*'nın nöronal hücre sistemlerinde araştırılmıştır. Catalani vd. (2021) çalışmasında, yüksek şekerli diyetle beslenen *Drosophila* bireylerinde nöronal dokuda oksidatif stresin arttığı ve bunun apoptoz ve ototofaji sinyallerini tetiklediği gösterilmiştir. Şeker kaynaklı yüksek enerji mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve ROS (reaktif oksijen türleri) birikimine neden olarak hücre ölümüne zemin hazırlamaktadır (Iheagwam vd. 2025).

Öte yandan kafein de doza bağımlı olarak hem koruyucu hem de toksik etkiler gösterebilmektedir (Arroyave-Ospina vd. 2023). Özellikle 0,3 – 0,5 mg/mL gibi yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında nöronal hücrelerde sitotoksik etki, DNA hasarı ve nekroz benzeri hücre ölümü bildirilmiştir (Mateo-Fernández vd. 2021). Bu etkiler

kafeinin adenosin reseptörleri üzerindeki uyarıcı etkisi, kalsiyum dengesizliği ve mitokondriyal stres ile açıklanmaktadır (Ösz vd. 2022). Ayrıca yüksek şekerle birlikte uygulandığında bu iki ajanın sinerjik olarak oksidatif yükü artırdığı ve hücre ölüm yollarını aktive ettiği vurgulanmaktadır (Lu vd. 2008; Mateo-Fernández 2019; Correia ve Vale 2024).

Bu çalışmadan elde edilen *Drosophila* beyin hücrelerinde uygulanan Akridin Oranj/Etidyum Bromid (AO/EB) boyama sonuçlarıyla ilgili literatür bulguları, uyum göstermektedir. Çalışmada dozların konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının azaldığı buna karşılık ölü hücre oranının arttığı gözlemlenmiştir. Akridin Oranj/Etidyum Bromid boyama sonuçlarına göre NŞ 0,1K grubunda yani normal şekerle birlikte uygulanan düşük doz kafein (0,1 mg/mL) konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla ölü hücre oranının azaldığı gözlenmiştir. Kafein, genellikle merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı etkileriyle tanınsa da son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar fizyolojik dozlarda uygulandığında sinir hücreleri üzerinde antioksidan ve nöroprotektif etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur. Bu etkiler başlıca adenosin reseptör blokajı, mitokondri fonksiyonlarının iyileştirilmesi ve oksidatif hasarın dolaylı yoldan azaltılması mekanizmalarıyla ilişkilidir. Örneğin, Dragicevic vd. (2012) çalışmalarında kafein uygulaması Alzheimer hastalığı modelindeki farelerde mitokondriyal disfonksiyonu azalttığı ve sinaptik proteinleri koruduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, Arendash vd. (2006), kafeinin düşük dozlarda uygulandığında beta-amiloid kaynaklı sinir hasarını baskılayarak bellek ve öğrenme performansını artırabildiğini bildirmiştir. Ayrıca Tiwari vd. (2013), tarafından yapılan hücre kültürü çalışmaları kafeinin nöronlarda lipid peroksidasyonunu azalttığını ve hücre canlılığını artırdığını ortaya koymuştur. Ek olarak Ikram vd. (2020) kafeinin düşük dozlarda nöronal oksidatif stresi baskılayan ve Nrf2 yollarını aktive eden bir antioksidan gibi davrandığını göstermiştir. Benzer şekilde Manalo ve Medina (2018), *D. melanogaster* dopamin nöronlarında düşük doz kafein uygulamasının hücre kaybını önlediğini ve apoptozu baskılayan adenosin reseptör etkileşimleri sayesinde nöroprotektif etki yarattığını bildirmiştir. Son olarak Asbah vd. (2021) tarafından yapılan bir *in vivo* *D. melanogaster* çalışmasında da düşük düzeyde kafein uygulamasının hücre canlılığını artırdığı ve ROS seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir. Bu mekanizmalar kafeinin adenosin A2A reseptörleri üzerindeki antagonistik etkisi, hücre içi kalsiyum dengesinin korunması ve mitokondriyal fonksiyonların desteklenmesi gibi yollarla özellikle düşük dozlarda oksidatif strese karşı sinir hücrelerini stres altında koruyabileceğini ortaya koymaktadır (Socała vd. 2020). Dolayısıyla çalışmadaki NŞ 0,1K grubunda canlılık yüzdesinin artması kafeinin bu tür düşük dozda dengeleyici ve koruyucu etki gösterdiği durumlara bir örnek oluşturmaktadır. Yüksek şeker ve yüksek kafein tüketiminin sinir hücrelerinde oksidatif stres aracılığıyla programlanmış hücre ölümü süreçlerini (apoptoz) tetikleyebileceğini daha ileri dozlarda ise geri dönüşü olmayan nekrotik süreçlere neden olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla Akridin Oranj testi, bu hücresel düzeydeki hasarın biyolojik göstergesi olarak işlev görmüştür.

Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS), organizmadaki tüm antioksidan moleküllerin, enzimatik (SOD, CAT, GPx) ve non-enzimatik (GSH, vitamin C ve E, flavonoidler), reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize etme kapasitesini ölçen bir

göstergedir. Bu sistemin çalışması oksidatif stresle mücadelede temel bir savunma hattı oluşturur (Demirci-Çekiç vd. 2022). Buna karşın Toplam Oksidan Seviyesi (TOS), hücre ve dokularda bulunan süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksinitrit gibi zararlı oksidan moleküllerin toplam konsantrasyonunu ifade eder (Güler vd. 2020). TAS düzeyleri genellikle oksidatif stresin varlığına bir tepki olarak artar. Örneğin mitokondriyal disfonksiyon, çevresel toksinler, inflamasyon ve enfeksiyonlar ROS üretimini artırdığında hücreler buna karşılık olarak antioksidan yanıtı yükseltebilir (Memiş vd. 2022). Bu durum vücut dengesini koruma amacıyla TAS seviyelerinin yükselmesiyle sonuçlanır. Ancak bu artış sistemin hâlen dengeleyici kapasitesinin olduğunu gösterir.

TOS düzeyleri ise genellikle hücresel hasarın habercisidir. Kronik inflamasyon, pestisit maruziyeti, sigara, toksinler ve yüksek şeker/yağ içeren beslenme gibi faktörler, mitokondrilerde ROS üretimini artırarak TOS'un yükselmesine yol açar (Jomova vd. 2023; Corona 2020). TOS'un aşırı yükselmesi; DNA, protein ve lipitlerde geri dönüşü olmayan hasarlara neden olabilir ve apoptozu tetikleyebilir. TAS'ın yüksek TOS'un ise düşük olması ideal fizyolojik durumu temsil ederken TOS'un TAS'a baskın hale geldiği durumlar oksidatif stresin net etkisini gösterir. Bu dengeyi Oksidatif Stres İndeksi (OSİ = $TOS/TAS \times 100$) ile sayısal olarak takip etmek mümkündür. OSİ'nin artması hücrenin savunma kapasitesini aştığını ve oksidatif hasarın yaygınlaştığını gösterir (Altaany vd. 2019; Janion vd. 2022).

Bu çalışmada kafein tüm gruplara sabit dozlarda (0,1 mg/mL ve 0,5 mg/mL) uygulanmış olmasına rağmen yalnızca normal şeker (NŞ) içeren gruplarda anlamlı TAS artışı gözlenirken yüksek şeker (2XŞ) içeren gruplarda bu artış anlamlı olmamıştır.

Nrf2/ARE yolu, hücrelerin oksidatif strese karşı savunma sistemidir. Normalde sitoplazmada Keap1 proteini tarafından baskılanan Nrf2, oksidatif stres koşullarında serbest kalır ve çekirdeğe geçerek ARE (Antioxidant Response Element) bölgelerine bağlanır. Böylece *SOD*, *CAT*, *GPx*, *HO-1*, *NQO1* gibi antioksidan genlerin ekspresyonunu artırır ve hücreyi ROS birikimine karşı korur (Jaiswal 2004; Nguyen vd. 2003; Liu vd. 2022).

Kafeinin düşük dozlarda Nrf2/ARE yolunu aktive ederek hücresel antioksidan savunmayı artırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Ikram vd. 2020; Ösz vd. 2022). Bu mekanizma, *SOD*, *CAT*, *GPx* gibi enzimlerin ekspresyonunu artırarak ROS nötralizasyonunu destekler. NŞ 0,1K ve NŞ 0,5K gruplarında gözlenen anlamlı TAS artışı bu düzenleyici antioksidan yanıtın bir göstergesi olabilir. Kullanılan 0,1 mg/mL kafein dozu Manalo ve Medina (2018) çalışmasında da nöroprotektif olarak gösterilmiştir. Bu dozda TAS artışı görülmesi bu etkiyle uyumludur. 0,5 mg/mL kafein, genellikle sınırda veya toksik düzeyde ROS üretimiyle ilişkilendirilmiştir dolayısıyla TAS miktarında gözlenen yüksek anlamlı artış organizmanın bu strese karşı güçlü bir savunma geliştirdiğini gösterebilir (Ikram vd. 2020).

Ancak aynı kafein dozları, 2XŞ (182.81 mg/mL şeker) gruplarında anlamlı TAS artışı sağlayamamıştır. Bu durum 182,81 mg/mL şekerin (2XŞ) literatürde hiperglisemik stres modeli olarak kabul edilen ≥ 150 mg/mL eşiğinin üzerinde olmasından ve uzun süreli

uygulamalarda hücrede daha yoğun mitokondriyal stres ve ROS yüküne sebep olabileceğinden kafeinin oluşturduğu antioksidan yanıtın bu yükü karşılamaya yetemediğini düşündürmektedir (Catalani vd. 2021).

Khan vd. (2019) çalışmasında da belirtildiği gibi aşırı oksidatif yük durumlarında Nrf2 yanıtı yetersiz kalabilir veya gecikmeli aktivasyon gösterebilir. Şeker metabolizmasındaki bu dengesizlik hücrede NADPH tükenmesine, GSH (glutasyon) yıkımına ve ROS birikimine neden olur. Bu koşullarda, Nrf2 aktivasyonu bile yeterli antioksidan yanıt üretmeye yetmeyebileceği bildirilmiştir

Sonuç olarak kafein her iki şeker dozunda da aynı konsantrasyonda uygulanmış olmasına rağmen yalnızca normal şeker yükü altında etkili bir antioksidan yanıt gözlemlenmiştir. Bu durum kafeinin koruyucu etkisinin ancak oksidatif stres düzeyinin tolere edilebilir sınırlar içinde kaldığı durumlarda etkili olabildiğini yüksek glukoz yükü altında ise bu etkinin kaybolduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışma kapsamında hem normal hem de yüksek şekerle birlikte verilen düşük ve yüksek doz kafein uygulamalarına rağmen hiçbir grupta TOS (Toplam Oksidan Seviyesi) düzeyinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Bu durumun çeşitli biyolojik ve metodolojik nedenleri olabilir. Öncelikle TOS ölçümü sistemik düzeyde toplam oksidan yükü değerlendiren bir testtir. Bu nedenle hücre veya doku düzeyinde lokal olarak artan ROS üretimi sistemik ölçekte fark edilemeyebilir (Güneş ve Nizamlioğlu 2023). Özellikle kısa süreli maruziyetlerde hücre içi antioksidan sistemlerin ROS'u hızlıca nötralize etmesi bu artışın TOS değerlerine yansımamasına neden olabilir. Arroyave-Ospina vd. (2021) bu durumla ilişkili olarak antioksidan tamponlama kapasitesi güçlü olan hücrelerde oksidatif dengenin uzun süre korunabileceğini ve TOS'un bu süreçte değişiklik göstermeyebileceğini bildirmiştir.

Ayrıca, kafeinin düşük ve orta dozlarda Nrf2/ARE yolunu aktive ederek antioksidan sistemleri (SOD, CAT, GPx) uyurabileceği, bu nedenle ROS birikiminin engellenmiş olabileceği düşünülmektedir (Ikram vd. 2020). Kafeinin bu etkisi glukozun neden olduğu mitokondriyal stresle birlikte ROS üretimini artırmasına rağmen antioksidan sistemin TOS düzeyini dengelemesine olanak sağlayabilir. Bu mekanizma sayesinde oksidatif stres molekülleri hızla detoksifiye edilmiş ve dolayısıyla TOS artışı baskılanmış olabileceği düşünülmektedir.

Bir diğer olasılık ise ölçüm zamanlamasıyla ilgilidir. ROS üretimi dinamik ve geçici bir süreçtir; kısa bir sürede pik yapıp ardından hızla düşebilir. Eğer ölçüm bu pik süresinden sonra yapılmışsa geçici oksidatif artış kaçırılmış olabilir. Catalani vd. (2021) *Drosophila* modelinde glukoz kaynaklı oksidatif stresin hücresel düzeyde artmasına rağmen sistemik ölçümlerle fark edilemeyebileceğini vurgulamıştır. Bu da komet ve akridin oranj gibi hücreye özel testlerle saptanan hasarın TOS gibi sistemik ölçüm yöntemleriyle neden eş zamanlı gözlenemediğini açıklamaktadır.

OSİ değeri, hücre içi veya sistemik oksidatif dengenin bozulup bozulmadığını gösterir. OSİ değeri ne kadar yüksekse oksidan yük antioksidan kapasiteye göre o kadar

baskındır ve bu durum hücrel hasar açısından risk taşır (Motor vd. 2014; Sezen vd. 2010).

Bu çalışmada şeker ve kafein dozları arttıkça OSİ değerlerinin düşme eğiliminde olduğu, fakat bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Bu durum için birkaç olası durum düşünülmektedir. Örneğin TAS ve TOS'un birlikte değişmesinden kaynaklanıyor olabilir. OSİ bir oran olduğundan eğer hem oksidan seviyesi (TOS) hem de antioksidan seviyesi (TAS) benzer şekilde artar veya azalırsa oran korunur ve OSİ'de anlamlı fark oluşmaz (Kurku ve Yavuz 2022). Yani hücre içi stres artmış olabilir fakat antioksidan sistem bu artışı karşılamışsa OSİ sabit kalmış olabilir.

Ancak yüksek şeker (2XŞ) gruplarında aynı doz kafeine rağmen TAS düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmemesi bu antioksidan savunma yanıtının sınırlandığını ve sistemin yük altında olduğunu düşündürmektedir. Bu durum OSİ hesaplanırken payda da olan TAS'ın sabit veya düşük kalması nedeniyle TOS'da hafif bir değişiklik olsa bile oranın ciddi biçimde farklılaşmamasına ve anlamlı fark çıkmamasına yol açmış olabileceği düşünülmektedir. Başka bir ifadeyle normal şeker altında antioksidan sistem çalıştığı için OSİ düşerken yüksek şeker koşullarında bu sistemin baskılanması oranı sabitlemiş olabilir.

TAS ve TOS gibi toplam düzeydeki oksidatif stres belirteçleri hücre içi dengenin genel durumunu yansıtsa da bu parametreler her zaman hücrel düzeydeki hasarı tam olarak ortaya koymayabilir (Wu vd. 2017; Sánchez-Rodríguez 2019; Karkhaneı vd. 2021; Demirci-Çekiç vd. 2022). Bu çalışmada da OSİ değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemesine rağmen hücrel düzeyde hasar artabilir (örneğin DNA kırıkları, hücre ölümü vb.) Bu nedenle komet testi ve Akridin Oranj boyama çalışmalarında beyin hücrelerinde DNA bütünlüğünün bozulduğunu ve hücre canlılığında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum bölgesel oksidatif hasarın toplam oksidatif stres ölçümlerine her zaman yansımayaabileceğini desteklemektedir (Barcelos vd. 2020; Yirün vd. 2016).

Lipid peroksidasyonu, hücre zarlarını oluşturan çoklu doymamış yağ asitlerinin, reaktif oksijen türleri (ROS) ile etkileşimi sonucu oksidatif olarak bozulması sürecidir (Iuchi vd. 2021; Wang vd. 2023). Bu reaksiyon zincirleme şekilde ilerleyerek hücrel yapıları tehdit eden toksik bileşiklerin ortaya çıkmasına neden olur. Sürecin temel aşamaları; başlatma (ROS'ların lipid hidrojenlerini çekmesi), ilerleme (lipit radikallerinin oksijenle reaksiyonu) ve sonlanma (stabil ürün oluşumu veya diğer hücrel bileşiklerle etkileşim) olarak tanımlanır (Ayala vd. 2014; Xu vd. 2024).

Bu süreç sonucunda ortaya çıkan ve en bilinen toksik ürünlerden ikisi malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE)'dir. 4-HNE, membranın çoklu doymamış yağ asitlerinden türeyen oldukça reaktif bir aldehittir ve hücre içi proteinler, DNA ve enzimlerle kovalent bağlar kurarak fonksiyonel bozulmalara neden olur (Li vd. 2022; Zhang vd. 2023). MDA ise genellikle TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) yöntemiyle ölçülerek lipid peroksidasyonunun biyobelirteci olarak kullanılır (Negre-Salvayre vd. 2010; Tsikas 2017; Mas-Bargues 2021).

Lipid peroksidasyonu özellikle yüksek oksijen tüketimi ve zengin membran lipid içeriğiyle karakterize edilen beyin, karaciğer, kalp ve böbrek gibi organlarda daha yoğun şekilde gerçekleşir. Bu süreç, oksidatif stres aracılığıyla gelişen nörodejeneratif hastalıklar (örneğin Alzheimer ve Parkinson), kardiyovasküler bozukluklar, diyabet ve çeşitli kanser türlerinin patogeneğinde kritik bir rol oynamaktadır (Mattson 2009; Zhong ve Yin 2015).

Bu çalışmada, normal şeker (91,41 mg/mL) ve yüksek şeker (182,81 mg/mL) ile birlikte uygulanan düşük (0,1 mg/mL) ve yüksek (0,5 mg/mL) kafein dozlarının lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bulgulara göre yalnızca NŞ + yüksek kafein (0,5K) grubunda MDA düzeyinde artış gözlenmiş diğer tüm gruplarda kontrole kıyasla azalma eğilimi bulunmuştur. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bu durum daha önce yapılan komet testi ve Akridin Oranj boyama sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde lipid peroksidasyonunun ölçülen MDA düzeylerine yeterince yansımamış olabileceğini göstermektedir.

MDA (Malondialdehit), lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak yaygın bir biyobelirteçtir ancak her oksidatif stres durumunda ölçümde anlamlı bir artış göstermeyebilir. Bu durumun nedenleri arasında; MDA'nın geçici ve reaktif bir molekül olmasından kaynaklı olabilmektedir. Hücre içinde hızla başka bileşiklerle reaksiyona girer veya antioksidan sistem tarafından detoksifiye edilir. Bu nedenle oksidatif hasar gerçekleşse bile ölçüm anında MDA seviyesi düşük kalabilir (Tsikas 2017) veya lokal hasar ve sistemik ölçüm farkından kaynaklanabilir. MDA, hücre içinde lokal olarak artmış olabilir ancak örnekleme sırasında alınan doku veya hücre süspansiyonunda bu artış seyrelmiş olabilir. Bu da ölçüm sonuçlarının gerçek hasar düzeyini yansıtmamasına yol açabilir (Yoshida vd. 2013). Son olarak ölçüm metotlarının duyarlılığından kaynaklanabilir. MDA ölçümünde genellikle kullanılan TBARS yöntemi, özgüllüğü düşük ve yanlış pozitif sonuçlara açık bir yöntemdir. Ayrıca bazı teknik sınırlılıklar nedeniyle küçük ama anlamlı biyolojik değişiklikleri ayırt edemeyebilir (Dotan vd. 2004).

Beyin dokusu yüksek oksijen tüketimi ve yüksek çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriği nedeniyle lipid peroksidasyonuna oldukça hassas olmasına karşın aynı zamanda güçlü antioksidan savunma sistemlerine de sahiptir (Butterfield ve Halliwell 2019). Bu sistemler arasında glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve nöronal spesifik peroksisredoksinler yer alır ve lipid peroksidatif hasarı nötralize edebilir. Bu enzimler beyin hücrelerinde lipid peroksidatif zincir reaksiyonlarını başlatan reaktif oksijen türlerini (ROS) etkisiz hâle getirerek hücrel hasarı önlemektedir (Ighodaro ve Akinloye 2018). Ayrıca peroksisredoksinler ve glutatyon redoks sistemleri, nöronal hücrelerde lipid peroksidasyonu baskılayan ikincil koruma katmanları olarak görev yapar (Adibhatla ve Hatcher 2010; Casañas-Sánchez vd. 2014). Bu moleküler savunma ağı beyin gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip dokularda oksidatif hasarı sınırlamak için oldukça etkilidir.

D. melanogaster'ın nöronal dokusu, oksidatif stresle başa çıkmak için iyi gelişmiş bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Bu sistemin temel bileşenleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon (GSH) ve peroksisredoksinler (Prx) yer alır. *Drosophila*'da hem sitoplazmik (Sod1) hem de mitokondriyal (Sod2) süperoksit

dismutaz enzimleri tanımlanmıştır ve bu enzimler, süperoksit radikallerini hidrojen peroksite dönüştürerek nöronal yaşlanmayı ve oksidatif hasarı azaltmada önemli rol oynar (Phillips vd. 1989). Glutasyon sistemi de oldukça aktiftir. özellikle *Gclc* (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit) ve *Gst* (glutasyon S-transferaz) genleri aracılığıyla GSH üretimi sağlanır. Bu sistem ROS detoksifikasyonunda ve hücrel redoks dengesinin sürdürülmesinde etkilidir. *Gclc* geninin sinir dokusundaki ekspresyon eksikliği durumunda nörodejeneratif süreçlere yol açabileceği için kritik öneme sahiptir (Orr vd. 2005). Ayrıca peroksirredoksinler, özellikle Prx5 ve Prx6 *Drosophila* beyin dokusunda ekspresyon göstererek mitokondriyal ROS'u nötralize eder ve yaşa bağlı nöronal dejenerasyonu sınırlar. Radyuk ve arkadaşlarının çalışması Prx5'in mitokondriyal strese karşı nöronları koruduğunu açıkça ortaya koymuştur (Radyuk vd. 2010). Bu savunma sistemlerinin birlikte çalışması *Drosophila*'nın beyin hücrelerini lipid peroksidasyonu ve diğer oksidatif hasar türlerine karşı dirençli hâle getirmektedir.

Bu bağlamda, çalışmada kullanılan şeker ve kafein dozları (91,41 – 182,81 mg/mL şeker; 0,1 - 0,5 mg/mL kafein) oksidatif stres yaratma potansiyeline sahip olsa da beyin hücrelerinde bu güçlü antioksidan sistemlerin aktive olması sayesinde lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA'nın detoksifiye edildiği veya birikiminin önlendiği düşünülmektedir. Dolayısıyla MDA düzeylerinde gözlemlenen dalgalanmalara rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmaması bu nöroprotektif sistemlerin uygulanan doz aralığında etkili şekilde çalıştığını ve oksidatif yükü dengelediğini göstermektedir.

Kafein düşük dozlarda antioksidan gen ekspresyonunu (Nrf2/ARE yolu üzerinden) artırabilirken (Wang vd. 2012; Xu vd. 2017). Yüksek dozlarda prooksidan etkiler göstererek lipid peroksidasyonunu tetikleyebilir (Ösz vd. 2022). Bu bağlamda NŞ + 0,5K grubunda MDA artışı gözlenmiş olması yüksek doz kafeinin bu eşik değeri aştığını düşündürmektedir.

Tsikas (2017) ve Yoshida vd. (2013) çalışmalarından elde ettikleri sonuçlar bu çalışmadan elde edilen veriler ile uyumluluk göstermektedir. Çalışmadan elde edilen verilerde istatistiksel anlamlılık gözlenmemesi, muhtemelen MDA'nın kısa yarı ömürlü, kararsız bir molekül olması, metabolizma tarafından hızla temizlenmesi ve ölçüm yöntemlerinin duyarlılığının sınırlı kalması gibi teknik nedenlerden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca kültürde tutulan *Drosophila* hattında genetik homojenlik sağlandığı için bireyler arası biyolojik varyasyon ihtimali oldukça düşüktür. Bu durumda gözlenen istatistiksel belirsizlik, ölçüm sisteminin sınırlılıklarından veya MDA'nın zamanlamaya duyarlılığından kaynaklanmış olabilir.

Bu nedenle, çalışmada komet testi ve AO boyama gibi hücre düzeyli analizlerde gözlenen DNA hasarı ve canlılık kaybı MDA ölçümlerinin gösterdiğinden daha belirgin oksidatif hasarın var olduğunu ortaya koymuştur. Bu da lipid peroksidasyonu değerlendirmelerinde MDA gibi tek bir biyokimyasal belirteçle sınırlı kalmaksızın çok yönlü değerlendirme yapılması gerektiğini desteklemektedir.

Çalışmanın davranış deneyleri bölümünde, Tip 2 Diyabet modeli oluşturmak amacıyla yüksek şekerli diyetle maruz bırakılan *D. melanogaster* bireylerinin farklı kafein

dozları ile kombinasyonları; larval ağırlık, larval sürünme, pupa pozisyon, negatif jeotaksis, ergin ağırlık, ömür uzunluğu ve iki yönlü besin analizi davranış parametrelerinde değerlendirilmiştir. *D. melanogaster* bireyleri şeker ve kafein kombinasyonlarının 1. nesil larvalarındaki lokomotor davranış üzerine etkileri değerlendirildi. Bulgular özellikle şekerle birlikte uygulanan kafein gruplarındaki larvaların motor davranışlarında belirgin düzeyde bozulmalara neden olduğunu ortaya koymuştur.

0,1K ve 0,5K dozlarında uygulanan kafein gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde farklılıklar gözlemlenmiştir ($0.001 < p < 0.01$). Bu farklılıklar, düşük doz kafeinin larvaların sinir sistemi üzerinde sürünme davranışına yansıyacak düzeyde etkiler oluşturduğunu düşündürmektedir. Ancak şekerle birlikte uygulanan aynı dozlar ($2X\text{Ş}+0,1K$ ve $2X\text{Ş}+0,5K$) anlamlı sonuçlar vermemiştir. Bu durum organizmanın düşük seviyedeki şeker + kafein kombinasyonuna karşı belirli bir tolerans geliştirdiğine ya da bu kombinasyonların belirli doz aralıklarında savunma sistemlerini aktive edip zararlı etkiyi dengeleyerek bu etkinin davranış düzeyine yansımaya engel olabileceğine işaret etmektedir (Franco vd. 2013). Diğer yandan daha yüksek dozlarda uygulanan kombinasyonlar, ($2K-2X\text{Ş}$, $1K-2X\text{Ş}$, $2K-4X\text{Ş}$, $0,5K-4X\text{Ş}$ ve $2K-8X\text{Ş}$) lokomotor performansta istatistiksel olarak oldukça yüksek düzeyde farklılıklar ortaya çıktığı görülmüştür ($p < 0.001$). Bu bulgular yüksek şekerli ortamda artan kafein düzeyinin sinir sistemi üzerinde birikimli ve zararlı bir etkiye sebep olduğunu ve bu etkinin motor koordinasyon üzerinde doğrudan etki gösterdiği görülmektedir. Siddique vd (2021) tarafından bildirilen benzer çalışmalarda da yüksek şekerin toksik ajanlarla birleştiğinde oksidatif stres düzeyini artırdığı ve sinaptik plastisiteyi bozduğu belirtilmiştir.

Davranışsal bulgular moleküler analizlerle de desteklenmektedir. Önceki deneylerde NŞ ve $2X\text{Ş}$ dozlarıyla uygulanan kafein gruplarında gerçekleştirilen Komet analizleri, DNA hasar düzeylerinde anlamlı artışlar olduğunu göstermiştir. TAS ve TOS arasındaki dengenin ortaya çıkışı bu stresin yalnızca hücresel boyutta değil aynı zamanda sistemik bir biyokimyasal yanıtın meydana geldiğinin göstergesidir. Ayrıca akridin oranj boyama yöntemiyle yapılan analizlerde artmış apoptoz hücre sayısı, sinir hücrelerinde programlanmış hücre ölümünün aktifleşmesine neden olduğunu göstermektedir. Artan sinir hücresi ölümü, sinaptik iletimde bozulmalara yol açarak motor davranışlarda azalma ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (Na vd. 2013; Gyimah vd. 2022; Wang vd. 2022; Zhang vd. 2025). Kafeinin düşük dozlarda ortaya çıkan nörolojik etkileri, bu maddenin literatürde tanımlanan çift yönlü (bifazik) etkisiyle ilişkilendirilebilir. Düşük konsantrasyonlarda kafein, nöronal kalsiyum (Ca^{2+}) sinyallemesini geçici olarak artırabilmekte ancak doz arttıkça bu etkinin yön değiştirerek baskılayıcı bir etkide olduğu bildirilmektedir (Franco vd. 2013). Bu çalışmada da bazı kafein dozlarının sürünme davranışını belirgin şekilde değiştirmemesi kafeinin etkilerinin her zaman doz arttıkça güçlendiği anlamına gelmediğini hatta bu durumda vücudun dengeleyici sistemlerinin devreye girmiş olabileceğini düşündürüyor. Özetle düşük doz kafein maruziyeti sonucunda organizma hücresel dengeyi koruyabilirken yüksek dozlara çıkıldığında adenosin reseptörlerini engelleyerek ve kalsiyum düzenini bozarak metabolik stresi arttırabilmektedir (Franco vd. 2019; Asano vd. 2021). Bu etki glikoz yüküyle

birleştiğinde hücrel savunma mekanizmaları dengeyi sağlamak ve sistemi olumsuz etkiye karşı korumak için yetersiz kaldığı düşünülmektedir.

Öte yandan bazı kombinasyonların yalnızca 1. nesilde değerlendirilebilmiş olması ve ileri nesillerde bireylerin gelişim sürecine devam edememesi, bu dozların gelişim üzerinde baskılayıcı ya da durdurucu bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu kafein ve şekerin birlikte uygulanmasının sadece kısa vadeli değil aynı zamanda kalıtsal düzeyde de sinir sistemini etkileyebileceğini ortaya koyarak aslında potansiyel bir nesiller arası (transgenerasyonel) nörotoksosite riski taşıdığını göstermektedir (yang vd. 2023).

D. melanogaster'in 3. nesil larvalarında yapılan sürünme deneyinde şeker ve kafein kombinasyonları değerlendirildiğinde kontrol grubundaki bireylerde sürünme mesafesi ortalama 4,6 cm ölçülmüş yalnızca kafein verilen gruplarda bu mesafe ortalama 3,2 cm'ye kadar düştüğü, İki kat şeker içeren gruplarda ise değerlerin ortalama 1,9 cm'ye kadar azaldığı görülmüştür. Aynı grubun 1. nesil verileriyle karşılaştırıldığında bu azalma zamanla organizmada homeostatik dengenin sağlanamadığı ve bu dengesizliğin bir sonraki nesile aktarılmasının yanında ek olarak 3. nesil bireylerinde de maruziyetin gerçekleştirilmesi bu etkinin davranış düzeyine stres faktörü olarak yansıdığını düşündürmektedir. İstatistiksel analizlerde özellikle NŞ 0,1K, NŞ 0,5K, 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K dozlarında kontrol grubuna göre anlamlı ve çok anlamlı farklar olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$ ve $p < 0.001$). Bu bulgular, şekerin + kafein uygulamalarında sadece kafein uygulamalarına oranla sinaptik iletişimde daha fazla bozulma meydana geldiği ve bu bozulmanın motor kontrolü etkilediğini düşündürmektedir. Literatürde de diyabetik metabolik stres altında oksidatif yük artışı ve nöroinflamasyonun sinaptik plastisiteyi zayıflatarak organizmanın hareketle ilişkili sistemlerinde fonksiyon kaybına neden olduğu bildirilmektedir (Kohsaka 2023). Üçüncü nesil larvalarda gözlemlenen azalan sürünme mesafesi şekerli ortamda, kafein varlığının sinir sistemi üzerindeki zararlı etkilerinin zamanla arttığını göstermektedir. Bu model çevresel faktörlerin birikimli etkilerini değerlendirmek için organizma düzeyinde kullanılabilecek etkili bir yaklaşıma işaret etmektedir. Bu çalışmada elde edilen önemli bulgulardan biri 8 kat şekerle birlikte uygulanan kafein dozlarında 2. nesil bireylerin gelişiminin tamamlanamamasıdır. 1. nesildeki erginler belli bir süre hayatta kalıp yumurta bırakmış ancak bu yumurtalardan çıkan larvalar kısa süre içinde kurumuş ve gelişim sürecine devam edememiştir. Pupa evresine ulaşan bazı larvalar ise gelişim durmuş ve ergin sinek çıkışı gözlemlenmemiştir. Bu durum, uygulanan 8 kat şeker + kafein kombinasyonunun gelişim döngüsünü tamamlayamayacak kadar yüksek oranda fizyolojik bir yük oluşturduğunu düşündürmektedir. Yüksek şekerin *D. melanogaster*'de diyabet benzeri bir bozulmaya/duruma yol açtığı ve insülin/IGF yollarını baskıladığı bilinmektedir (Loreto vd. 2021; Baenas ve Wagner 2022). Bu baskılanma ile organizmanın enerji dengesi bozulmaktadır ve hücrede reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırmaktadır (Kohsaka 2023; Huang vd. 2024). Oksidatif yük arttığında hem vücut hücrelerinde hem de üreme hücrelerinde DNA hasarı, mitokondriyal bozulma ve erken apoptoz süreci tetiklenebilmektedir (Huang vd. 2020; Na vd. 2022). Ayrıca bazı güncel araştırmalar mitokondriyal stresin epigenetik mekanizmaları etkileyerek germ hattında kalıcı hasarlara yol açabileceğini bildirmiştir (Lu vd. 2022; Charmpilas vd. 2024). Bazı dozlarda bireylerin ileriki nesillere ulaşamamasının sebebi olarak germ hücrelerinde meydana

gelen DNA hasarı ve oksidatif hasar olabileceği düşünülmektedir. Bu durum artan oksidatif hasarın sadece hücresel bütünlüğü değil aynı zamanda hormonal düzenlemeleri ve gelişim sinyallerini de bozmuş olabileceğini düşündürmektedir (Nagpal ve Abraham 2019; Lu vd. 2022). Larval sürünme deneyinin 5. nesil verileri şeker ve kafein kombinasyonlarının nesiller boyunca maruziyetinin nasıl etkilerinin olduğunu ve davranış düzeyine nasıl yansıdığını nörolojik hasarının davranışsal düzeyde nasıl etki ettiğini ortaya koyan ve önem arz eden nesildeki deneyidir. Kontrol grubunda ortalama 4,5 cm olarak ölçülen sürünme uzunluğu yalnızca kafein uygulanan gruplarda ortalama 3 cm'ye gerilemiştir. Özellikle 0,1K dozu istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiş 0,5K-2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K gruplarında ise çok yüksek anlamlı farklar ($p < 0.001$) olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar dahilinde 5. nesilde artık düşük doz kafeinin tek başına bile sinaptik aktiviteyi baskılayabileceğini şekerle birlikte verildiğinde ise bu etkinin sinerjik şekilde artarak organizmanın psikomotor aktivitesinde yüksek oranda bozulmaların olduğunu ortaya koymaktadır. Kafeinin yüksek dozları özellikle hassas nörogelişim evrelerinde kalsiyum sinyalleme ve adenosin reseptörlerinin modülasyonu yoluyla sinaptik homeostazı bozabilmektedir (Franco ve Navarro 2019; Asano ve Fukunaga 2021). Bu etkiler özellikle diyabetik metabolik stresin eşlik ettiği durumlarda oksidatif yükün katlanarak artmasına neden olmaktadır (Huang vd. 2020). Larval sürünme *Drosophila*'da nöromotor bütünlüğü gösteren güvenilir bir davranışsal parametredir. Sinirsel bütünlükteki bozulmalar; motor nöron fonksiyonu, kas-sinir iletişimi ve enerji metabolizması üzerinden doğrudan lokomotor aktiviteye yansımaktadır (de Farias vd. 2021; Kohsaka 2023). Bu bağlamda 5. nesilde gözlemlenen lokomotor aktivitesindeki bu düşüş yalnızca akut toksisite değil ek olarak toksik etkinin artarak hücresel ve epigenetik hasarların davranış düzeyinde kalıcı etki gösterdiği sonucunda varılmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu sonuçlar diyet kaynaklı metabolik stresin zamanla artan şekilde sinaptik fonksiyonları bozduğunu ve davranış üzerinde kalıcı etkiler bıraktığını gösteren güncel literatürle de uyumludur (Nagpal ve Abraham 2019; Kohsaka 2023; Bartoszek ve Fornal 2025).

Bu çalışmada 4 kat şeker ile kombinlenmiş kafein dozlarının 5. nesilde bireylerin elde edilememiş olması bu kombinasyonun *D. melanogaster*'de ciddi düzeyde üreme başarısızlığı ve gelişimsel bozulmaya yol açtığını vurgulamaktadır. 4XŞ + kafein gruplarında 4. nesil bireyleri yumurtadan çıkabilse de büyük çoğunluğu pupa evresini tamamlayamamış veya ergin hale gelememiştir. Bu bulgular yüksek kafein ve glikozun birlikte oluşturduğu toksik fizyolojik yansımanın *D.melanogaster* bireylerinde hayatta kalımlarını doğrudan etkilediğini göstermektedir. Elde edilen veriler kapsamında kafeinin yüksek dozlarda *D.melanogaster*'in üreme ve gelişim fizyolojisini olumsuz etkileyebileceğini bildiren Apostolopoulou vd. 2016'nın çalışmalarıyla da uyumludur. Kafein burada yalnızca merkezi sinir sistemini değil aynı zamanda germ hattı hücrelerinin diferansiyasyonu ve erken embriyogenez sürecini de olumsuz etkilemektedir (Basnet vd. 2021; Glaser vd. 2024). Son yıllarda yapılan çalışmalar bu etkinin mitokondriyal stresin kalıtımı, ROS üretiminin artışı, hormon regülasyonunun bozulması gibi çok yönlü mekanizmalarla gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Lu vd. 2022; Charmpilas vd. 2024).

Yüksek şekerli beslenmenin tek başına maruziyeti erkek fertilitasını azalttığı, testis morfolojisinde bozulmalara ve sperm üretiminde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir

(Heinrichsen ve Haddad 2018; Kohsaka 2023). Buna ek olarak kafeinin yüksek dozlarda adenosin reseptörlerini baskılaması ve kalsiyum dengesini bozması dışı *D. melanogaster* bireylerinde yumurta oluşum sürecinin aksamasına ve embriyo gelişiminin engellenmesine neden olmaktadır (Franco ve Navarro 2019; Asano ve Fukunaga 2021). Ayrıca kafein ve şekerin sinerjik etkisiyle ortaya çıkan mitokondriyal disfonksiyon, enerji üretimlerini baskılayarak larvaların gelişimlerini tamamlama sürecini zorlu hale getirebilmektedir (Nagpal ve Abraham 2019). Bu da doğrudan gelişimsel sistemlerin sekteye uğraması, üreme durumlarının işlevsizleşmesi ve neslin devam edememesi ile sonuçlanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen 1. nesil larval ağırlık verileri şeker + kafein kombinasyonlarının gelişimsel fizyoloji üzerindeki etkilerini anlamak açısından önemli bulgular sunmuştur. Sadece kafein uygulanan gruplarda düşük doz (0,1K) kafein uygulaması larval ağırlığı artırırken yüksek kafein dozlarında (0,5K, 1K, 2K) anlamlı bir ağırlık düşüşü gözlemlenmiştir. Bu durum kafeinin doz-bağımlı bifazik etkisini işaret etmektedir (Berry 2020; Stack Mills 2022). Düşük dozda kafein metabolizmayı geçici olarak uyarıcı bir etki yaparken yüksek dozlarda oksidatif stres ve hücresel düzeyde enerji dengesizliği nedeniyle larval büyüme kısıtlanmaktadır (Franco ve Navarro 2019; Asano ve Fukunaga 2021). İki kat şeker ile kombine edilen kafein dozlarında yalnızca düşük kafein içeren dozda (2XŞ + 0,1K) ağırlık artışı gözlemlenmiştir. Diğer dozlarda kafein miktarı arttıkça larval ağırlık anlamlı düzeyde azalma göstermiştir. Bu bulgular ışığında kafein ve glikozun birlikte oluşturduğu metabolik stresin larval gelişimini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir (Kohsaka 2023). 4 kat ve 8 kat şekerli kafein gruplarında ağırlık kaybı çok daha belirgin hale görülmüştür ve bu gruplarda istatistiksel olarak çok yüksek anlamlı farklar ($p < 0.001$) kaydedilmiştir. Yüksek şekerli beslenmenin *Drosophila*'da lipid birikimi yerine hücresel toksisiteye neden olduğu insülin benzeri peptid sinyallerini baskıladığı ve enerji depolama sistemlerini bozduğu daha önce yayınlanan kaynaklar dahilinde bilinmektedir (Heinrichsen ve Haddad 2018; Huang vd. 2024). Buna ek olarak kafeinin adenosin reseptörlerine bağlanmasıyla cAMP seviyesinin yükselmesi ve mitokondriyal ATP üretiminin durdurulması sonucunda hücre büyümesi için gerekli enerji sağlanamamaktadır (Nagpal ve Abraham 2019; Huang vd. 2020) Larval ağırlığın azalması, genellikle organizmanın besin alımı, sindirim kapasitesi, hormonal sinyalizasyon ve hücresel büyüme gibi çok yönlü süreçlerinin baskılandığını gösterir. *Drosophila*'da, bu dozları içeren beslenme ile birlikte oluşan metabolik yük aktin-miyozin yapısının, endokrin sinyallerin (örn. DILP2) ve yağ depolama regülasyonunun bozulmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Lu vd. 2022; Chatterjee 2024). *D. melanogaster*'in 3. nesil larvaları üzerinde yapılan ağırlık ölçümleri şeker + kafein kombinasyonlarının kuşaklar boyunca artan metabolik yük yarattığını ortaya koymaktadır. Özellikle yalnızca kafein uygulanan 0,1K ve 0,5K dozlarında ilave olarak 2 kat şeker ile birlikte verilen 0,1K ve 0,5K dozlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı ağırlık azalmaları tespit edilmiştir. Bu veriler kafeinin gelişimsel süreçlerin ilerleyişini bozan ve larval büyüme üzerinde baskılayıcı etkilere neden olan etken madde olduğunu göstermektedir. 2025 yılında yayınlanan bir çalışmada kafeine maruz kalan *Drosophila* larvalarında epoksit hidrolaz eksikliğinin glikoz metabolizmasını ve büyüme kapasitesini önemli derecede düşürdüğü

bildirilmiştir (Rogalski vd. 2025). Bu durum özellikle düşük dozların bile gelişimsel fizyoloji için hücresele düzeyde kronik stres birikimine sebep olabileceğini göstermektedir.

Yüksek şekerle kombine edilen kafein uygulamaları, larvalarda ATP üretiminde yetersizliğe ve oksidatif stresin kas dokularında birikmesi sebebiyle larvaların gelişimsel olarak duraklamasına yol açmaktadır (Nainu vd. 2025). Bu durumun altında yatan sebebin enerji yetersizliğinin protein sentezinde aksamaya neden olduğu ve bu nedenden kaynaklı büyümede baskılanmanın olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde 2020 tarihli başka bir çalışmada da *Drosophila*'da yüksek şeker yüküne bağlı olarak gelişimsel stresin insülin benzeri hormonların ifadesini azalttığı ve oksidatif hasarı arttırdığını göstermiştir (Neamtu vd. 2020). Larval ağırlıktaki düşüş sadece akut stres etkisine değil aynı zamanda mitokondriyal disfonksiyon, insülin direnci ve antioksidan sistemin yetersizliğine de bağlanmaktadır. Catalani vd.(2021) tarafından yapılan bir araştırmada, yüksek şeker diyeti ile beslenen larvaların göz ve sinir sistemi gibi dokularda ağır nörometabolik bozulma yaşadığı ve ağırlıklarının da azaldığı saptanmıştır. Yalnızca kafein değil aynı zamanda glikozun da gelişim üzerinde kümülatif, nesiller arası taşınabilen fizyolojik stres faktörleri yarattığını göstermektedir. Bu etki larval ağırlık gibi doğrudan ölçülebilir parametrelerde açıkça görülmektedir. Araştırma kapsamında *D. melanogaster* larvalarının 5. nesilde ölçülen ağırlıkları, uzun süreli kafein ve şeker maruziyetinin etkilerini gözlemlemek açısından önemli veriler sunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla 0,1K, 0,5K, 2XŞ + 0,1K ve 2XŞ + 0,5K dozlarında istatistiksel olarak çok yüksek anlamlı ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. Beşinci nesil ile 3. nesil karşılaştırıldığında fark küçük olsa da 5. nesil ile 1. nesil kıyaslandığında ağırlık azalmasının daha belirgin olduğu saptanmıştır. Bu durum uzun süreli maruziyetin kümülatif metabolik baskı oluşturduğunu göstermektedir. Güncel araştırmalar kafein ve yüksek şekerin birlikte kullanıldığında oksidatif stres, glikoz intoleransı ve hücresele enerji üretiminde azalma gibi fizyolojik etkilerle larval gelişimi baskıladığını göstermektedir (Min vd. 2023; Sherif vd. 2024). Bu etkiler özellikle 5. nesil gibi uzun süreli maruziyetlerde epigenetik yanıtların değişmesiyle kalıcı hale gelebilmektedir (Camilleri 2022). Benzer şekilde yüksek şeker ortamında kafein maruziyetiyle ilişkili insülin sinyal yollarının baskılandığı ve hem larval hem de ergin bireylerde glikoz dengesinin bozulduğu rapor edilmiştir (Nainu vd. 2025). Bu bozulmalar larvaların enerji homeostazını sağlamasını engellemekte ve ATP yetersizliğine bağlı olarak büyüme sürecini yavaşlatmaktadır.

Glukoz ve fruktozla beslenen larvalarda DNA hasarı, oksidatif yük artışı ve büyüme geriliği gibi etkiler gözlemlenmiştir (Lushchak vd. 2011). Bu etkiler özellikle şeker-kafein kombinasyonlarının mitokondriyal stres ve apoptoza neden olabileceğini göstermektedir (Liu vd. 2022). Zamana yayılan bu etkiler sadece hücresele değil doku düzeyinde dejenerasyona da neden olabileceği düşünülmektedir. Sonuçlar dahilinde yüksek şekerli diyetle kafein maruziyetinin gelişimsel büyümeyi baskıladığını, hem hücresele enerji metabolizmasında hem de endokrin kontrolde kalıcı hasarlar oluşturduğunu ve bunun larval ağırlık gibi doğrudan ölçülebilir morfolojiye yansıdığını göstermektedir. *D. melanogaster* larvalarının pupa pozisyonları, uygulanan kafein ve şeker dozlarına bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik göstermiştir. Bu değişiklik hem gelişimsel davranış için hem de fizyolojik stres için gözle görülür yanıtlar olmuştur.

Normal şartlarda larvalar besin yüzeyinden uzaklaşarak şişenin/tüpün üst bölgelerine pupa yaparlar ve larvaların pupa oluşturması için optimum bölgeler B ve C gibi üst kısımlardır fakat deney gruplarında özellikle D, E ve besin yüzeyi bölgelerinde pupa oluşumunun artması, larvaların stresli çevre koşullarında gelişimsel fizyolojik kararlarını değiştirdiğinin bir göstergesi olmuştur. Bu sonuçlar beslenme stresinin larvaların pupa oluşturacağı yerini belirleme davranışını doğrudan etkilediğini bildiren çalışmalarla uyumludur. Xiao vd. 2022 tarafından yapılan deneysel çalışmalarda, *Drosophila* larvaları metal iyonları ya da kafein benzeri çevresel streslere maruz kaldıklarında pupa oluşturduğu bölgesini değiştirerek toksik bölgeden uzaklaşma davranışı sergilemiştir. Aynı şekilde Niedergerke ve Bilhorn (2022) yüksek glikoz ortamına maruz kalan larvaların oksidatif stres yaşadığını ve bu durumun hem pupa oluşturma oranlarını hem de konumlarını etkilediğini göstermiştir.

Özellikle 2 kat ve 4 kat şekerle birlikte uygulanan kafein dozlarında (4XŞ 0,5K, 2XŞ 2K), pupaların D, E ve besin yüzeyinde yoğunlaştığı görülmüştür. Yüksek enerji yükü ve toksik baskının bir arada larvalar üzerinde etkili olması, larvaları gelişim sürecinde daha az tercih edilen bölgelere yönlendirdiğini göstermektedir. Bu gözlem Berry 2020'nin hormetik stres modellemesi ile de örtüşmekte burada da çevresel stres etkenlerinin larvaların davranışsal tercihlerinde kaymalara yol açtığı bildirilmiştir. Larvaların dozlara bağlı olarak pupa oluşturduğu bölgelerde değişikliğin meydana gelmesi yüksek şeker maruziyeti sonucunda nöromusküler koordinasyon bozukluğundan kaynaklanmış olabileceği söz konusudur. Sinir-kas iletiminde ortaya çıkan bozulmalar larvaların besinden uzaklaşıp yukarıya doğru hareketini zorlaşmasına ve alt bölgelerde pupa oluşturmalarının nedeni olabilmektedir (Na vd. 2013). Yüksek şeker, mitokondriyal aktivitenin bozulmasına neden olarak ATP üretiminin düşmesine ve böylelikle yetersiz enerjiye neden olarak larvaların yukarı tırmanma yönelimine engel olabilmektedir (Musselman vd. 2011; Pöttler 2021). Oksidatif stres artışı larvalarda hem sinir hem de kas sisteminde işlev kaybına neden olarak larvaların yukarı tırmanma davranışını engellemiş olabilir (Lushchak 2011). Llorente Ortega 2022'nin yaptığı çalışmalarda, çevresel toksinlerin ve oksidatif stresin, larvaların kas ve nöromotor gelişimini etkileyerek dikey hareket kabiliyetini düşürdüğü ve bu nedenle alt bölgelere pupalanma oranının arttığı bildirilmiştir. 1. nesil sonuçları da bu mekanizmayla doğrudan ilişkilendirilebilir. Ek olarak larvalarda proprioseptif algıda bozulma meydana gelmesi durumunda yer çekimi ve yüzey yönelim algısını olumsuz etkileyerek yön bulma yetisini kaybetmesine neden olmaktadır. Yüksek şeker larvaların proprioseptif sinirlerinin bozulmasına neden olduğu daha önceki yapılan çalışmalar doğrultusunda ortaya konmuştur (Tuthill ve Wilson 2016; Agrawal vd. 2020).

Bu deneysel düzende *D. melanogaster*'in 3. nesil larvalarında gözlemlenen pupa pozisyonu dağılımları özellikle yüksek konsantrasyonlu şeker ve kafein dozlarında (2 kat şeker + kafein, 4 kat şeker + kafein) larvaların A, B ve C gibi yüksek bölgelere ulaşmadığı ve pupaların daha çok D, E ve besin yüzeyine (BY) yakın bölgelerde yoğunlaştığı saptanmıştır. Bu durum çevresel stres ve enerji metabolizmasındaki bozulma larvaların tırmanma davranışını etkileyerek pupa bölgesini değiştirdiğini ortaya koymaktadır (Pöttler 2021; Fućak 2023). Strilbytska vd. 2020 tarafından yapılan bir çalışmada *Drosophila*'da glikoz yüklemesi sonrası serbest radikal üretiminin arttığı ve

buna bağlı olarak klasik tırmanma davranışının zayıfladığı dolayısıyla pupa oluşturulan bölgelerin daha alt seviyelerde gerçekleştiği bildirilmiştir. Benzer şekilde Grimes 2020'nin çalışmasında da larvaların oksidatif stres yükü altında motor fonksiyonlarının ve kas aktivitesinin zayıfladığına ve bu durumun özellikle yüksek glikoz koşullarında daha belirgin hale geldiği raporlanmıştır. Bu veriler 3. nesil larvalarının yüksek şeker ve kafein gruplarında A ve B bölgelerinde önemli derecede pupa oluşturmalarının nedenlerinden biri olarak nöromotor bozulmayı öne çıkarmaktadır. Pöttler 2021 tarafından sunulan literatürde *D. melanogaster* bireylerinde, nörolojik disfonksiyonlarının pupa konum tercihini etkilediğini özellikle İstem dışı kas kasılmaları ve enerji metabolizması bozukluğu durumlarında larvaların yüksek bölgelerde pupa oluşturma kapasitesinin düştüğünü göstermektedir. Bu çalışma yüksek şeker ve kafeinin yol açtığı kronik stres altında benzer davranışların gözlemlenmesini destekler niteliktedir. Vps54 proteini hücre içi taşıma ve sinir hücrelerinde düzgün sinaptik işlevlerin sürdürülmesi açısından kritik öneme sahiptir. Hem yüksek şeker hem de yüksek kafein maruziyeti, bu proteinin görev yaptığı sistemleri bozarak nörodejeneratif etkiler veya sinaptik disfonksiyonlara yol açabilir. Wilkinson 2021'in araştırması ise Vps54 proteininin sinir sistemi gelişimi için elzem olduğunu ve eksikliğinde motor işlevlerin bozulduğunu ek olarak pupaların besin mesafesine uzaklığını düşürdüğünü ortaya koymuştur. Bu bağlamda 3. nesilde A bölgesinde hiç pupa oluşumu gözlemlenmediği için anlamlı farkın olmaması, kronik stresin artık gelişimsel olarak aşılması zor bir eşiğe ulaştığını düşündürmektedir. Pupa pozisyon 5. nesil verileri *D. melanogaster* larvalarının yüksek şeker ve kafein dozlarına maruz kalmalarının davranışsal ve fizyolojik açıdan ciddi etkilere neden olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle pupaların A, B ve C gibi üst bölgelerde hiç görülmemesi bireylerin besin yüzeyinden uzaklaşma kapasitesinin azaldığını göstermektedir. Bu davranış değişikliği büyük olasılıkla motor koordinasyon bozukluğu, enerji metabolizmasında mekanizmada çökme ve oksidatif stres birikimi ile ilişkilidir. Nainu vd. (2025) *Drosophila*'da diyabetik model oluşturan yüksek şeker diyeti sonrası oksidatif stresin arttığını, gelişimsel sürenin uzadığını ve larvaların davranışsal sapmalar gösterdiğini bildirmiştir. Aynı şekilde Li vd. (2024) metabolik toksisiteye neden olan bileşiklerin larval gelişimi aksattığını ve mitokondriyal disfonksiyon aracılığıyla enerji üretimini zayıflatıldığını göstermiştir. Ahmed vd. (2022) benzer şekilde metabolik stres faktörlerinin pupalaşma zamanlaması ve yeri üzerinde doğrudan etkili olduğunu ortaya koymuştur. Yüksek toksik yük altındaki larvaların gelişim evrelerinde sapmalar göstererek alt bölgelerde pupalanmaya meyilli oldukları bildirmiştir. Larvaların üst bölgelere ulaşamaması aynı zamanda oksidatif hasarın kas yapısını ve nöromotor ağları zedelemesi ile de açıklanabilir. Strilbytska vd. (2020), bu tarz çevresel yüklerin antioksidan savunma sistemini bozduğunu ve larvaların hareket kabiliyetinde azalma ile sonuçlandığını göstermiştir. Catalani vd. (2021) ise yüksek şekerle beslenen *Drosophila* bireylerinde görsel, nörolojik ve motor bozukluklar dahil birçok davranışsal sorun tanımlamıştır. Özellikle 0,1K ve 0,5K gibi daha düşük kafein konsantrasyonlarında bile pupa konumunun D ve E bölgesine kaymış olması, bu dozların ilerleyen nesillerde birikimli etkiler yarattığını düşündürmektedir. Dahası 2XŞ 0,1K ve 2XŞ 0,5K dozlarında ortaya çıkan çok yüksek istatistiksel fark şekerin kafein ile sinerjik toksisiteye yol açtığını göstermektedir. Sonuç olarak, nesiller ilerledikçe pupa pozisyonundaki yüksekliklerin düşmesi, larvaların gelişimsel stresle başa çıkma kapasitesinin azaldığını; bu kapasite

azalmasının da şeker-kafein kombinasyonlarının sinir sistemi, enerji metabolizması ve motor davranışlar üzerinde oluşturduğu kümülatif hasarla ilişkili olduğunu göstermektedir (Rigo 2024; Tsiamis vd. 2023).

Negatif jeotaksis davranışı, *D. melanogaster*'in çevresel stres faktörlerine duyarlılığını değerlendirmede yaygın biçimde kullanılan bir motor fonksiyon testidir. Bu davranış parametresi özellikle sinir sistemi sağlığı ve enerji metabolizması ile yakından ilişkilidir (Gargano vd. 2005). Çalışmanın 1. nesil verilerine göre kontrol grubunda bireylerin büyük çoğunluğu (25/30) üst tüpe tırmanmayı/uçmayı başarmıştır. Ancak kafein konsantrasyonu arttıkça tırmanan/uçan birey sayısında belirgin azalma gözlemlenmiştir. Bu azalma kafeinin motor sistem üzerinde baskılayıcı etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Şekerin kafein ile birlikte uygulandığı gruplarda ise özellikle 2 kat şekerli kombinasyonlarda bireylerin yalnızca ortalama 13 birey üst tüpe geçebilmiştir. Bu durum yüksek karbonhidrat yükünün motor performans üzerindeki olumsuz etkilerini göstermektedir. Bu bulgular, yüksek şekerli beslenmenin nörodejeneratif süreçleri hızlandırarak motor fonksiyonları bozduğunu gösteren çalışmaları desteklemektedir (Catalani vd. 2021). Anjaneyulu ve Godbole (2024), *Drosophila*'da yaşlanma, şeker yükü ve oksidatif stres arasında güçlü bir ilişki olduğunu ve bu faktörlerin motor davranışları zayıflattığını rapor etmiştir. Portela vd. (2021) ise kafein ve türevlerinin aşırı maruziyetinde mitokondriyal fonksiyonların baskılandığını ve negatif jeotaksis performansının düştüğünü göstermiştir. Yüksek kafein dozlarının tek başına bazı gruplarda kontrole yakın sonuç vermesi, kafeinin doza bağlı çift yönlü etkisine işaret etmektedir. Düşük dozlarda uyarıcı ve nöroprotektif etkiler gösterebilirken yüksek dozlar sistemik boyutta toksisiteye neden olabilmektedir (Huang vd. 2024). *D. melanogaster* bireylerinin 3. nesil kontrol grubundaki erginlerinin büyük çoğunluğunun tüpün üst kısmına ulaşması sağlıklı fizyolojik bütünlüklerinin sürdüğünü gösterirken kafein ve şeker uygulamalarıyla birlikte bu davranışın baskılandığı gözlemlenmiştir. Özellikle 0,5K ve 2XŞ 0,5K dozlarında kontrol grubuna kıyasla bireylerin tüpün üst kısmına geçen birey sayısında istatistiksel olarak yüksek anlamlı fark ortaya konmuştur. Bu sonuç kafein ve şekerin birlikte etkisinin motor koordinasyon fonksiyonları üzerinde engelleyici ya da durdurucu etkiler oluşturduğunu düşündürmektedir. Şekerle birlikte verilen kafein, hem mitokondriyal işlev bozukluğunu hem de oksidatif stres yanıtını artırarak nöromotor kapasiteyi azaltabilmektedir (Chen Wang ve Wei 2024; Huang He vd. 2024). Yüksek kafein seviyelerinin lokomotor performansını zayıflattığı özellikle de oksidatif stresin neden olduğu nörodejeneratif süreçlerde etkili olduğu bildirilmiştir. Chaves vd. (2023) sinaptik fonksiyonların bozulmasının, dopamin azalmasının ve kas gücü kaybının negatif jeotaksis uçuş/tırmanma becerisinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Laranjeira (2021) tarafından yayınlanan farklı bir çalışmada ise yaşlanma sürecinde oksidatif hasarın ve genetik düzeydeki bozulmaların negatif jeotaksisi doğrudan olumsuz yönde etkilediğini vurgulamıştır. Ayrıca Li vd. (2020), orta düzey oksijen yetersizliği ve egzersiz faaliyetleriyle negatif jeotaksis performansında artış sağlanabileceğini ancak metabolik yüklerin bu performansı ciddi biçimde düşürdüğünü ortaya koymuştur. Bu veriler çalışmada yer alan 2 kat şekerin yüksek kafeinle birlikte verildiği dozda görülen en düşük tırmanma/uçuş sonuçlarıyla da örtüşmektedir. Sonuç olarak, bu çalışmada şeker ve kafein dozlarının motor davranış faaliyetleri üzerinde ilk

nesilden itibaren baskılayıcı etkilere neden olduğu ve bu etkinin oksidatif stres, kümülatif toksisite, nöromusküler bozulma enerji tükenmesi ve nörodejeneratif süreçlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

D. melanogaster'de 1. nesilde larvadan ergin oluncaya kadar uygulanan kafein ve şeker dozlarının ergin bireylerin ağırlığı üzerindeki belirgin bir etkisi olduğu görülmüştür. Özellikle düşük kafein dozu (0,1K) bireylerde kontrol grubuna kıyasla daha düşük bir ağırlıkla ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular kafeinin metabolik stres yaratarak enerji metabolizmasını değiştirebileceğini ortaya koymaktadır (Naing vd. 2025). Deney sonucunda 2 kat şeker ile birlikte uygulanan kafein gruplarında erkek bireylerin ağırlıklarında yalnızca kafein uygulanan gruplara kıyasla artış gözlemlenmiştir. Bu bulgu şekerin kafein kaynaklı metabolik baskılanmayı bir miktar kompanse ettiğini düşündürmektedir. Millington vd. (2022), erkek ve dişi bireylerin farklı diyet bileşenlerine karşı farklı fizyolojik yanıtlar verdiğini öne sürmüştür özellikle şeker metabolizmasında cinsiyetler üzerindeki etkinin farklılıklarının olduğunu vurgulamıştır. Buna paralel olarak Carey vd. (2022), protein-karbonhidrat oranlarının yaşam süresi ve üreme kapasitesi üzerindeki etkilerinde erkek ve dişi *Drosophila* bireyleri arasında istatistiksel anlamda önemli farklar gözlemlenmiştir ve bu farklılıkların vücut ağırlığı ile yakından ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Bu bağlamda çalışmamızda gözlemlenen dişi ve erkek bireylerindeki ağırlık farklılıkları; hormonal sistemden, metabolik düzeydeki cinsiyete özgü yanıtlardan, kafein metabolizması farklılıklarından kaynaklandığı öne sürülebilmektedir (Chen vd. 2019). Daha önceki nesillerinde ve üçüncü nesil boyunca yalnızca kafein uygulanan *D. melanogaster* bireylerinde hem erkek hem de dişi bireylerde vücut ağırlıklarının anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç kafeinin metabolik sistem üzerinde uyarıcı etki göstererek enerji rezervlerini hızla tükettiğini bildiren yayınlarla uyumluluk göstermektedir (Harpaz vd. 2017; Nunes vd. 2022). Ayrıca kafein, lipoliz gibi yağ metabolizması yollarını aktive ederek vücut kütlelerinde düşüşe yol açabilir (Chen Kim Young Clark 2019). Özellikle 2XŞ 0,1K dozunda sadece kafein uygulamasına kıyasla hem erkek hem de dişi bireylerde ağırlıkta artış tespit edilmiştir. Belli bir seviyedeki şeker maruziyetinin kafein kaynaklı enerji eksikliğini dengeleyici etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Beckwith ve French (2019), glikoz ve benzeri metabolitlerin sinir sistemi fonksiyonlarında ve enerji dengesinde önemli rol oynadığını ve şekerin davranışsal yanıtları düzenleyebileceğini yayınlamıştır. Dişi bireylerin erkek bireylere kıyasla daha yüksek vücut ağırlığına sahip olması, cinsiyete özgü metabolik adaptasyon, gelişimsel regülasyon, hormon sinyalleme ve besin metabolizması gibi biyolojik mekanizmalara bağlanmaktadır (Videlier vd. 2021; McDonald vd. 2021; Shingleton ve Vea 2023). Chen ve arkadaşları (2019), *Drosophila*'da epigallokateşin gallat (EGCG) gibi biyolojik aktif bileşiklerin erkek ve dişilerde vücut yapısını farklı biçimlerde etkilediğini ve bu farklılığın eşey bağımlı metabolik mekanizmalardan kaynaklandığını ileri sürmüştür. Ayrıca Seidel vd. (2020), *Drosophila*'da mineral dengesinin dahi cinsiyete özgü mekanizmalardan kaynaklı vücut ağırlığını değiştirdiğini belirtmektedir. Ergin ağırlık 5. nesil verileri sonucunda her iki cinsiyet için de kontrole kıyasla yaklaşık 2 kat artış gözlemlenmiştir. En dikkat çekici artış 0,1K konsantrasyonunda meydana gelmiştir. Bu dozda erkek ve dişi bireyler arasındaki ağırlık farkı en aza inmiştir. Düşük doz kafein uygulamasının hormetik etki göstererek

metabolizmayı uyarabileceğini ve bu sayede vücut ağırlığında artış sağlayabileceğini düşündürmektedir (Lewandowska-Wosik ve Chudzińska 2024; Philyaw vd. 2022). 1 ve 3. nesil verilerinde genel olarak uygulanan konsantrasyonlarda erkek ve dişi bireylerde ağırlıkta azalma görülürken 5. nesilde bu durumun tersine dönmesi; metabolik adaptasyon, fizyolojik dengeleme ile açıklanabilir (Bell ve Hellmann 2019; Serra vd. 2024). Ayrıca düşük dozda uygulanan çevresel stres faktörlerinin sonraki nesillerde adaptif bir fizyolojiye neden olduğu da *Drosophila*'da gösterilmiştir (Zhang vd. 2021; Cutler ve Guedes 2017).

Bu çalışmada elde edilen 1. nesil ömür uzunluğu bulguları 1. nesilde kontrol grubundaki bireyler en fazla 50 gün yaşarken, 0,1K kafein verilen gruptaki bireylerin 70 güne kadar yaşadığı tespit edilmiştir. İlave olarak düşük doz kafein uygulamasının (0,1K) yaşam süresini istatistiksel olarak anlamlı şekilde uzattığını buna karşın yüksek doz kafein uygulamasının (0,5K-1K-2K) ömür uzunluğunu azalttığı gözlemlenmiştir. *D. melanogaster* bireylerinde bu tip çift yönlü doz-yanıt etkisi "hormetik etki" olarak adlandırılan biyolojik olgu ile uyumludur. Bu olgu düşük doz stresörlerin hücrel savunma mekanizmalarını aktive ederek organizma üzerinde olumlu etkiler oluşturabileceğini yüksek dozda ise toksisiteye yol açabileceğini öne sürer (Kahraman ve Bilecenoglu 2023; Machado vd. 2021). Kafeinin düşük dozda uygulandığında ömür uzatıcı etkisi mitokondriyal fonksiyonun desteklenmesi, ROS üretim dengesinin düzenlenmesi ve antioksidan enzimlerin aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Berry III 2020; Gospodaryov vd. 2020). Yüksek doz kafein oksidatif stres seviyesini artırarak DNA hasarına, apoptoza ve yaşlanmaya neden olabilir (Tagorti vd. 2024). Bu değerlendirmeler daha önce yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir (Kobayashi vd. 2020; Machado ve Marinello 2021; Özsöz vd. 2022). Bununla birlikte yüksek şekerli diyetlerin ve yüksek doz kafein kombinasyonlarının *D. melanogaster*'de hem gelişimsel hem de hücrel bozulmalara yol açtığı daha önce yapılan yayınlar ile bildirilmiştir (Catalani vd. 2021; Cervantes ve López-Martínez 2022). Ayrıca bu çalışmada yüksek kafein uygulamalarına kıyasla 2 kat şeker içeren düşük kafein dozunun (2XŞ 0,1K) da yaşam süresini uzattığı görülmüştür. 3. nesil deneylerde de benzer bir durumun sürdüğü dikkat çekmektedir. Özellikle 2XŞ 0,5K dozunun bireylerde 70 güne ulaşan maksimum yaşam süresiyle öne çıktığı görülmüştür. Bu sonuçlar dahilinde şekerin sınırlı düzeyde enerji kaynağı olarak kullanılması durumunda metabolik aktivitenin destekleyebileceğine işaret etmektedir. Ancak şeker düzeyi ve kafein miktarı birlikte arttığında bu pozitif etki kaybolmuş ve yaşam süresinde azalma gözlemlenmiştir. Bu durum yüksek şeker tüketiminin glikasyon, insülin sinyal bozukluğu ve mitokondriyal stres gibi mekanizmalarla yaşlanmayı hızlandırabileceğini düşündürmektedir (Costantini 2014; Machado vd. 2021). Üçüncü nesil deneylerinde de benzer bir durumun sürdüğü dikkat çekmektedir. Özellikle 2XŞ 0,5K dozunun bireylerde 70 güne ulaşan maksimum yaşam süresiyle öne çıktığı görülmüştür. Bu sonuçlar, düşük düzeyli stres faktörlerinin faydalı etkilerini tanımlayan hormesis kavramını destekler niteliktedir. Nitekim düşük miktarlarda verilen kafein gibi ajanların hücrel savunma sistemlerini uyararak organizmaya avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir. Ancak dozun artmasıyla birlikte bu sistemler aşırı yük altına girerek koruyucu etki yerine zararlı sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir (Kahraman ve Bilecenoglu, 2023; Khorshidi, 2022). Bu bulgular aşırı

stres faktörünün ve enerji dengesizliğinin hücresele düzeyde telafi edilemeyecek hasarlar doğurabileceğini göstermektedir (Terrerı 2020). Ek olarak ROS artışı ve antioksidan sistemin yetersiz kalması ile açıklanabilmektedir (Berry III 2020). 5. nesil ömür uzunluğu sonuçlarına göre *D. melanogaster* bireylerinde gözlemlenen yaşam süresindeki artış düşük ve yüksek seviyede kafein (0,1K ve 0,5K) ve 2 kat şeker (2XŞ 0,1K, 2XŞ 0,5K) kombinasyonlarının organizma üzerinde olumlu fizyolojik etkiler oluşturduğunu göstermektedir. Özellikle 0,1K ve 2XŞ 0,5K dozlarında kontrol grubuna kıyasla yaşam süresinin daha uzun olduğu tespit edilmesi, kafeinin doz-bağımlı yeniden bifazik etkisini işaret etmektedir (Machado ve Marinello 2021; Özsz vd. 2022). Düşük doz kafein uygulamaları hücresele stres yanıtlarını düzenleyen AMPK ve SIRT1 gibi metabolik yollar üzerinden yaşam süresini uzatabilir (Li vd. 2018). Aynı şekilde şekerin orta düzeyde verilmesi (2XŞ) ile kombine edilen kafein dozlarının da bu pozitif etkiyi artırdığı görülmektedir. Bu bulgu besin bileşenlerinin etkileşimiyle yaşam süresinde sinerjik değişikliklerin meydana gelebileceğini göstermektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda sınırlı kalori alımının ve düşük glikoz seviyelerinin mitokondriyal işlevi artırarak yaşlanma karşıtı etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Fontana vd. 2018; Speakman ve Mitchell 2011).

D. melanogaster bireylerine yönelik gerçekleştirilen iki yönlü besin analizi sonucunda bireylerin 2 kat şeker içeren beslenmeye maruz bırakılmasına rağmen yüksek şekerli besin kaynaklarına yönelim gösterdikleri belirlenmiştir. Bu durumun *Drosophila*'nın tat ve koku reseptör sistemleri aracılığıyla şekere karşı geliştirdiği algısal duyarlılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Glikoz algısında görevli olan *Gr5a* ve *Gr64a* gibi tat alma reseptörlerinin aktive olmasıyla birlikte dopaminerjik nöronlarda ödüllendirici sinyallerin oluşturulduğu ve bu sürecin öğrenme ve besin tercihi üzerinde belirleyici olduğu rapor edilmiştir (Michels vd. 2020). Kafein gibi acı tada sahip bileşiklerin ise *Gr66a* reseptörü aracılığıyla tanındığı ve kaçınma davranışını tetiklediği bilinmektedir (Nesil vd. 2015; Kim vd. 2016; Sanchez-Alcaniz vd. 2018). Tat ve koku reseptörleri, nöron değildir ancak duyuusal nöronlar üzerinde yer alan membran proteinleridir (Dalesio vd. 2018; Marzvanyan ve Alhawaj 2019). Bu reseptörler çevredeki kimyasal maddeleri algılar ve bunu nöronal aksiyon potansiyellerine dönüştürür. Eğer duyu nöronları dejenerasyona uğrarsa (örneğin oksidatif stres, yaşlanma, nörotoksisite nedeniyle), sinaptik iletim bozulursa (örneğin dopamin/glutamat iletiminde bozulma), iyon kanalları veya G-protein yolları işlev kaybederse reseptörler sinyal algılayabilse bile bu bilgi beyindeki hedef bölgelerine (örn. antennal lobe, subesophageal zone) aktarılamaz. Bu da algı bozuklukları, karar verme hataları ve besin tercihinde değişikliklerle sonuçlanmaktadır (Hussain vd. 2018; Golovin vd. 2019; Miroschnikow vd. 2020) Bu hasarın fizyolojik göstergeleri olarak besin tercihlerinde anormallik görülmektedir. *Drosophila* artık tatlı, tuzlu ya da acı gibi doğal olarak kaçındığı ya da tercih ettiği tatlara uygun yanıt veremez kaçınma davranışı dışında tepkiler verebilmektedir (Musso vd. 2019). Tat/koku ayırt etmede azalma gözlemlenebilir aversif (kaçınılması gereken) ve appetitif (çekici) uyaranları ayırt etme kapasitesi azalabilmektedir. Olfaktör/tat kaynaklı davranış azalması görülür. Yüksek şekerli bir besine yönelme azalabilir ya da kaçınılması gereken kafeinli besine yönelim artabilir. Öğrenme ve hafıza bozuklukları olarak kendini gösterebilmektedir. Mushroom body gibi

öğrenmeyle ilişkili merkezler reseptör girdisi alamazsa besin-ödül ilişkisi kurulamamaktadır (Huetteroth vd. 2015; Masek ve Keene 2016; Larnerd vd. 2024). Yapılan deney sonucunda bireylerin kafeinli besinlerden tercihen uzak durdukları ve yalnızca beslenme seçenekleri arasında ikisinin de kafein olduğu ortam sunulduğunda düşük doz kafein içeren seçenekleri tercih ettikleri gözlemlenmiştir. Bu durum düşük dozlarda ödüllendirici etkiler oluşturulabildiğini ancak yüksek dozların caydırıcı yanıtlar doğurduğunu gösteren doz-bağımlı bifazik etki mekanizmasını desteklemektedir (Larnerd vd. 2024). Ek olarak *Drosophila* erginlerinde yapılan deneylerde kafein gibi kaçınılması gereken uyaranlara karşı yönelimi nöroplastisite ve öğrenme süreçlerinin bozulduğunu işaret olabileceği ve bu yönelimin nörolojik temellerinin olduğu düşünülmektedir (Beckwith ve French 2019; Weber vd. 2023).

Ayrıca bireylerin şekere karşı yoğun tercih göstermeleri bu bileşiğin ödül sistemleri üzerindeki etkisinin yalnızca metabolik değil aynı zamanda davranışsal düzeyde de bağımlılığa benzer bir süreci tetiklediğini düşündürmektedir. Şekerli besinlerin öğrenme ve bellek merkezlerinde oluşturduğu olumlu pekiştirme bu tercihlerin sürekliliğini sağlayan bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Zhang 2024; Stewart 2005). Bununla birlikte bireylerin hem yüksek hem düşük doz kafein içeren besinler arasında seçim yapmak durumunda kaldıklarında düşük doz kafeine yönelmelerin nörotoksik etkilerin minimize edilmesine yönelik gelişmiş bir davranışsal adaptasyon olarak yorumlanabilir. Bu yönelim bireylerin enerji ihtiyaçlarını karşılamalarına olanak tanımaktadır (Müller 2020; Mustard vd. 2019). Ayrıca şeker tüketimiyle oluşan metabolik durum hem reseptör düzeyinde duyarlılık değişimi (desensitizasyon) hem de nöronal plastisite ile besin seçim davranışını şekillendirir. Bu bağlamda yüksek şeker alımı dopamin sinyallemede değişiklik yaratabilir ve şeker bağımlılığına benzer bir fenotipe neden olabilir (Musso vd. 2019; May vd. 2020).



6. SONUÇLAR

Bu çalışmada *D. melanogaster* beyin hücreleri kullanılarak yüksek ve normal dozlarda uygulanan şeker (91,41 mg/mL ve 182,81 mg/mL) ile kafein (0,1 mg/mL ve 0,5 mg/mL) kombinasyonlarının nöronal hücreler üzerindeki genotoksik, nörotoksik ve oksidatif etkileri çok yönlü biyokimyasal, hücresel ve davranışsal analizlerle değerlendirilmiştir. Komet testi bulguları, özellikle normal şekerle birlikte uygulanan 0,5 mg/mL kafein dozunun DNA hasarını artırdığını göstermiş; kuyruk uzunluğu, kuyruk DNA yoğunluğu ve kuyruk momenti gibi parametrelerde istatistiksel önemde artışlara yol açmıştır. Bu durum kafeinin yüksek dozlarda potansiyel genotoksik etkiler oluşturabileceğine işaret etmektedir. Literatürde düşük doz kafeinin antioksidan savunmayı desteklediği bildirilmesine karşın (Ikram vd. 2020) çalışmamızdaki sonuçlar doz bağımlı bir toksisiteye dikkat çekmektedir.

Akridin oranj/etidyum bromid boyama sonuçlarında, özellikle yüksek şeker ve yüksek kafein kombinasyonlarında canlı hücre oranlarının azaldığı yani nörotoksik etkilerin belirginleştiği gözlemlenmiştir. İlginç şekilde düşük doz kafein içeren bazı gruplarda canlılık düzeylerinde görece koruyucu bir etki ortaya çıkmıştır. Bu bulgu kafeinin düşük dozda antioksidan yüksek dozda prooksidan olabileceği yönündeki hipotezlerini desteklemektedir (Joshi vd. 2011).

TAS, TOS ve OSİ analizleri, oksidatif dengeyi değerlendirmek açısından önemli bulgular sunmuştur. TOS değerleri dozlar arasında anlamlı farklılık göstermemiş olsa da TAS düzeyleri özellikle normal şeker + 0,5 mg/mL kafein grubunda anlamlı artış göstermiştir. Bu durum oksidatif yük altında hücresel savunma mekanizmalarının devreye girdiğini gösterebilir. Ancak OSİ değerlerindeki değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmaması sistemin hâlen dengeleyici (uyarlayıcı) kapasitesini koruduğunu düşündürmektedir.

Son olarak lipid peroksidasyonu (MDA düzeyi) ölçümlerinde dozlar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu bulgu *Drosophila* beyin hücrelerinde güçlü antioksidan savunma sistemlerinin (SOD, CAT, Prx, GSH) aktif olabileceğini ve lipid peroksidatif hasarın MDA düzeyine ölçülebilir şekilde yansımamış olabileceğini düşündürmektedir (Radyuk vd. 2010). Elde edilen bulgular şeker ve kafein birlikteliğinin sinir sistemi üzerinde doz bağımlı, çok yönlü ve hücresel seviyede karmaşık etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur. Özellikle DNA hasarı, hücre canlılığı ve oksidatif denge parametreleri dikkate alındığında düşük dozlarda potansiyel koruyucu, yüksek dozlarda ise belirgin toksik etkiler gözlemlenmiştir. Bu durum söz konusu maddelerin çift yönlü biyolojik aktivite gösterebildiğini ve bu etkinin hücresel bağlama, konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada kullanılan dozlar, insan beslenmesindeki potansiyel tüketim düzeylerini modelleyebilecek şekilde seçilmiş olsa da bu dozların biyoyararlanım, metabolik dönüşüm ve organlara dağılım gibi fizyolojik faktörlerle ilişkilendirilmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle gelecekteki çalışmaların yalnızca doz aralığı değil, aynı zamanda maruziyet süresi (akut/kronik), uygulama yolu (oral vs. sistemik), metabolit analizi ve biyotransformasyon profilleri açısından da genişletilmesi gerekmektedir.

Ayrıca genotoksisite ve nörotoksisite analizlerinin daha derinlemesine yapılabilmesi için mitokondriyal membran potansiyeli, Kaspaz aktivitesi, Annexin V-FITC/PI apoptoz analizleri, oksidatif DNA onarım enzimleri (*OGG1*, *PARP1* gibi) ve hücrel stres sinyal yolları (örneğin *Nrf2/Keap1*, *p53*, *MAPK*) gibi moleküler belirteçlerin de dahil edilmesi önerilmektedir. Bunlara ek olarak inflamatuvar sitokinler (*TNF- α* , *IL-6*), gliyal hücre aktivasyonu ve nörotransmitter dengesi (örneğin dopamin, glutamat) gibi parametrelerle yapılan analizler hem hücrel hasarın hem de işlevsel sonuçlarının daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster* genetik homojenliği, kısa yaşam döngüsü ve sinir sistemi benzerliği sayesinde bu tip çalışmalar için oldukça uygundur ancak elde edilen sonuçların memeli modeller ve nihayetinde insan hücre kültür sistemleriyle doğrulanması, klinik uygulama potansiyelini artıracaktır.

Tez kapsamında *D. melanogaster* bireylerine uygulanan farklı kafein ve şeker kombinasyonlarının davranışsal parametreler üzerindeki etkileri nesiller arası karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Larval sürünme, negatif jeotaksis, pupa pozisyonu, ömür uzunluğu, larval ve ergin ağırlık gibi çok boyutlu davranış deney sonuçları ile hem doz hem de nesiller düzeyinde belirgin değişiklikler göstermiştir. Bulgular özellikle düşük doz kafein ve orta düzey şeker uygulamalarının bazı davranışsal performansları iyileştirici etkiler gösterebildiğini buna karşılık yüksek doz kombinasyonlarının motor koordinasyon, gelişimsel başarı ve yaşam süresi gibi parametrelerde baskılayıcı etki yarattığını ortaya koymuştur. Nesiller ilerledikçe bazı dozların etkisinin arttığı veya birikimli stres yanıtları nedeniyle fenotipik değişimlerin etkisinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu veriler, hem doz hem de kuşak faktörünün organizma üzerindeki davranışsal yanıtları biçimlendirmede kritik rol oynadığını ve model organizmalarda çevresel stres etkenlerinin uzun vadeli etkilerinin anlaşılmasına katkı sunmaktadır.

İki yönlü besin analizi deney sonucunda *D. melanogaster* bireylerinin yüksek şekerli ortamlara yönelim göstermesi, bu tür besinlere karşı gelişen tercihlerin yalnızca enerji ihtiyacına dayalı değil aynı zamanda tat reseptörleri üzerinden şekillenen bir ödül sistemi ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir (May vd. 2019; Dus vd. 2013). Önceden şekerle beslenmiş olmalarına rağmen yüksek şeker tercihlerinin devam etmesi, bu yönelimin potansiyel bir bağımlılık davranışı ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır (Musso vd. 2019). Kafeinli ortamlarda düşük dozun tercih edilmesi ise yüksek dozun itici etkilerinin daha belirgin olmasıyla açıklanabilir. Bu duyuşsal sistemin kafeine karşı doz-bağımlı duyarlılık geliştirebileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bulgular şekerli besinlere karşı gelişen yönelimin homeostatik değil olası bir ödül ve bağımlılık temelli nörobiyolojik mekanizma ile şekillenmiş olabileceğine işaret etmektedir (Moon vd. 2006; Passeri vd. 2023).

Sonuç olarak bu çalışma şeker ve kafein birlikteliğinin sinir sistemi üzerindeki etkilerini ilk defa çok parametrelili biyobelirteç düzeyinde ortaya koymakla birlikte bu bulguların daha geniş popülasyonlarda, farklı gelişim dönemlerinde ve çeşitli metabolik koşullarda tekrar edilmesi bilimsel geçerlilik açısından kritik öneme sahiptir. Bu kapsamda beslenme kaynaklı nörojenotoksik risklerin daha hassas bir şekilde tanımlanması için çok merkezli disiplinler arası yaklaşımlara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Abalo, R. (2021). Coffee and caffeine consumption for human health. *Nutrients*, 13(9), 2918.
- Abdulbaki, H. H., and Al-Deeb, M. A. 2022. Chlorpyrifos-induced dopaminergic damage in *Drosophila melanogaster* assessed by gene expression, AChE assay, and negative geotaxis using a new feeding device. *Genetics and Molecular Research*, 21(3).
- Abokyi, S., Owusu-Mensah, J., and Osei, K. A. 2017. Caffeine intake is associated with pupil dilation and enhanced accommodation. *Eye and Vision*, 4(1), 1-5.
- Adami, P. V. M., Galeano, P., and Wallinger, M. L. 2017. Worsening of memory deficit induced by energy-dense diet in a rat model of early-Alzheimer's disease is associated to neurotoxic A β species. *Behavioural Brain Research*. 334, 150–160.
- Adibhatla, R. M., and Hatcher, J. F. 2010. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and redox signaling*, 12(1), 125-169.
- Affleck, J. G., and Walker, V. K. 2019. *Drosophila* as a model for developmental toxicology: using and extending the drosophotoxicology model. *Developmental Toxicology: Methods and Protocols*, 139-153.
- Agrawal, S., Dickinson, E. S., Sustar, A., Gurung, P., Shepherd, D., Truman, J. W., and Tuthill, J. C. 2020. Central processing of leg proprioception in *Drosophila*. *eLife*, 9, e60299.
- Ahmed, M. A. I., Vogel, C. F. A., and Malafaia, G. 2022. RETRACTED: Short exposure to nitenpyram pesticide induces effects on reproduction, development and metabolic gene expression profiles in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Akins, J. M. 1991. *Drosophila melanogaster*: An alternative animal for the study of heavy-metal induced neurotoxicity (Master's thesis, The University of Arizona).
- Aldaz, S., Escudero, L. M., and Freeman, M. 2010. Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14217-14222.
- Alfa, R. W., and Kim, S. K. 2016. Using *Drosophila* to discover mechanisms underlying type 2 diabetes. *Disease models and mechanisms*, 9(4), 365-376.
- Ali, Y. O., Escala, W., Ruan, K., and Zhai, R. G. 2011. Assaying locomotor, learning, and memory deficits in *Drosophila* models of neurodegeneration. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (49), 2504.
- Altaany, Z., Alkaraki, A., Abu-Siniyeh, A., Al Momani, W., and Taani, O. 2019. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in thermal sulfurous springs residents. *Heliyon*, 5(11).
- Ames, B. N., Gold, L. S., and Willett, W. C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(12), 5258–5265. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5258>.

- ANaisbett-Jones, L. C., and Lohmann, K. J. 2022. Magnetoreception and magnetic navigation in fishes: A half century of discovery. , *Journal of Comparative Physiology*, 208(3), 201–216.
- Andretic, R., Kim, Y. C., Jones, F. S., Han, K. A., and Greenspan, R. J. 2008. *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20392-20397.
- Anholt, R. R. H. 2020. Chemosensation and evolution of *Drosophila* host plant selection. *Science*. 23(12), 101853. [https://www.cell.com/science/fulltext/S2589-0042\(19\)30545-0](https://www.cell.com/science/fulltext/S2589-0042(19)30545-0).
- Anjaneyulu, J., and Godbole, A. 2025. Small organism models for mode of action research on anti-ageing and nootropic herbs, foods, and formulations. *Nutritional Neuroscience*, 28(6), 744-762.
- Anushree, Ali, M. Z., Bilgrami, A. L., and Ahsan, J. 2023. Acute exposure to arsenic affects pupal development and neurological functions in *Drosophila melanogaster*. *Toxics*, 11(4), 327..
- Apostolopoulou, A. A., Köhn, S., Stehle, B., Lutz, M., Wüst, A., Mazija, L., ... and Thum, A. S. 2016. Caffeine taste signaling in *Drosophila* larvae. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 193.
- Arbeitman, M. N., Furlong, E. E., Imam, F., Johnson, E., Null, B. H., Baker, B. S., ... and White, K. P. 2002. Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 297(5590), 2270-2275.
- Arendash, G. W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E. K., Zacharia, L. C., Cracchiolo, J. R., ... and Tan, J. 2006. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. *Neuroscience*, 142(4), 941-952.
- Arias, A. M. 2008. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. *Drosophila: Methods and Protocols*, 1-25.
- Arking, R., and Wells, R. A. 1990. Genetic alteration of normal aging processes is responsible for extended longevity in *Drosophila*. *Developmental genetics*, 11(2), 141-148.
- Arroyave-Ospina, J. C., Buist-Homan, M., Schmidt, M., and Moshage, H. 2023. Protective effects of caffeine against palmitate-induced lipid toxicity in primary rat hepatocytes is associated with modulation of adenosine receptor A1 signaling. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 165, 114884.
- Arroyave-Ospina, J. C., Wu, Z., Geng, Y., and Moshage, H. 2021. Role of oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: implications for prevention and therapy. *Antioxidants*, 10(2), 174.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, H. R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 209-219.
- Asbah, A., Ummussaadah, U., Parennden, N., Putri, A. S. W., Rosa, R. A., Rumata, N. R., ... and Nainu, F. 2021. Pharmacological effect of caffeine on *Drosophila melanogaster*: A proof-of-concept in vivo study for nootropic investigation. *Archives of Razi Institute*, 76(6), 1645.

- Ashburner, M., and Roote, J. 2007. Culture of *Drosophila*: the laboratory setup. Cold Spring Harbor Protocols, 2007(3), pdb-ip34.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., and Argüelles, S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- Aydın, S., and Dede, B. N. 2016. Enerji İçeceklerinin Sağlık Üzerine Etkilerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (1), 89-127.
- Azevedo, R. B. R., and Partridge, L. 1997. Life-history consequences of egg size in *Drosophila melanogaster*. *The American Naturalist*, 150(2), 250–282.
- Baenas N ve Wagner AE. 2022. *Drosophila melanogaster* as a Model Organism for Obesity and Type-2 Diabetes Mellitus by Applying High-Sugar and High-Fat Diets.
- Baker, K. D., and Thummel, C. S. 2007. Diabetic larvae and obese flies—emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell metabolism*, 6(4), 257-266.
- Bakker, K. 1959. Feeding period, growth, and pupation in larvae of *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2(3), 171–186. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1959.tb00432.x>.
- Banse SA, Jackson EG, Sedore CA, and Onken B. 2024. The coupling between healthspan and lifespan in Caenorhabditis depends on complex interactions between compound intervention and genetic background. *Aging* (Albany NY), 16(4), 1312–1327. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11042945/>.
- Barcelos, R. P., Lima, F. D., Carvalho, N. R., and Bresciani, G. 2020. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutrition*, 79–80, 110863.
- Bartoszek, A., and Fornal, E. 2025. Evaluation of caffeine modulation of topiramate effect on locomotor activity of zebrafish larvae in pentylenetetrazol-induced seizure model. *PloS one*, 20(3), e0317241.
- Basnet, R. M., Zizioli, D., Muscò, A., Finazzi, D., Sigala, S., Rossini, E., ... Memo, M. 2021. Caffeine inhibits direct and indirect angiogenesis in zebrafish embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4856.
- Bauer, J. H., Goupil, S., Garber, G. B., and Helfand, S. L. 2004. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(35), 12980-12985.
- Beamish, C. R., Dey, A., Sarkar, S., and Rand, M. D. 2023. Perspectives for advancing neurotoxicity studies with *Drosophila*. *Current Research in Toxicology*, Advance online publication. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468748023000115>.
- Beckingham, K. M., Armstrong, J. D., Texada, M. J., Munjaal, R., and Baker, D. A. 2005. *Drosophila melanogaster*—the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms. *Gravit Space Biol Bull*, 18(2), 17-29.

- Beckwith EJ, French AS. 2019. Sleep in *Drosophila* and Its Context. *Frontiers in Physiology*, 10, 1167. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01167/full>.
- Beira, J. V., and Paro, R. 2016. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma*, 125, 573-592.
- Bell AM, Hellmann JK. 2019. An integrative framework for understanding the mechanisms and multigenerational consequences of transgenerational plasticity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 50, 97–118. <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-eolsys-110218-024613>.
- Beltramí, M., Medina-Muñoz, M. C., Arce, D., and Godoy-Herrera, R. 2010. *Drosophila* pupation behavior in the wild. *Evolutionary ecology*, 24, 347-358.
- Berni, J., Pulver, S. R., Griffith, L. C., and Bate, M. 2012. Autonomous circuitry for substrate exploration in freely moving *Drosophila* larvae. , *Current Biology*, 22(20), 1861–1870. [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(12\)00873-1](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(12)00873-1).
- Berry R 2020. Hormetic abiotic interactions of stress in insects. PhD Thesis, East Carolina University. <https://search.proquest.com/openview/5f066f9dcd4bb1b7c987259fa9b34e7c>.
- Beulens, J. W. J., Pinho, M. G. M., Abreu, T. C., and den Braver, N. R. 2022. Environmental risk factors of type 2 diabetes—an exposome approach. *Diabetologia*.
- Bhaskara, S., Chandrasekharan, M. B., and Ganguly, R. 2008. Caffeine induction of Cyp6a2 and Cyp6a8 genes of *Drosophila melanogaster* is modulated by cAMP and D-JUN protein levels. *Gene Expression Patterns*, 8(6), 290–296.
- Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., and Ruiz-Albusac, J. M. 2014. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in endocrinology*, 5, 161.
- Bownes, M., and Rembold, H. 1987. The titre of juvenile hormone during the pupal and adult stages of the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Biochemistry*, 164(3), 709–712.
- Brand, M. D. 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*, 45(7-8), 466–472.
- Bustin, S. A., et al. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. , *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), 597–601.
- Butterfield, D. A., and Halliwell, B. 2019. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. , *Nature Reviews Neuroscience*, 20(3), 148–160.
- Butterfield, D. A., Di Domenico, F., and Barone, E. 2014. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(9), 1693-1706.

- Butterworth, F. M., Bodenstein, D., and King, R. C. 1965. Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*. I. An experimental study of larval fat body. *Journal of Experimental Zoology*, 158(2), 141-153.
- Büschges, A., and Ache, J. M. 2025. Motor control on the move: From insights in insects to general mechanisms. *Physiological Reviews*, Advance online publication. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2024>.
- Cabrita, A., Medeiros, A. M., Pereira, T., and Rodrigues, A. S. 2022. Motor dysfunction in *Drosophila melanogaster* as a biomarker for developmental neurotoxicity. *iScience*, 25(10), 104944. [https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042\(22\)00813-6](https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042(22)00813-6).
- Callier, V., and Nijhout, H. F. 2011. Control of body size by oxygen supply reveals size-dependent and size-independent mechanisms of molting and metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35), 14664-14669.
- Camilleri TL 2022. Cross-generational effects of *nutrition* on life history in *Drosophila melanogaster*. PhD Thesis, Monash University. <https://scholar.archive.org/work/ldu5lvipzrgptd6ecb2lj2zpxe>.
- Campos-Ortega, J. A., and Hartenstein, V. 2013. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer.
- Carey MR, Archer CR, Rapkin J, Castledine M. 2022. Mapping sex differences in the effects of protein and carbohydrates on lifespan and reproduction in *Drosophila melanogaster*: Is measuring nutrient intake essential? *Biogerontology*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10522-022-09953-2>.
- Casañas-Sánchez, V., Pérez, J. A., Fabelo, N., Herrera-Herrera, A. V., Fernández, C., Marín, R., ... and Díaz, M. 2014. Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: potential implications in neuroprotection. *Journal of neurochemistry*, 131(4), 470-483.
- Castruita, P. A., Piña-Escudero, S. D., Rentería, M. E., and Yokoyama, J. S. 2022. Genetic, social, and lifestyle drivers of healthy aging and longevity. *Current genetic medicine reports*, 10(3), 25-34.
- Catalani E, Fanelli G, Silvestri F, Cherubini A 2021. Nutraceutical strategy to counteract eye neurodegeneration and oxidative stress in *Drosophila melanogaster* fed with high-sugar diet. *Antioxidants*, 10(8), 1197. <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/8/1197>.
- Cervantes, L., and López-Martínez, G. 2022. Anoxia hormesis following overwintering diapause boosts bee survivorship and adult performance. *Science of the Total Environment*, 802, 149934.
- Chandimali, N., Bak, S. G., Park, E. H., Lim, H. J., Won, Y. S., Kim, E. K., and Lee, S. J. 2025. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discovery*, 11(1), 19.
- Charnpilas, N., Sotiriou, A., Axarlis, K., Tavernarakis, N., and Hoppe, T. 2024. Reproductive regulation of the mitochondrial stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Reports*, 43(6).

- Chatterjee, R. N. 2024. The role of epigenetics in phenotypic evolution: lessons from the genomic response to stresses, genetic conflicts and developmental plasticity in *Drosophila*. *The Nucleus*, 1-14.
- Chaves, N. S. G., Janner, D. E., Poetini, M. R., Fernandes, E. J., de Almeida, F. P., Musachio, E. A. S., ... and Guerra, G. P. 202. β -carotene-loaded nanoparticles protect against neuromotor damage, oxidative stress, and dopamine deficits in a model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 268, 109615.
- Chen, J. C., Wang, R., and Wei, C. C. 2024. Anti-aging effects of dietary phytochemicals: From *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, rodents to clinical studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Chen, P. B., Kim, J. H., Young, L., Clark, J. M., and Park, Y. 2019. Epigallocatechin gallate (EGCG) alters body fat and lean mass through sex-dependent metabolic mechanisms in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(8), 959-969.
- Chen, R., Jiang, H., and Li, Y. Y. 2018. Caffeine degradation by methanogenesis: efficiency in anaerobic membrane bioreactor and analysis of kinetic behavior. *Chemical Engineering Journal*, 334, 444-452.
- Chen, S. Y., Leask, K. P., MacKinnon, S. W., Ramanaden, Y. J., and Yoon, J. H. 2013. The effects of temperature on the time to maturation of *Drosophila melanogaster*. *The Expedition*, 3.
- Chou, V. T., Johnson, S. A., and Van Vactor, D. 2020. Synapse development and maturation at the *Drosophila* neuromuscular junction. , *Neural Development*, 15(1), 5. <https://link.springer.com/article/10.1186/s13064-020-00147-5>.
- Choucroun, P., Gillet, D., Dorange, G., Sawicki, B., and Dewitte, J. D. 2001. Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 478(1-2), 89-96.
- Church, R. B., and Robertson, F. W. 1966. A biochemical study of the growth of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, 162(3), 337-352. <https://doi.org/10.1002/jez.1401620309>.
- Čižmarová, B., Kraus Jr, V., and Birková, A. 2025. Caffeinated Beverages—Unveiling Their Impact on Human Health. *Beverages*, 11(1), 18.
- Clark, A. M., and Clark, E. G. 1968. The genetic effects of caffeine in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 6(2), 227-234.
- Clark, M. 2017. *Neural Basis Of Locomotion In Drosophila melanogaster Larvae* (Doctoral dissertation, University of Oregon).
- Clark, M. Q., Zarin, A. A., Carreira-Rosario, A., and Doe, C. Q. 2018. Neural circuits driving larval locomotion in *Drosophila*. *Neural Development*, 13, 6. <https://doi.org/10.1186/s13064-018-0103-z>.
- Cobb, M., Scott, K., and Pankratz, M. 2009. Gustation in *Drosophila melanogaster*. In L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 1207-1212). *Elsevier*.

- Coelho, A., Fraichard, S., Le Goff, G., Faure, P., Artur, Y., Ferveur, J. F., and Heydel, J. M. 2015. Cytochrome P450-dependent metabolism of caffeine in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, 10(2), e0117328.
- Cohen, S. M. 1993. Imaginal disc development. *The development of Drosophila melanogaster*, 747-841.
- Collins, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249-261.
- Collins, A. R., and Azqueta, A. 2012. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 736(1-2), 122-129.
- Cornelis, M. C., Monda, K. L., Yu, K., Paynter, N., Azzato, E. M., Bennett, S. N., ... and Caporaso, N. E. 2011. Genome-wide meta-analysis identifies regions on 7p21 (AHR) and 15q24 (CYP1A2) as determinants of habitual caffeine consumption. *PLoS genetics*, 7(4), e1002033.
- Corona, J. C. 2020. Role of oxidative stress and neuroinflammation in attention-deficit/hyperactivity disorder. , *Antioxidants* ,9(11), 1039.
- Crabbe, J. C. Jr., and Harris, R. A. 2013. The genetic basis of alcohol and drug actions. In *Behavioral neurobiology of alcohol addiction* (pp. XX–XX). *Springer*.
- Cunha, R. A., and Agostinho, P. M. 2010. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(s1), S95-S116.
- Cutler GC, Guedes RNC. 2017. Occurrence and significance of insecticide-induced hormesis in insects. In *Pesticide Toxicology* (Vol. 1249, pp. 121–139).
- Dalesio, N. M., Barreto Ortiz, S. F., and Pluznick, J. L. 2018. Olfactory, taste, and photo sensory receptors in non-sensory organs: It just makes sense. *Frontiers in Physiology*, 9, 1673.
- Dambrosio, S. M. 1994. Evaluation of the genotoxicity data on caffeine. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Elsevier.
- Dar, W. 2024. Aspartame-induced cognitive dysfunction: Unveiling role of microglia-mediated neuroinflammation and molecular remediation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.
- Darby, A. M., Okoro, D. O., Aredas, S., Frank, A. M., Pearson, W. H., Dionne, M. S., and Lazzaro, B. P. 2024. High sugar diets can increase susceptibility to bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Plos Pathogens*, 20(8), e1012447.
- Das, S., Hegde, S., Wagh, N., Sudhakaran, J., Roy, A. E., Deshpande, G., and Ratnaparkhi, G. S. 2024. Caspar specifies primordial germ cell count and identity in *Drosophila melanogaster*. *Elife*, 13, RP98584.
- Dasgupta, P. K., Bhawal, R. P., Li, Y. H., and Ibraguimov, A. 2014. Cavity-enhanced absorption measurements across broad absorbance and reflectivity ranges. *Analytical Chemistry*, 86(8), 3727-3734.

- Davie, K., Janssens, J., Koldere, D., De Waegeneer, M., Pech, U., Kreft, L., ... and Aerts, S. 2018. A single-cell transcriptome atlas of the aging *Drosophila* brain. *Cell*, 174(4), 982-998.
- De Deus, I. J., Martins-Silva, A. F., Fagundes, M. M. D. A., Paula-Gomes, S., Silva, F. G. D. E., Da Cruz, L. L., ... and De Queiroz, K. B. 2023. Role of NLRP3 inflammasome and oxidative stress in hepatic insulin resistance and the ameliorative effect of phytochemical intervention. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1188829.
- de Farias, N. O., de Sousa Andrade, T., Santos, V. L., Galvino, P., Soares-Rocha, P., Domingues, I., ... and Oliveira, R. 2021. Neuromotor activity inhibition in zebrafish early-life stages after exposure to environmental relevant concentrations of caffeine. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 56(12), 1306-1315.
- De Groef, S., Wilms, T., Balmand, S., Calevro, F., and Callaerts, P. 2021. Sexual dimorphism in metabolic responses to Western diet in *Drosophila melanogaster*. *Biomolecules*, 12(1), 33. <https://doi.org/10.3390/biom12010033>.
- de Groot, M. 2023. Diabetes and depression: strategies to address a common comorbidity within the primary care context. *American Journal of Medicine Open*, 9, 100039.
- de Sotillo, D. V. R., and Hadley, M. 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(12), 717-726.
- Deans C, and Hutchison WD. 2022. Hormetic and transgenerational effects in spotted-wing *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in response to three commonly-used insecticides. *Plos One*.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., and Pellegrini, N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, , Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316–328.
- Demir, F. T., and Demir, E. 2024. In vivo evaluation of the neurogenotoxic effects of exposure to validamycin A in neuroblasts of *Drosophila melanogaster* larval brain. *Journal of Applied Toxicology*, 44(1), e4547. <https://doi.org/10.1002/jat.4547>.
- Demir, S., Nawroth, P. P., Herzig, S., and Ekim Üstünel, B. 2021. Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications. *Advanced Science*, 8(18), 2100275.
- Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., and Apak, R. 2022. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 209, 114477.
- Deniz, A., Taş, F., Tomur, A., and Koç, A. 2015. Kafeinin gebelikteki toksik etkileri. *İbni Sina Tıp Bilimleri Dergisi*, 1(3), 59-63.
- Depetris-Chauvin, A., and Galagovsky, D. 2015. Chemicals and chemoreceptors: Ecologically relevant signals driving behavior in *Drosophila*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3, 41. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2015.00041/full>.

- Dhar, G., Mukherjee, S., Nayak, N., Sahu, S., and Bag, J. 2020. Various behavioural assays to detect the neuronal abnormality in flies. In *Drosophila melanogaster: Methods and Protocols* (pp. 289–297). Springer. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9756-5_18.
- Dienel, G. A. 2018. Brain glucose metabolism: integration of energetics with function. *Physiological reviews*.
- Donado-Pestana, C. M., Pessoa, E. V., Rodrigues, L., Rossi, R., Moura, M. H., dos Santos-Donado, P. R., ... and Genovese, M. I. 2021. Polyphenols of cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg.)) fruit ameliorate insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice. *Food Chemistry*, 340, 128169.
- Dos Santos, E., and Cochemé, H. M. 2024. How does a fly die? Insights into ageing from the pathophysiology of *Drosophila* mortality. *GeroScience*, 46(5), 4003–4015.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., and Pinchuk, I. 2004. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1689(2), 69–76.
- Dragicevic, N., et al. 2012. Caffeine increases mitochondrial function and blocks melatonin signaling to mitochondria in Alzheimer's disease models. , *Neurobiology of Aging* ,33(8), 1823–1831.
- Draper, H. H., and Hadley, M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 421–431). Academic press.
- Dubey, S., and Cary, L. A. 2023. Age-dependent decline in BER gene expression across human brain regions. *Aging Cell*, 22(9), e13789. <https://doi.org/10.1111/accel.13905>
- Duhart, J. C., and Mosca, T. J. 2022. Genetic regulation of central synapse formation and organization in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 221(3), <https://academic.oup.com/genetics/article-abstract/221/3/iyac078/6597078>.
- Dus, M., Ai, M., and Suh, G. S. 2013. Taste-independent nutrient selection is mediated by a brain-specific Na⁺/solute co-transporter in *Drosophila*. *Nature neuroscience*, 16(5), 526–528.
- Dusinska, M., and Collins, A. R. 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1–2), 158–166.
- Eastmond, D. A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W. A., Cimino, M. C., Dobrev, I., ... and Vickers, C. 2009. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 681(2–3), 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.03.003>.
- Ecker, A., do Nascimento Gonzaga, T. K. S., Seeger, R. L., Dos Santos, M. M., Loreto, J. S., Boligon, A. A., ...and Barbosa, N. V. 2017. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 605–616.

- El-Din, M. A. E. S., and Ghareeb, A. E. W. E. 2023. Induction of apoptosis, oxidative stress, hormonal, and histological alterations in the reproductive system of thiamethoxam-exposed female rats. *Environmental Science and Pollution Research*, Advance online publication. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-023-27743-2>.
- Eom, H. J., Liu, Y., Kwak, G. S., Heo, M., Song, K. S., Chung, Y. D., ... and Choi, J. 2017. Inhalation toxicity of indoor air pollutants in *Drosophila melanogaster* using integrated transcriptomics and computational behavior analyses. *Scientific Reports*, 7(1), 46473.
- Erel, O. 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. , *Clinical Biochemistry*, 37(2), 112–119.
- Erel, O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. , *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. , *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81–128.
- Fang, F. C. 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. , *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 820–832.
- Fatima, M. T., Bhat, A. A., Nisar, S., Fakhro, K. A., and Akil, A. S. A. S. 2023. The role of dietary *antioxidants* in type 2 diabetes and neurodegenerative disorders: An assessment of the benefit profile. *Heliyon*, 9(1), e18614.
- Fauzi, A., Zubaidah, S., and Susanto, H. 2020. The study of larva and adult behavior of *Drosophila melanogaster*: Do strains affect behavior?. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2231, No. 1). AIP Publishing.
- Feillet-Coudray, C., Sutra, T., Fouret, G., Ramos, J., Wrutniak-Cabello, C., and Cabello, G. 2009. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. , *Free Radical Biology and Medicine*, 46(5), 624–632.
- Fila, M., Chojnacki, C., Chojnacki, J., and Blasiak, J. 2021. to improve mitochondrial function to reduce brain energy deficit and oxidative stress in migraine. , *Nutrients*, 13(12), 4433.
- Fischer, F. P., Karge, R. A., Weber, Y. G., Koch, H., Wolking, S., and Voigt, A. 2023. *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism to study genetic epilepsies: an overview. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16, 1116000.
- Fishel, M. L., Vasko, M. R., and Kelley, M. R. 2007. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair?. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 614(1-2), 24-36.
- Fisone, G., Borgkvist, A., and Usiello, A. 2004. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61, 857-872.
- Flatt, T. 2020. Life-History Evolution and the Genetics of Fitness Components in *Drosophila melanogaster*., 214(1), 3–22.

- Franco, F. F., and Manfrin, M. H. 2013. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. *Journal of Biogeography*, 40(1), 142-154.
- Franco, R., Martínez-Pinilla, E., and Navarro, G. 2019. Why have transgenic rodent models failed to successfully mimic Alzheimer's disease. How can we develop effective drugs without them?. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(4), 327-330.
- Frank, C. A., Wang, X., Collins, C. A., and Rodal, A. A. 2013. New approaches for studying synaptic development, function, and plasticity using *Drosophila* as a model system. , *The Journal of Neuroscience*, 33(45), 17560–17568. <https://www.jneurosci.org/content/33/45/17560>.
- Franke, S. I. R., Molz, P., Mai, C., and Ellwanger, J. H. 2017. High consumption of sucrose induces DNA damage in male Wistar rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(2), 1359–1367.
- Franks, P. W., and McCarthy, M. I. 2016. Exposing the exposures responsible for type 2 diabetes and obesity. *Science*, 3546308, 69–73.
- Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., and Zvartau, E. E. 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. , *Pharmacological Reviews*, 51(1), 83-133.
- French, A. S., Sellier, M. J., Ali Agha, M. A., Guigue, A., Chabaud, M. A., Reeb, P. D., ... and Marion-Poll, F. 2015. Dual mechanism for bitter avoidance in *Drosophila*. , *Journal of Neuroscience*, 35(9), 3990–4004.
- Fučák, L. 2023. The effect of preferential methamphetamine consumption on lifespan and behavioral phenotypes of *Drosophila melanogaster* (Doctoral dissertation, University of Rijeka. Department of Biotechnology).
- Gardiner, C., Weakley, J., Burke, L. M., Roach, G. D., Sargent, C., Maniar, N., ... and Halson, S. L. (2023). The effect of caffeine on subsequent sleep: A systematic review and meta-analysis. *Sleep medicine reviews*, 69, 101764.
- Gargano, J. W., Martin, I., Bhandari, P., and Grotewiel, M. S. 2005. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 40(5), 386–395.
- Gaschler, M. M., and Stockwell, B. R. 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419-425.
- Ghosh, B. 2020. Neural coding of lactic acid taste in *Drosophila melanogaster* and *Aedes aegypti* [Doctoral dissertation, University of British Columbia]. UBC Library.
- Gillespie, K. M., Kemps, E., White, M. J., and Bartlett, S. E. 2023. The impact of free sugar on human health—a narrative review. *Nutrients*, 15(4), 889.
- Glaser, T., Martins, P., Beco, R., Bento, C. A., Cappellari, A. R., La Banca Oliveira, S., ... and Ulrich, H. 2024. Impairment of adenosine signaling disrupts early embryo development: unveiling the underlying mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1328398.
- Global Burden of Disease 2021 Diabetes Collaborators. 2023. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence

- to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet*, 402, 203–222
- Goddeeris, M. M., Cook-Wiens, E., Horton, W. J., Wolf, H., Stoltzfus, J. R., Borrusch, M., and Grotewiel, M. S. 2003. Delayed behavioural aging and altered mortality in *Drosophila* integrin mutants. *Aging cell*, 2(5), 257–264.
- Golovin, R. M., Vest, J., Vita, D. J., and Broadie, K. 2019. Activity-dependent remodeling of *Drosophila* olfactory sensory neuron brain innervation during an early-life critical period. , *The Journal of Neuroscience*, 39(16), 2995–3010.
- Gospodaryov DV, Strilbytska OM, Semaniuk UV. 2020. Alternative NADH dehydrogenase extends lifespan and increases resistance to xenobiotics in *Drosophila*. *Biogerontology*.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10522-019-09849-8>.
- Gowda, S. B. M., Salim, S., and Mohammad, F. 2021. Anatomy and neural pathways modulating distinct locomotor behaviors in *Drosophila* larva. , *Biology*, 10(2), 90. <https://doi.org/10.3390/biology10020090>.
- Graf, U., and van Schaik, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1), 59–67.
- Grandjean, P., and Landrigan, P. J. 2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The lancet neurology*, 13(3), 330–338.
- Grandjean, P., and Landrigan, P. J. 2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. , *The Lancet Neurology*, 13(3), 330–338. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70278-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70278-3).
- Greaney, M. 2025. To crawl, and feel that one is crawling: Locomotor coordination and proprioception in larval *Drosophila* (Doctoral dissertation, University of Chicago).
- Greco, M., Munir, A., Musarò, D., Coppola, C., and Maffia, M. 2023. Restoring autophagic function: a case for type 2 diabetes mellitus drug repurposing in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1244022.
- Grgic, J., and Mikulic, P. 2021. Acute effects of caffeine supplementation on resistance exercise, jumping, and Wingate performance: no influence of habitual caffeine intake. *European Journal of Sport Science*, 21(8), 1165–1175.
- Grimes KP 2020. miR-137, schizophrenia and sleep regulation in *Drosophila melanogaster* [Doctoral dissertation, Bournemouth University]. <http://eprints.bournemouth.ac.uk/34550/>.
- Grotewiel, M. S., Martin, I., Bhandari, P., and Cook-Wiens, E. 2005. Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Ageing research reviews*, 4(3), 372–397.
- Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., et al. 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química , Nova*, 32(1), 169–174.
- Guest, N. S., VanDusseldorp, T. A., Nelson, M. T., Grgic, J., Schoenfeld, B. J., Jenkins, N. D., ... and Campbell, B. I. (2021). International society of sports nutrition

- position stand: caffeine and exercise performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18(1), 1.
- Güler, E. M., Bektay, M. Y., and Akyıldız, A. G. 2020. Investigation of DNA damage, oxidative stress, and inflammation in synthetic cannabinoid users. *Human and Experimental Toxicology*, 39(12), 1621–1628.
- Güneş, E., and Nizamlioğlu, H. F. 2023. The antioxidant effect of chitosan in *Drosophila* females under oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 181, 113301.
- Güneş, E., and Şensoy, E. 2022. Is Turkish coffee protective in *Drosophila melanogaster* exposed to cadmium? *Chemosphere*, 289, 133201.
- Günther, M. N., Nettesheim, G., and Shubeita, G. T. 2016. Quantifying and predicting *Drosophila* larvae crawling phenotypes. *Scientific Reports*, 6, 27972.
- Gür, Y., Tural, E., and Dayan, A. 2024. Exploring perspectives on cancer screening in people aged 30-70: A comparative study of those with and without type 2 diabetes. *Konuralp Medical Journal*, 16(1), 26-31.
- Gyimah, E., Zhu, X., Zhang, Z., Guo, M., Xu, H., Mensah, J. K., ... and Gyimah, G. N. W. 2022. Oxidative stress and apoptosis in bisphenol AF–induced neurotoxicity in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(9), 2273-2284.
- Han, Y. Y., Forno, E., and Celedón, J. C. 2022. Urinary caffeine and caffeine metabolites, asthma, and lung function in a nationwide study of US adults. *Journal of Asthma*, 59(11), 2127-2134.
- Hanci, M., Bakirci, S., Bayram, S., Karahan, S., and Kaya, E. 2013. Caffeine levels in Turkish coffee and some beverages sold in Turkey. *Duzce Med J*, 15(3), 34-38.
- Handa, J., Chandrashekara, K. T., Kashyap, K., Sageena, G., and Shakarad, M. N. 2014. Gender based disruptive selection maintains body size polymorphism in *Drosophila melanogaster*. *Journal of biosciences*, 39, 609-620.
- Harpaz, E., Tamir, S., and Weinstein, A. 2017. The effect of caffeine on energy balance. , *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28(6), 543–548. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jbcpp-2016-0090/html>.
- Harrison, J. F., Hollensworth, S. B., and Spitz, D. R. 2005. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. , *Nucleic Acids Research*, 33(14), 4660–4671.
- Hart, S. V., Kogan, M., and Paxton, J. D. 1983. Effect of soybean phytoalexins on the herbivorous insects Mexican bean beetle and soybean looper. , *Oecologia*, 60(1), 104–108.
- Heckman, M. A. 2010. Effect of yerba mate tea caffeine and green coffee by-products on in vitro adipogenesis and lipid accumulation and their incorporation into functional beverages (Doctoral dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign).
- Heckscher, E. S., Lockery, S. R., and Doe, C. Q. 2012. Characterization of *Drosophila* larval crawling at the level of organism, segment, and somatic body wall

- musculature. , *Journal of Neuroscience*, 32(36), 12460–12471. <https://www.jneurosci.org/content/32/36/12460>.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
- Hendricks, J. C., Finn, S. M., Panckeri, K. A., Chavkin, J., Williams, J. A., Sehgal, A., and Pack, A. I. 2000. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron*, 25(1), 129-138.
- Henriksen, E. J., and Diamond-Stanic, M. K. 2011. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 993–999.
- Herrero, P. 2012. Fruit fly behavior in response to chemosensory signals. , *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(5), 1188–1200.
- Holsopple, J. M., Smoot, S. R., Popodi, E. M., Colburne, J. K., Shaw, J. R., Oliver, B., ... and Tennesen, J. M. 2023. Assessment of chemical toxicity in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (193), 10-3791.
- Hu, J., Liu, J., Zhu, Y., Diaz-Perez, Z., Sheridan, M., Royer, H., ... and Zhai, R. G. 2020. Exposure to aerosolized algal toxins in South Florida increases short-and long-term health risk in *Drosophila* model of aging. *Toxins*, 12(12), 787.
- Huang, C. Y., Deng, J. S., Huang, W. C., Jiang, W. P., and Huang, G. J. 2020. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by hispolon in mice, through regulating the TLR4/PI3K/Akt/mTOR and Keap1/Nrf2/HO-1 pathways, and suppressing oxidative stress-mediated ER stress-induced apoptosis and autophagy. *Nutrients*, 12(6), 1742.
- Huang, W. H., Kajal, K., Wibowo, R. H., Amartuvshin, O., Kao, S. H., Rastegari, E., ... and Hsu, H. J. 2024. Excess dietary sugar impairs *Drosophila* adult stem cells via elevated reactive oxygen species-induced JNK signaling. *Development*, 151(1).
- Huang, Y., He, M., Zhang, J., Cheng, S., Cheng, X., and Chen, H. 2024. White tea aqueous extract: A potential anti-aging agent against high-fat diet-induced senescence in *Drosophila melanogaster*. *Foods*, 13(24), 4034. <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/24/4034>.
- Hussain, A., Pooryasin, A., Zhang, M., and Loschek, L. F. 2018. Inhibition of oxidative stress in cholinergic projection neurons fully rescues aging-associated olfactory circuit degeneration in *Drosophila*. *eLife*. <https://elifesciences.org/articles/32018>.
- Iacobini, C., Vitale, M., Pesce, C., Pugliese, G., and Menini, S. 2021. Diabetic complications and oxidative stress: A 20-year voyage back in time and back to the future. *Antioxidants*, 10(5), 727.
- Ighodaro, O. M., and Akinloye, O. A. 2018. First line defence *antioxidants*: Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX). , *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293.

- Iheagwam, F. N., Joseph, A. J., Adedoyin, E. D., Iheagwam, O. T., and Ejoh, S. A. 2025. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: Shedding Light on a Widespread Oversight. *Pathophysiology*, 32(1), 9.
- Ikram, M., Park, T. J., Ali, T., and Kim, M. O. 2020. Antioxidant and neuroprotective effects of caffeine against Alzheimer's and Parkinson's disease: Insight into the role of Nrf-2 and A2AR signaling. , *Antioxidants*, 9(9), 902.
- Iliadi, K. G., and Boulianne, G. L. 2010. Age-related behavioral changes in *Drosophila*. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 1197(1), 9-18.
- Iuchi, K., Takai, T., and Hisatomi, H. 2021. Cell death via lipid peroxidation and protein aggregation diseases. *Biology*, 10(5), 399.
- Jafari, A., Naghshi, S., Shahinfar, H., Salehi, S. O., Kiany, F., Askari, M., ... and Azadbakht, L. 2022. Relationship between maternal caffeine and coffee intake and pregnancy loss: A grading of recommendations assessment, development, and evaluation-assessed, dose-response meta-analysis of observational studies. *Frontiers in nutrition*, 9, 886224.
- Jaiswal, A. K. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. , *Free Radical Biology and Medicine*, 36(10), 1199–1207.
- Jakubowski, B. R., Longoria, R. A., and Shubeita, G. T. 2012. A high throughput and sensitive method correlates neuronal disorder genotypes to *Drosophila* larvae crawling phenotypes. , *Fly*, 6(2), 80–87. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/fly.21582>.
- Janion, K., Strzelczyk, J. K., Walkiewicz, K. W., Biernacki, K., Copija, A., Szczepańska, E., and Nowakowska-Zajdel, E. 2022. Evaluation of malondialdehyde level, total oxidant/antioxidant status and oxidative stress index in colorectal cancer patients. *Metabolites*, 12(11), 1118.
- Jeibmann, A., and Paulus, W. 2009. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. , *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2), 407–440.
- Jeppesen, D. K., Bohr, V. A., and Stevnsner, T. 2011. DNA repair deficiency in neurodegeneration. , *Progress in Neurobiology*, 94(2), 166–200.
- Jiang Y, Yan F, Feng Z, Lazarovici P, and Zheng W. 2019. Signaling network of forkhead family of transcription factors (FOXO) in dietary restriction. , *Cells*, 9(1), 100. <https://doi.org/10.3390/cells9010100>.
- Jiang, S., Liu, H., and Li, C. 2021. Dietary regulation of oxidative stress in chronic metabolic diseases. , *Foods*, 10(8), 1854.
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., and Alwasel, S. H. 2023. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and *antioxidants*: Chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97, 879–902.
- Jones, M. A., and Grotewiel, M. 2011. *Drosophila* as a model for age-related impairment in locomotor and other behaviors. *Experimental gerontology*, 46(5), 320-325.
- Joseph, R. M., and Carlson, J. R. 2015. *Drosophila* chemoreceptors: A molecular interface between the chemical world and the brain. , *Trends in Genetics*, 31(12), 683–695. [https://www.cell.com/trends/genetics/abstract/S0168-9525\(15\)00165-1](https://www.cell.com/trends/genetics/abstract/S0168-9525(15)00165-1).

- Joshi, S. G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U. K., Fridman, G., ... and Brooks, A. D. 2011. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(3), 1053-1062.
- Juliano, L. M., and Griffiths, R. R. 2004. A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. , *Psychopharmacology*, 176(1), 1–29..
- Kablan, Ş., and Erdem, N. Z. 2022. Kafeinin Ağırlık Yönetimine Etkileri. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi*, 6(1), 85-90.
- Kahraman, C., Bilecenoglu, D. K., Sabuncuoglu, S., and Cankaya, I. T. 2023. Toxicology of pharmaceutical and nutritional longevity compounds. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 25, e28.
- Karkhanei, B., Ghane, E. T., and Mehri, F. 2021. Evaluation of oxidative stress level: Total antioxidant capacity, total oxidant status and glutathione activity in patients with COVID-19. *Heliyon*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2052297521000615>.
- Kasibhatla, S., and Tseng, B. 2003. Why target apoptosis in cancer treatment? , *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(5), 389–401.
- Kaur, G., Dar, Z. A., Bajpai, A., Singh, R., and Bansal, R. 2024. Clinical Update on an Anti-Alzheimer Drug Candidate CT1812: A Sigma-2 Receptor Antagonist. *Clinical Therapeutics*.
- Kaya, B., Yanikoğlu, A., Creus, A., and Marcos, R. 2000. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 465(1-2), 77-84.
- Keebaugh, E. S., Park, J. H., Su, C., Yamada, R., and Ja, W. W. 2017. Nutrition influences caffeine-mediated sleep loss in *Drosophila*. *Sleep*, 40(11), zsx146.
- Keesey, I. W. 2022. Sensory neuroecology and multimodal evolution across the genus *Drosophila*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 932344. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2022.932344/full>.
- Khan, A., Ikram, M., Muhammad, T., and Park, J. S. 2019. Caffeine modulates cadmium-induced oxidative stress by regulating Nrf2/HO-1 in vivo and in vitro. , *Journal of Clinical Medicine*, 8(5), 680.
- Khorshidi, F. 2022. Brain Cell Viability and the Cellular Adaptive Response (Doctoral dissertation, UNSW Sydney).
- Kim, A. J., Lazar, A. A., and Slutskiy, Y. B. 2011. System identification of *Drosophila* olfactory sensory neurons. *Journal of computational neuroscience*, 30, 143-161.
- Kim, H., Choi, M. S., Kang, K., and Kwon, J. Y. 2016. Behavioral analysis of bitter taste perception in *Drosophila* larvae. *Chemical senses*, 41(1), 85-94.
- King, B. H., and Gunathunga, P. B. 2023. Gustation in insects: Taste qualities and types of evidence used to show taste function of specific body parts. , *Journal of Insect Science*, 23(2), 11. <https://academic.oup.com/jinsectscience/article-abstract/23/2/11/7103289>.

- Klepsatel, P., Knoblochová, D., Girish, T. N., Dircksen, H., and Gáliková, M. 2020. The influence of developmental diet on reproduction and metabolism in *Drosophila*. *BMC evolutionary biology*, 20, 1-15.
- Klevebrant, L., and Frick, A. 2022. Effects of caffeine on anxiety and panic attacks in patients with panic disorder: A systematic review and meta-analysis. *General hospital psychiatry*, 74, 22-31.
- Kobayashi, T., Maruyama, T., Yoneda, T., Miyai, H., Azuma, T., Tomofuji, T., ... and Morita, M. 2020. Effects of coffee intake on oxidative stress during aging-related alterations in periodontal tissue. *in vivo*, 34(2), 615-622.
- Kohsaka, H. 2023. Linking neural circuits to the mechanics of animal behavior in *Drosophila* larval locomotion. *Frontiers in Neural Circuits*, 17, 1175899. <https://doi.org/10.3389/fncir.2023.1175899>.
- Kohsaka, H. 2023. Linking neural circuits to the mechanics of animal behavior in *Drosophila* larval locomotion. *Frontiers in Neural Circuits*, 17, 1175899.
- Kohsaka, H., Guertin, P. A., and Nose, A. 2017. Neural circuits underlying fly larval locomotion. , *Current Pharmaceutical Design*, 23(12), 1836–1848.
- Kolb, H., and Martin, S. 2017. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Medicine*, 15, Article 131.
- Komarov, N., and Sprecher, S. G. 2022. The chemosensory system of the *Drosophila* larva: An overview of current understanding. , *Fly*, 16(1), 26–39. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19336934.2021.1953364>.
- Konopka, A., and Atkin, J. D. 2022. The role of DNA damage in neural plasticity in physiology and neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 836885.
- Konopka, A., Atkin, J. D., and Mitra, J. 2022. Defective DNA damage response–Repair axis in post-mitotic neurons in human health and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 1009760.
- König, M., Hemmers, S., Epro, G., McCrum, C., Ackermans, T. M. A., Hartmann, U., and Karamanidis, K. 2018. Matching participants for triceps surae muscle strength and tendon stiffness does not eliminate age-related differences in mechanical power output during jumping. *Frontiers in physiology*, 9, 1345.
- Krawczyk, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., Wozniak, LA ve Bukowiecka-Matusiak, M. 2023. Polifenollerin diyabetes mellitustaki inflamatuvar ve oksidatif stres faktörleri üzerindeki etkisi: Besleyici antioksidanlar ve antidiyabetik tedaviyi iyileştirmede uygulamaları. *Biyomoleküller*, 13 (9), 1402.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... and Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Kurkela, O., Forma, L., Ilanne-Parikka, P., Nevalainen, J., and Rissanen, P. 2021. Association of diabetes type and chronic diabetes complications with early exit from the labour force: register-based study of people with diabetes in Finland. *Diabetologia*, 64(4), 795-804.

- Kurku, H., and Yavuz, C. 2022. Evaluation of total oxidant status, antioxidant status and oxidative stress index in patients with recurrent aphthous stomatitis. , *Kastamonu Medical Journal*, 8(2), 156–162.
- Lambert, P., and Bingley, P. J. 2002. What is type 1 diabetes?. *Medicine*, 30(1), 1-5.
- Landis, G. N., Doherty, D., and Tower, J. 2020. Analysis of *Drosophila melanogaster* lifespan. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2157). *Springer*.
- Landolt, H. P. 2008. Sleep homeostasis: a role for adenosine in humans?. *Biochemical pharmacology*, 75(11), 2070-2079.
- Laranjeira, A. F. 2021. Characterization of ageing genes in the *Drosophila* nervous system [Doctoral dissertation, KU Leuven]. Lirias Repository. <https://lirias.kuleuven.be/retrieve/615605>.
- Larnerd, C., Kachewar, N., and Wolf, F. W. 2024. *Drosophila* learning and memory centers and the actions of drugs of abuse. , *Learning and Memory*, 31(5), a053815. <https://learnmem.cshlp.org/content/31/5/a053815.short>.
- Lecuit, T., and Cohen, S. M. 1997. Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature*, 3886648, 139–145.
- Lee H, and Lee SJV. 2022. Recent progress in regulation of aging by insulin/IGF-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*. , *Experimental and Molecular Medicine*, 54(11), 1705–1717.
- Lee, S., Liu, H. P., Lin, W. Y., Guo, H., and Lu, B. 2010. LRRK2 kinase regulates synaptic morphology through distinct substrates at the presynaptic and postsynaptic compartments of the *Drosophila* neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience*, 30(50), 16959-16969.
- Lewandowska-Wosik, A., and Chudzińska, E. M. 2024. Genotoxic effects of sub-lethal doses of nicotine and acetamiprid in neuroblasts of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila suzukii*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651324006614>.
- Leyane, T. S., Jere, S. W., and Houreld, N. N. 2022. Oxidative stress in ageing and chronic degenerative pathologies: Molecular mechanisms involved in counteracting oxidative stress and chronic inflammation. , *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7273.
- Li Z, Wang Y, Qin Q, Chen L, Dang X, Ma Z, Zhou Z. 2024. Imidacloprid disrupts larval molting regulation and nutrient energy metabolism, causing developmental delay in honey bee *Apis mellifera*. *eLife*.
- Li, J. 2025. Organization and processing of gustatory information in the *Drosophila* brain [Doctoral dissertation, University of British Columbia]. UBC Library.
- Li, J., Sun, S., Li, Y., Tian, M., Li, X., Ren, S., ... and Du, S. 2025. Nrf2 Signaling Pathway Studies in *Drosophila melanogaster*: Parallel Roles in Human Health and Insect Environmental Responses. *Xenobiotica*, (just-accepted), 1-30.
- Li, P., Stetler, R. A., Leak, R. K., Shi, Y., Li, Y., and Yu, W. 2018. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology*, 134, 208–217.

- Li, Q. F., Wang, H., Zheng, L., Yang, F., Li, H. Z., and Li, J. X. 2020. Effects of modest hypoxia and exercise on cardiac function, sleep-activity, negative geotaxis behavior of aged female *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*, 10, 1610. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01610>.
- Li, Y., Zhao, T., Li, J., Xia, M., Li, Y., and Wang, X. 2022. Oxidative stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the pathogenesis and treatment of aging-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2233906. <https://doi.org/10.1155/2022/2233906>.
- Liao, S., and Nässel, D. R. 2020. *Drosophila* insulin-like peptide 8 (DILP8) in ovarian follicle cells regulates ovulation and metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 461.
- Lima, J. E., Moreira, N. C., and Sakamoto-Hojo, E. T. 2022. Mechanisms underlying the pathophysiology of type 2 diabetes: From risk factors to oxidative stress, metabolic dysfunction, and hyperglycemia. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 874, 503437.
- Liman, P. B., Anastasya, K. S., Salma, N. M., Yenny, Y., and Faradilla, M. A. 2022. Research trends in advanced glycation end products and obesity: Bibliometric analysis. *Nutrients*, 14(24), 5255.
- Lin, F. J., Pierce, M. M., Sehgal, A., Wu, T., Skipper, D. C., and Chabba, R. 2010. Effect of taurine and caffeine on sleep–wake activity in *Drosophila melanogaster*. *Nature and science of sleep*, 221-231.
- Lind, S. F., Stam, F., Zellerroth, S., Meurling, E., Frick, A., and Grönbladh, A. 2023. Acute caffeine differently affects risk-taking and the expression of BDNF and of adenosine and opioid receptors in rats with high or low anxiety-like behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 227, 173573.
- Linford, N. J., Bilgir, C., Ro, J., and Pletcher, S. D. 2013. Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (71), 50068.
- Liu CH, Chen MY, Cheng J, Chuang TN 2022. ...and Desensitizes Mechanosensitive, Nociceptive, and Photogenic Response of *Drosophila melanogaster* by Mediating Oxidative Stress. , *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 10181. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/10181>.
- Liu, S., Pi, J., and Zhang, Q. 2022. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. *Redox biology*, 54, 102389.
- Liu, X., Vinson, D., Abt, D., Hurt, R. H., and 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 and technology*, 43(16), 6357-6363.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. , *Methods*, 25(4), 402–408.
- Loreto, J. S., Ferreira, S. A., Ardisson-Araújo, D. M., and Barbosa, N. V. 2021. Human type 2 diabetes mellitus-associated transcriptional disturbances in a high-sugar diet long-term exposed *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 39, 100866.

- Lushchak, O. V., Strilbytska, O. M., Koliada, A. K., Storey, J. M., Storey, K. B., and Lushchak, V. I. 2011. *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate differences in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 160(1), 27–34.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals., *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30.
- Machado, K. L., Marinello, P. C., and Silva, T. N. X. 2021. Oxidative stress in caffeine action on the proliferation and death of human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. , *Nutrition and Cancer*, 73(8), 1349–1359. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1795693>.
- Maciejczyk, M., Żebrowska, E., and Chabowski, A. 2019. Insulin resistance and oxidative stress in the brain: What's new? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 874.
- Mack, J. O., and Zhang, Y. V. 2021. A rapid food-preference assay in *Drosophila*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (168), 10-3791.
- Malhan, S., Öksüz, E., Babineaux, S. M., Ertekin, A., and Palmer, J. P. 2014. Assessment of the Direct Medical Costs of Type 2 Diabetes Mellitus and its Complications in Turkey. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 18(2).
- Manalo, R. V., and Medina, P. M. 2018. Caffeine protects dopaminergic neurons from dopamine-induced neurodegeneration via synergistic adenosine-dopamine D2-like receptor interactions in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in neuroscience*, 12, 137.
- Manchanayake, J., Chitturi, S., and Nolan, C. 2011. Postprandial hyperinsulinemia is universal in non-diabetic patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(2), 282–287. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1440-1746.2010.06528.x>
- Manjila, S. B., and Hasan, G. 2018. Flight and climbing assay for assessing motor functions in *Drosophila*. *Bio-protocol*, 8(5), e2742-e2742.
- Mannix, D., Mulholland, K., and Byrne, F. 2024. Caffeine-Induced Psychosis: A Case Report and Review of Literature. *Cureus*, 16(8).
- Mansourian, S. 2018. *Drosophila* Sensory Neuroethology. Lund University.
- Marcos, R., and Carmona, E. R. 2013. The wing-spot and the comet tests as useful assays detecting genotoxicity in *Drosophila*. In *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols* (pp. 417-427). Totowa, NJ: Humana Press.
- Marcus, S. R., and Fiumera, A. C. 2016. Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 91, 18-25.
- Marella, S., Mann, K., and Scott, K. 2012. Dopaminergic modulation of sucrose acceptance behavior in *Drosophila*. , *Neuron*, 73(5), 941–950.
- Markow, T. A., and O'Grady, P. 2005. *Drosophila*: a guide to species identification and use. *Elsevier*.

- Martelli F, Hernandez NH, Zuo Z, Wang J, and Wong CO. 2022. Low doses of the organic insecticide spinosad trigger lysosomal defects, elevated ROS, lipid dysregulation, and neurodegeneration in flies. *eLife*. <https://elifesciences.org/articles/73812>.
- Martins, R. S., Rombo, D. M., Gonçalves-Ribeiro, J. F., and Sebastião, A. M. 2020. Caffeine has a dual influence on NMDA receptor-mediated glutamatergic transmission at the hippocampus. *Neuropharmacology*, 179, 108285.
- Marzvanyan, A., and Alhawaj, A. F. 2019. Physiology, sensory receptors. StatPearls Publishing.
- Mas-Bargues, C., Escriva, C., Dromant, M., Borrás, C., and Vina, J. 2021. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of biochemistry and biophysics*, 709, 108941.
- Masek, P., and Keene, A. C. 2016. Gustatory processing and taste memory in *Drosophila*. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 55, 34–40.
- Mastrocola, R., Nigro, D., Cento, A. S., and Chiazza, F. 2016. High-fructose intake as risk factor for neurodegeneration: Key role for carboxymethyllysine accumulation in mice hippocampal neurons. *Neurobiology of Disease*, 91, 74–85.
- Mateo-Fernández, M. 2019. In vivo and in vitro biological activity of cola beverages and different additives [Master's thesis, University of Córdoba]. Helvia Repositorio Institucional.
- Mateo-Fernández, M., Valenzuela-Gómez, F., and Font, R. 2021. In vivo and in vitro assays evaluating the biological activity of taurine, glucose and energetic beverages. , *Molecules*, 26(8), 2198.
- Mattila, J., and Hietakangas, V. 2017. Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 207(4), 1231-1253.
- Mattson, M. P. 2009. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Experimental Gerontology*, 44(1–2), 3–9. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556509001405>.
- May, C. E., Rosander, J., Gottfried, J., Morgan, E. E., and Dus, M. 2020. High dietary sugar reshapes sweet taste to promote feeding behavior in *Drosophila melanogaster*. , *Cell Reports*, 31(1), 107484.
- May, C. E., Vaziri, A., Lin, Y. Q., Grushko, O., Khabiri, M., Wang, Q. P., ... and Dus, M. 2019. High dietary sugar reshapes sweet taste to promote feeding behavior in *Drosophila melanogaster*. *Cell reports*, 27(6), 1675-1685.
- Mazzoli, A., Spagnuolo, M. S., Nazzaro, M., Gatto, C., Iossa, S., and Cigliano, L. 2021. Fructose removal from the diet reverses inflammation, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in hippocampus. *Antioxidants*, 10(3), 487.
- McDonald, J. M. C., Nabili, P., Thorsen, L. ve Jeon, S. 2021. Sex-specific plasticity and the nutritional geometry of insulin-signaling gene expression in *Drosophila melanogaster*. , *Biological Research*, 54(1), 14.

- Memis, I., Mittal, R., Furar, E., White, I., Eshraghi, R. S., Mittal, J., and Eshraghi, A. A. 2022. Altered blood brain barrier permeability and oxidative stress in Cntnap2 knockout rat model. *Journal of clinical medicine*, 11(10), 2725.
- Michels, B., Franke, K., and Weiglein, A. 2020. Rewarding compounds identified from the medicinal plant *Rhodiola rosea*. , *Journal of Experimental Biology*, 223(16), jeb223982. <https://doi.org/10.1242/jeb.223982>.
- Millington JW, Biswas P, Chao C, Xia YH. 2022. A low-sugar diet enhances *Drosophila* body size in males and females via sex-specific mechanisms. , *Development*, 149(6). <https://journals.biologists.com/dev/article-abstract/149/6/dev200491/274854>.
- Min, H., Lee, M., Kang, S., and Shim, Y. H. 2023. Vitamin B12 Supplementation Improves Oocyte Development by Modulating Mitochondria and Yolk Protein in a Caffeine-Ingested *Caenorhabditis elegans* Model. *Antioxidants*, 13(1), 53.
- Miners, J. O., and Birkett, D. J. 1996. The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. *General pharmacology*, 27(2), 245-249.
- Mironova, E. V., Evstratova, A. A., and Antonov, S. M. 2007. A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. , *Journal of Neuroscience Methods*, 163(1), 1–8.
- Miroschnikow, A., Schlegel, P., and Pankratz, M. J. 2020. Making feeding decisions in the *Drosophila* nervous system. , *Current Biology*, 30(17), R993–R1004.
- Mirth, C. K., and Riddiford, L. M. 2007. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioessays*, 29(4), 344-355.
- Mirth, C., Truman, J. W., and Riddiford, L. M. 2005. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 15(20), 1796–1807.
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., and Valenza, A. M. 2019. *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Frontiers in Genetics*, 10, 51.
- Mishra, D., Miyamoto, T., Rezenom, Y. H., Broussard, A., Yavuz, A., Slone, J., ... and Amrein, H. 2013. The molecular basis of sugar sensing in *Drosophila* larvae. *Current Biology*, 23(15), 1466-1471.
- Mishra, M., Panda, P., Barik, B. K., Mondal, A., and Panda, M. 2023. *Drosophila melanogaster* as an indispensable model to decipher the mode of action of neurotoxic compounds. *ResearchGate*.
- Moldogazieva, N. T., Mokhosev, I. M., Mel'nikova, T. I., Porozov, Y. B., and Terentiev, A. A. 2019. Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products in aging and age-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 3085756. <https://doi.org/10.1155/2019/3085756>.
- Møller, P. 2006. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, 98(4), 336-345.

- Montgomery, S. L., Vorojeikina, D., Huang, W., Mackay, T. F., Anholt, R. R., and Rand, M. D. 2014. Genome-wide association analysis of tolerance to methylmercury toxicity in *Drosophila* implicates myogenic and neuromuscular developmental pathways. *Plos one*, 9(10), e110375.
- Moon, S. J., Köttgen, M., Jiao, Y., Xu, H., and Montell, C. (2006). A taste receptor required for the caffeine response in vivo. *Current biology*, 16(18), 1812–1817.
- Moon, S. J., Köttgen, M., Jiao, Y., Xu, H., and Montell, C. 2009. A taste receptor required for the caffeine response in vivo. , *Current Biology*, 19(10), 833–838.
- Morais, S., Angotzi, A. R., Cerdá-Reverter, J. M., and Rosel, J. F. 2019. Evaluating feed discrimination in seabream (*Sparus aurata*) using a dual-choice self-feeding system. Digital CSIC.
- Moreira, A. R., Batista, R. F., Ladeira, L. L., Thomaz, E. B., Alves, C. M., Saraiva, M. C., ... and Ribeiro, C. C. 2021. Higher sugar intake is associated with periodontal disease in adolescents. *Clinical Oral Investigations*, 25, 983–991.
- Morsy, M. M., Ahmed, R. G., and Abdel-Gabbar, M. (2024). Nano-Curcumin improves caffeine-induced cerebral alterations in male Wistar rats by modifying oxidative stress, inflammation, and COX-2/NF-κB/Nrf2 signaling. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 13(1), 93.
- Motor, S., Ozturk, S., and Ozcan, O. 2014. Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in patients with alopecia areata. , *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(4), 1089–1093.
- Moulin TC, Ferro F, Hoyer A, and Cheung P. 2021. The *Drosophila melanogaster* Levodopa-Induced Depression Model Exhibits Negative Geotaxis Deficits and Differential Gene Expression in Males and Females. *Frontiers in Neuroscience*, 15, Article 653470. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.653470>.
- Mukherjee, R. 2020. Neuromechanics of proleg grip-release and strike behavior in caterpillar *Manduca sexta* [Doctoral dissertation, University of North Texas]. ProQuest Dissertations Publishing.
- Musselman, L. P., Fink, J. L., Narzinski, K., Ramachandran, P. V., Hathiramani, S. S., Cagan, R. L., and Baranski, T. J. 2011. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. , *Disease Models and Mechanisms*, 4(6), 842–849.
- Musso, P. Y., Junca, P., Jelen, M., Feldman-Kiss, D., Zhang, H., Chan, R. C., and Gordon, M. D. 2019. Closed-loop optogenetic activation of peripheral or central neurons modulates feeding in freely moving *Drosophila*. *Elife*, 8, e45636.
- Mustard, J. A., Oquita, R., Garza, P., and Stoker, A. 2019. Honey bees (*Apis mellifera*) show a preference for the consumption of ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 43(1), 26–35.
- Müller, J. J., Antonow-Schlorke, I., Kroegel, N., Rupprecht, S., Rakers, F., Witte, O. W., and Schwab, M. 2020. Cardiovascular effects of prenatal stress—are there

- implications for cerebrovascular, cognitive and mental health outcome?. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 117, 78-97.
- Na, J., Musselman, L. P., Pendse, J., Baranski, T. J., Bodmer, R., Ocorr, K., and Cagan, R. 2013. A *Drosophila* model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS genetics*, 9(1), e1003175.
- Nagpal, I., and Abraham, S. K. 2019. Coffee mitigates cyclophosphamide-induced genotoxic damage in *Drosophila melanogaster* germ cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(5), 502-508.
- Naing SS, Fujioka H, Matsuura T, Miyatake T. 2025. Effects of caffeine on the longevity and locomotion activity of the common green bottle fly, *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Applied Entomology and Zoology*.
- Nainu, F., Bahar, M. A., Habibie, H., Najib, A., Zubair, M. S., Arba, M., ... and Putri, A. A. 2025. Exploring the antidiabetic potential of Sulawesi ethnomedicines: A study of *Cordia myxa* and *Syzygium malaccense* in a *Drosophila* model of hyperglycemia. *Narra Journal*, 5(1), e1712-e1712.
- Naisbett-Jones, L. C., and Lohmann, K. J. 2022. Magnetoreception and magnetic navigation in fishes: a half century of discovery. *Journal of Comparative Physiology A*, 208(1), 19-40.
- Nall, A. H., Shakhmantsir, I., Cichewicz, K., Birman, S., Hirsh, J., and Sehgal, A. 2016. Caffeine promotes wakefulness via dopamine signaling in *Drosophila*. *Scientific reports*, 6(1), 20938.
- Nandhakumar, S., and Parasuraman, S. 2011. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). , *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2(2), 107–111.
- Narasimha, S., Kolly, S., Sokolowski, M. B., Kawecki, T. J., and Vijendravarma, R. K. 2015. Prepupal building behavior in *Drosophila melanogaster* and its evolution under resource and time constraints. *PLoS One*, 10(2), e0117280.
- Narciso, L., Parlanti, E., Racaniello, M., and Simonelli, V. 2016. The response to oxidative DNA damage in neurons: Mechanisms and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, Article ID 3619274.
- Nässel, D. R., and Broeck, J. V. 2016. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 271-290.
- Neamtu AA, Szoke-Kovacs R, Mihok E, Georgescu C 2020. Comparative analysis of antioxidant capacity and metabolic rescue effects in *Drosophila melanogaster* on high-sugar diet. , *Antioxidants*, 9(11), 1067. <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/11/1067>.
- Negre-Salvayre, A., Augé, N., Ayala, V., Basaga, H., et al. 2010. Pathological aspects of lipid peroxidation. , *Free Radical Research*, 44(10), 1125–1171. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.498478>.
- Nehlig, A. 2016. Effects of coffee/caffeine on brain health and disease: What should I tell my patients?. *Practical neurology*, 16(2), 89-95.

- Nehlig, A., Daval, J. L., and Debry, G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. , *Brain Research Reviews*, 17(2), 139–170.
- Nesil, T., Kanit, L., and Pogun, S. 2015. Bitter taste and nicotine preference: Evidence for sex differences in rats. , *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 41(2), 150–159.
- Neville, M., and Goodwin, S. F. 2012. Genome-wide approaches to understanding behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Briefings in Functional Genomics*, 11(5), 395–404.
- Newsholme, P., Cruzat, V., Keane, K. N., Carlessi, R., and de Bittencourt, P. I. H. 2016. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. , *Biochemical Journal*, 473(24), 4527–4550.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., and Pickett, C. B. 2003. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. Annual review of pharmacology and toxicology, 43(1), 233-260.
- Ni, J., Wang, P., Zheng, T., Lv, L., and Peng, H. 2021. Consumption of coffee and risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Frontiers in Nutrition*, 8, 739359.
- Nichols, C. D., and Becnel, J. 2012. Methods to assay *Drosophila* behavior. *Journal of Visualized Experiments*, (61), e3795.
- Niedergerke TA, Bilhorn LE 2022. The effect of anesthetic agents on oxidative stress in *Drosophila melanogaster* restricted to a high glucose diet. Dissertation, University of Missouri.
- Nigra, A. D., Teodoro, A. J., and Gil, G. A. 2021. A decade of research on coffee as an anticarcinogenic beverage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1), 4420479.
- Nikitin, A. G., and Navitskas, S. 2008. Effect of varying doses of caffeine on life span of *Drosophila melanogaster*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(2), 149–152.
- Nikitin, A. G., Navitskas, S., and Nicole Gordon, L. A. 2008. Effect of varying doses of caffeine on life span of *Drosophila melanogaster*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(2), 149-150.
- Niu, R. C., Zeng, Q. H., Wang, W. J., and Wang, Y. J. 2025. Knockout of silk fibroin genes in *Plutella xylostella* results in decreased fitness and performance. *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.8852>.
- Njeim, R., Alkhansa, S., and Fornoni, A. 2023. Unraveling the crosstalk between lipids and NADPH oxidases in diabetic kidney disease. *Pharmaceutics*, 15(5), 1360.
- Nowak, K., Zabczyk, M., Natarska, J., Zalewski, J., and Undas, A. 2024. Elevated plasma protein carbonylation increases the risk of ischemic cerebrovascular events in patients with atrial fibrillation: association with a prothrombotic state. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 57(7), 1206-1215.

- Nunes, B., Santos, J., and Dionísio, R. 2022. Investigation of potential behavioral and physiological effects of caffeine on *D. magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 66545–66556.
- O'Grady, P. M., and DeSalle, R. 2018. Phylogeny of the Genus *Drosophila*. *Genetics*, 209(1), 1–25. <https://academic.oup.com/genetics/article-abstract/209/1/1/5930949>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. , *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.
- Okur, M. E., Karantas, I. D., and Siafaka, P. I. 2017. Diabetes Mellitus: a review on pathophysiology, current status of oral pathophysiology, current status of oral medications and future perspectives. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 55(1).
- Olive, P. L., and Banáth, J. P. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. , *Nature Protocols*, 1(1), 23–29.
- Onat, A., Çakır, H., Karadeniz, Y., Dönmez, İ., Karagöz, A., Yüksel, M., and Can, G. 2014. Turkish Adult Risk Factor survey 2013: rapid rise in the prevalence of diabetes. *Türk Kardiyoloji Dernegi Arsivi: Turk Kardiyoloji Derneginin Yayin Organidir*, 42(6), 511-516.
- Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H., and Baeg, G. H. 2015. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396–403.
- Orr, W. C., Radyuk, S. N., Prabhudesai, L., Toroser, D., Benes, J. J., Luchak, J. M., ... and Sohal, R. S. 2005. Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37331-37338.
- Ortega, L. L. (2022). Characterisation of environmental stress biomarkers in *Prodiamesa olivacea* (Diptera) and their analysis and comparative evaluation in two chironomid species for ecotoxicity studies in natural scenarios (Doctoral dissertation, UNED. Universidad Nacional de Educación a Distancia).
- Ösz, B. E., Jîtcă, G., Ştefănescu, R. E., and Puşcaş, A. 2022. Caffeine and its antioxidant properties—It is all about dose and source. , *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13074.
- Pankoke, H., Gehring, R., and Müller, C. 2015. Impact of the dual defence system of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) on performance, nutrient utilisation and feeding choice behaviour of *Amata mogadorensis*. *Journal of Insect Physiology*, 83, 34–44.
- Park, S. Y., Karantenislis, G., Rosen, H. T., and Sun, H. 2023. Effects of energy drinks on myogenic differentiation of murine C2C12 myoblasts. *Scientific reports*, 13(1), 8481.
- Parker, E. D., Lin, J., Mahoney, T., Ume, N., Yang, G., Gabbay, R. A., ... and Bannuru, R. R. 2024. Economic costs of diabetes in the US in 2022. *Diabetes care*, 47(1), 26-43.
- Pasco, M. Y., and Léopold, P. 2012. High sugar-induced insulin resistance in *Drosophila* relies on the lipocalin Neural Lazarillo. *PloS one*, 7(5), e36583.

- Passeri, A., Municchi, D., Cavalieri, G., Babicola, L., Ventura, R., and Di Segni, M. 2023. Linking drug and food addiction: an overview of the shared neural circuits and behavioral phenotype. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 17, 1240748.
- Penetar, D., McCann, U., Thorne, D., Kamimori, G., Galinski, C., Sing, H., ... and Belenky, G. 1993. Caffeine reversal of sleep deprivation effects on alertness and mood. *Psychopharmacology*, 112, 359-365.
- Pereira-Figueiredo, D., Nascimento, A. A., Cunha-Rodrigues, M. C., Brito, R., and Calaza, K. C. 2021. Caffeine and its neuroprotective role in ischemic events: a mechanism dependent on adenosine receptors. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1-33.
- Peterson, E. K., and Long, H. E. 2018. Experimental protocol for using *Drosophila* as an invertebrate model system for toxicity testing in the laboratory. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (137), 57450.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper. , *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–515.
- Phillips, J. P., Campbell, S. D., Michaud, D., Charbonneau, M., and Hilliker, A. J. 1989. Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. , *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2761–2765.
- Philyaw TJ, Rothenfluh A, Titos I. 2022. The use of *Drosophila* to understand psychostimulant responses. , *Biomedicines*, 10(1), 119.
- Pitkänen, O. M., Martin, J. M., Hallman, M., Åkerblom, H. K., Sariola, H., and Andersson, S. M. 1992. Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life sciences*, 50(5), 335-339.
- Podratz, J. L., Staff, N. P., Froemel, D., Wallner, A., Wabnig, F., Bieber, A. J., ... and Windebank, A. J. 2011. *Drosophila melanogaster*: a new model to study cisplatin-induced neurotoxicity. *Neurobiology of disease*, 43(2), 330-337.
- Polak, M., Starmer, W. T., and Wolf, L. L. 2004. Sexual selection for size and symmetry in a diversifying secondary sexual character in *Drosophila bipectinata* Duda (Diptera: Drosophilidae). *Evolution*, 58(3), 597-607.
- Polat, N., Beyaztaş, H., Aktaş, S., Maden, Ö., and Güler, E. M. 2023. Comparison of oxidative stress parameters, thiol-disulfide homeostasis, and pro-inflammatory cytokines levels in patients with bipolar disorder and their first-degree relatives. *Journal of Psychiatric Research*, 162, 103–112.
- Ponton, F., Morimoto, J., Robinson, K., Kumar, S. S., Cotter, S. C., Wilson, K., and Simpson, S. J. 2020. Macronutrients modulate survival to infection and immunity in *Drosophila*. *Journal of Animal Ecology*, 89(2), 460-470.
- Portela, J. L., Bianchini, M. C., Roos, D. H., and de Ávila, D. S. 2021. Caffeic acid and caffeine attenuate toxicity associated with malonic or methylmalonic acid exposure in *Drosophila melanogaster*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394, 227–238.

- Pöttler, M. 2021. Developing new *Drosophila* models to understand dystonia pathogenesis.
- Prada, M., Saraiva, M., Garrido, M. V., Sérgio, A., Teixeira, A., Lopes, D., ... and Rodrigues, D. L. 2022. Perceived associations between excessive sugar intake and health conditions. *Nutrients*, 14(3), 640.
- Prüssing, K., Voigt, A., and Schulz, J. B. 2013. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. , *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 35.
- Puchol, S., Leal, E., Angotzi, R., Rosel, J., and Morais, S. 2022. Dietary discrimination using a dual-choice self-feeding system in seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 559, 738431.
- Qiagen. (n.d.). RT² Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 Handbook.
- Qiagen. (n.d.). RT² Profiler™ PCR Array Human Neurotoxicity. GeneGlobe. <https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/rt2-profiler-pcr-arrays/PAHS-096Z>. Son Erişim Tarihi :13.06.2025.
- Qian, J., Zhang, Y., Qu, Y., Zhang, L., Shi, J., Zhang, X., ... and Zhang, Y. 2018. Caffeine consumption during early pregnancy impairs oviductal embryo transport, embryonic development and uterine receptivity in mice. *Biology of reproduction*, 99(6), 1266-1275.
- Qin, N., Geng, A., and Xue, R. 2022. Activated or impaired: An overview of DNA repair in neurodegenerative diseases. *Aging and disease*, 13(4), 987.
- Rad, S. K., Arya, A., Karimian, H., Madhavan, P., Rizwan, F., Koshy, S., and Prabhu, G. 2018. Mechanism involved in insulin resistance via accumulation of β -amyloid and neurofibrillary tangles: Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Drug design, development and therapy*, 3999-4021.
- Radyuk, S. N., Michalak, K., Klichko, V. I., Benes, J., and Orr, W. C. 2010. Peroxiredoxin 5 modulates immune response in *Drosophila*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(11), 1153-1163.
- Rae, C. D., Baur, J. A., Borges, K., Dienel, G., Díaz-García, C. M., Douglass, S. R., ... and McKenna, M. C. 2024. Brain energy metabolism: A roadmap for future research. *Journal of neurochemistry*, 168(5), 910-954.
- Rahul, and Siddique YH. 2022. *Drosophila*: A model to study the pathogenesis of Parkinson's disease. *CNS and Neurological Disorders - , Drug Targets*, 21(11), 949–959.
- Rai, S. P., Ansari, A. H., and Singh, D. 2024. Coffee, *antioxidants*, and brain. In *Neuroscience and Health Perspectives* (pp. 123–136). *Springer*.
- Raj, H., Raj, A., Ranjan, S., Azad, G., and Yasmin, S. 2024. Exposure of polystyrene microplastics induces oxidative stress and physiological defects in *Drosophila melanogaster*. *Asian J. Basic Sci. Res*, 6(01), 55-64.
- Ramadoss, G. N., Namaganda, S. J., Hamilton, J. R., Sharma, R., Chow, K. G., Macklin, B. L., ... and Conklin, B. R. 2025. Neuronal DNA repair reveals strategies to influence CRISPR editing outcomes. *BioRxiv*, 2024-06.
- Ramasubbu, K., and Devi Rajeswari, V. 2023. Impairment of insulin signaling pathway PI3K/Akt/mTOR and insulin resistance induced AGEs on diabetes mellitus

- and neurodegenerative diseases: a perspective review. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 478(6), 1307-1324.
- Rand, M. D. 2010. Drosophotoxicology: the growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicology and teratology*, 32(1), 74-83.
- Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., and Yadav, U. C. S. 2016. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. , 148, 183–193.
- Reaume, C. J., and Sokolowski, M. B. 2006. The nature of *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 16(17), R623–R628.
- Rehman, N., and Varghese, J. 2021. Larval nutrition influences adult fat stores and starvation resistance in *Drosophila*. *PLoS One*, 16(2), e0247175.
- Rhodenizer, D., Martin, I., Bhandari, P., and Pletcher, S. D. 2008. Genetic and environmental factors impact age-related impairment of negative geotaxis in *Drosophila* by altering age-dependent climbing speed. , *Experimental Gerontology*, 43(9), 739–748.
- Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., and Shellman, Y. G. 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology*, 5, 12.
- Riedl, C. A. L., Riedl, M., Mackay, T. F. C., and Sokolowski, M. B. 2007. Genetic and behavioral analysis of natural variation in *Drosophila melanogaster* pupation position. , *Fly*, 1(4), 222–227.
- Rigo, F. 2024. Role of redox related genes in the regulation of methamphetamine-induced phenotypes in *D. melanogaster*. BiotechRI Repository.
- Rix, R. R., and Cutler, G. C. 2022. Review of molecular and biochemical responses during stress-induced stimulation and hormesis in insects. , *Science of the Total Environment*, 838(1), 156084.
- Roberts, D. B. 2006. *Drosophila melanogaster*: the model organism. , *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121(2), 93–103.
- Rocha, J. B. T. 2013. *Drosophila melanogaster* as a promising model organism in toxicological studies. *African Biomedical Research*, 16(3), 203–210.
- Rodak, K., Kokot, I., and Kratz, E. M. 2021. Caffeine as a factor influencing the functioning of the human body—friend or foe?. *Nutrients*, 13(9), 3088.
- Rogalski F, Tsuda M, Takeo S, Asano T, Sakai T 2025. Epoxide hydrolases JHEH1 and JHEH2 deficiency impairs glucose metabolism in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 679.
- Rogers, G. C., Rusan, N. M., Peifer, M., and Rogers, S. L. 2008. A multicomponent assembly pathway contributes to the formation of acentrosomal microtubule arrays in interphase *Drosophila* cells. *Molecular biology of the cell*, 19(7), 3163-3178.
- Rovenko, B. M., Kubrak, O. I., Gospodaryov, D. V., Perkhulyn, N. V., Yurkevych, I. S., Sanz, A., ... and Lushchak, V. I. 2015. High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 79, 42-54.

- Ruedenauer, F. A., Parreño, M. A., and Kadow, I. C. G. 2023. The ecology of nutrient sensation and perception in insects. , *Trends in Ecology and Evolution*, 38(7), 605–618.
- Ruggiero, M., Calvello, R., Porro, C., and Messina, G. 2022. Neurodegenerative diseases: Can caffeine be a powerful ally to weaken neuroinflammation? , *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12958.
- Russo, P. 2024. Enteropathies Associated with Chronic Diarrhea and Malabsorption of Childhood. In *Pathology of pediatric gastrointestinal and liver disease* (pp. 99-156). *Springer*.
- Sabuncu, T., Sonmez, A., Eren, M. A., Sahin, I., Çorapçioğlu, D., Üçler, R., ... and Araz, M. 2021. Characteristics of patients with hypertension in a population with type 2 diabetes mellitus. Results from the Turkish Nationwide Survey of Glycemic and Other Metabolic Parameters of Patients with Diabetes Mellitus (TEMD Hypertension Study). *Primary Care Diabetes*, 15(2), 332-339.
- Saimaiti, A., Zhou, D. D., Li, J., Xiong, R. G., Gan, R. Y., Huang, S. Y., ... and Li, H. B. 2023. Dietary sources, health benefits, and risks of caffeine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(29), 9648-9666.
- Sánchez-Alcañiz, J. A., Silbering, A. F., Croset, V., Zappia, G., Sivasubramaniam, A. K., Abuin, L., ... and Benton, R. 2018. An expression atlas of variant ionotropic glutamate receptors identifies a molecular basis of carbonation sensing. *Nature communications*, 9(1), 4252.
- Sánchez-Rodríguez, M. A. 2019. Oxidative stress indexes for diagnosis of health or disease in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2019/4128152>.
- Sandner, G., König, A., Wallner, M., and Weghuber, J. 2022. Alternative model organisms for toxicological fingerprinting of relevant parameters in food and nutrition. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(22), 5965-5982.
- Saraiva, S. M., Jacinto, T. A., Gonçalves, A. C., Gaspar, D., and Silva, L. R. (2023). Overview of caffeine effects on human health and emerging delivery strategies. *Pharmaceuticals*, 16(8), 1067.
- Sarikaya, D. P., Church, S. H., Lagomarsino, L. P., Magnacca, K. N., Montgomery, S. L., Price, D. K., ... and Extavour, C. G. 2021. Reproductive capacity evolves in response to ecology through common changes in cell number in Hawaiian *Drosophila*. , *Current Biology*, 31(2), 322-333.e6.
- Sato, K., Yamamoto, D., and Awasaki, T. 2020. Evolution of neuronal circuits that regulate sexual behavior in *Drosophila* species. *Genes*, 11(2), 157.
- Scanlan, J. L., Battlay, P., and Robin, C. 2022. Ecdysteroid kinase-like (EckL) paralogs confer developmental tolerance to caffeine in *Drosophila melanogaster*. *Current Research in Insect Science*, 2, 100030.
- Schimpl, F. C., da Silva, J. F., de Carvalho Gonçalves, J. F., and Mazzafera, P. 2013. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of ethnopharmacology*, 150(1), 14-31.

- Schmidt, B., Roberts, R. S., Davis, P., Doyle, L. W., Barrington, K. J., Ohlsson, A., ... and Tin, W. 2006. Caffeine therapy for apnea of prematurity. *New England Journal of Medicine*, 354(20), 2112-2121.
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. , *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108.
- Seidel U, Jans K, Hommen N, Ipharraguerre IR. 2020. Lithium content of 160 beverages and its impact on lithium status in *Drosophila melanogaster*. , *Foods*, 9(6), 795.
- Sellier, M. J. 2010. Modulation of feeding behavior and peripheral taste response by aversive molecules in *Drosophila melanogaster* [Doctoral dissertation, École Polytechnique].
- Selvamani, S., Kapoor, N., Ajmera, A., El Enshasy, H. A., Dailin, D. J., Sukmawati, D., ... and Abomoelak, B. 2023. Prebiotics in new-born and children's health. *Microorganisms*, 11(10), 2453.
- Semchyshyn, H. 2024. Fructose-mediated AGE-RAGE axis: approaches for mild modulation. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1500375.
- Serra M, Simola N, Pollack AE. 2024. Brain dysfunctions and neurotoxicity induced by psychostimulants in experimental models and humans: an overview of recent findings. , *Neural Regeneration Research*, 19(9), 1892–1902.
- Seuring, T., Archangelidi, O., and Suhrcke, M. 2015. The economic costs of type 2 diabetes: a global systematic review. *Pharmacoeconomics*, 33, 811–831.
- Sezen, Y., Bas, M., Polat, M., and Yildiz, A. 2010. The relationship between oxidative stress and coronary artery ectasia. , *Cardiology Journal*, 17(6), 566–573.
- Shadfar, S., Brocardo, M., and Atkin, J. D. 2022. The complex mechanisms by which neurons die following DNA damage in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2484.
- Shan, L., Wang, F., Zhai, D., Meng, X., Liu, J., and Lv, X. 2022. Caffeine in liver diseases: Pharmacology and toxicology. *Frontiers in pharmacology*, 13, 1030173.
- Sharma, M., ve Thakur, S. 2023. Discovery of blood-brain barrier permeable and orally bioavailable caffeine-based amide derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 85, 117390.
- Sherif, S., Gamal, N., Abdelnaby, O., and Hamza, A. 2024. Study of Neuroinflammation and Oxidative Stress Induced by Energy Drinks Consumption A Dose-Dependent Study.
- Shindyapina AV, Cho Y, Kaya A, and Tyshkovskiy A. 2022. Rapamycin treatment during development extends life span and health span of male mice and *Daphnia magna*. , *Science Advances*, 8(13), eabo5482.
- Shingleton, A. W. and Veal, I. M. 2023. Sex-specific regulation of development, growth and metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 559, 111778.
- Shingleton, A. W., and Masandika, J. R. 2017. The sex-specific effects of diet quality versus quantity on morphology in *Drosophila melanogaster*. , *Royal Society Open Science*, 4(9), 170375.

- Shrestha, B., and Lee, Y. 2023. Molecular sensors in the taste system of *Drosophila*. , *Journal of Genetics and Genomics*, 50(1), 59–69.
- Sınar, D. S., Acar, N. E., and Yıldırım, İ. 2019. Kafein ve obezite. *Türkiye Spor Bilimleri Dergisi*, 3(1), 10-20.
- Siam, N. H., Snigdha, N. N., Tabasumma, N., and Parvin, I. 2024. Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: exploring epidemiology, pathophysiology, and treatment strategies. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 25(12), 436.
- Siddique, K. H. M., Johansen, C., Rao, J. V. D. K. K., and Ali, M. 2005. Legumes in sustainable cropping systems.
- Siddique, Y. H., Naz, F., Mantasha, I., and Shahid, M. 2021. Lemongrass extract alleviates oxidative stress and delayed the loss of climbing ability in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Letters in Drug Design and Discovery*, 18(10), 987-997.
- Sievenpiper, J. L. 2016. Sickeningly sweet: does sugar cause chronic disease? No. *Canadian journal of diabetes*, 40(4), 287-295.
- Silva, A. R., Santos, A. C. F., Farfel, J. M., Grinberg, L. T., Ferretti, R. E., Campos, A. H. J. F. M., ... and Brentani, H. 2014. Repair of oxidative DNA damage, cell-cycle regulation and neuronal death may influence the clinical manifestation of Alzheimer's disease. *PloS one*, 9(6), e99897.
- Silva, E. A., Lee, B. J., Caceres, L. S., Renouf, D., and Vilay, B. R. 2006. A novel strategy for identifying mutations that sensitize *Drosophila* eye development to caffeine and hydroxyurea. , *Genome*, 49(9), 1122–1134.
- Silva, S. T. D., Costa, N. M. B., Franco, F. S. C., and Natali, A. J. 2013. Calcium and caffeine interaction in increased calcium balance in ovariectomized rats. *Revista de Nutrição*, 26, 313-322.
- Silva-Soares, N. F., Nogueira-Alves, A., Beldade, P., and Mirth, C. K. 2017. Adaptation to new nutritional environments: larval performance, foraging decisions, and adult oviposition choices in *Drosophila suzukii*. *BMC ecology*, 17, 1-13.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. , *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191.
- Smith, A. 2022. Caffeine, habitual caffeine consumption, alertness and cognitive performance. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 11(11), 46-57.
- Smith, M. A., and Schnellmann, R. G. 2012. Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular research*, 96(1), 32-37.
- Soares, E., Nunes, S., and Reis, F. 2012. Diabetic encephalopathy: The role of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes. *Cardiovascular and Metabolic Research*, 2(2), 20–31.
- Socala, K., Szopa, A., Serefko, A., and Poleszak, E. 2020. Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: A review. , *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 107.

- Song, X., Singh, M., Lee, K. E., and Vinayagam, R. 2024. Caffeine: A multifunctional efficacious molecule with diverse health implications and emerging delivery systems. , *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12003.
- Spagnuolo, M. S., Iossa, S., and Cigliano, L. 2020. Sweet but bitter: Focus on fructose impact on brain function in rodent models. , *Nutrients*, 13(1), 1.
- Speit, G., and Rothfuss, A. 2012. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach* (pp. 79–90). Springer.
- Spoor M. 2018. The insulin/IGF-1, the sirtuin and the mTOR pathway: How alterations of these pathways could affect age-related diseases and lifespan [Bachelor's thesis, University of Groningen].
- Staats, S., Lüersen, K., and Wagner, A. E. 2018. *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism in food and nutrition research. , *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(30), 8017–8033.
- Stack Mills A. 2022. Low-dose pesticide effects in *Apis mellifera*: testing hormesis and reviewing changing trends in honey bee toxicology research.
- Stanhope, K. L. 2016. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 53(1), 52-67.
- Stefanello, N., Schmatz, R., Pereira, L. B., and Rubin, M. A. 2014. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 394, 131–141.
- Stefanyshyn, N. and Strilbytska, O. 2024. Dietary protein-to-carbohydrate ratio affects development and metabolism in *Drosophila* larvae and imago. PDF.
- Stewart, M. G. 2005. Structural basis of hippocampal plasticity following stress and learning: Electron microscopical studies. The Open University Research Archive. <https://oro.open.ac.uk/12843/>. Son Erişim Tarihi:13.06.2025.
- Strilbytska OM, Zayachkivska A, Koliada A 2020. Anise Hyssop (*Agastache foeniculum*) increases lifespan, stress resistance, and metabolism by affecting free radical processes in *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*, 11, 596729.
- Strilbytska, O. M. and Semaniuk, U. V. 2022. Developmental diet defines metabolic traits in larvae and adult *Drosophila*. PDF.
- Suh, H. J., Shin, B., Han, S. H., Woo, M. J., and Hong, K. B. 2017. Behavioral changes and survival in *Drosophila melanogaster*: Effects of ascorbic acid, taurine, and caffeine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(11), 1873-1882.
- Sun, X., Liu, Y., Liu, C., Mayumi, K., Ito, K., and Nose, A. 2022. A neuromechanical model for *Drosophila* larval crawling based on physical measurements. *BMC Biology*, 20, 1–21.
- Suryasa, I. W., Rodríguez-Gómez, M., and Koldoris, T. 2021. Health and treatment of diabetes mellitus. *International journal of health sciences*, 5(1), 572192.
- Tabibzadeh S. 2021. Signaling pathways and effectors of aging. , *Frontiers in Bioscience*, 26(1), 131–169.
- Tagorti, G., Yalçın, B., Güneş, M., Burgazlı, A. Y., and Kaya, B. 2024. Comparative evaluation of natural and artificial sweeteners from DNA damage, oxidative

- stress, apoptosis, to development using *Drosophila melanogaster*. *Drug and Chemical Toxicology*, 47(5), 606-617.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W. P. P., and Sulaiman Rahman, H. 2018. Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1162.
- Tangvarasittichai, S. 2015. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 456–480.
- Taylor, M. J., and Tuxworth, R. I. 2019. Continuous tracking of startled *Drosophila* as an alternative to the negative geotaxis climbing assay. *Journal of neurogenetics*, 33(3), 190-198.
- Temido-Ferreira, M., Ferreira, D. G., Batalha, V. L., Marques-Morgado, I., Coelho, J. E., Pereira, P., ... and Lopes, L. V. 2020. Age-related shift in LTD is dependent on neuronal adenosine A2A receptors interplay with mGluR5 and NMDA receptors. *Molecular psychiatry*, 25(8), 1876-1900.
- Temple, J. L., Bernard, C., Lipshultz, S. E., Czachor, J. D., Westphal, J. A., and Mestre, M. A. 2017. The safety of ingested caffeine: a comprehensive review. *Frontiers in psychiatry*, 8, 80.
- Tennessen, J. M., Barry, W. E., Cox, J., and Thummel, C. S. 2014. Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods*, 68(1), 105-115.
- Teran, A. D., Enete, A. A., and Chidebelu, S. A. N. D. Effects of Diabetic Prevalence and Mortality on Households Farm Labour Productivity in Benue State.
- Terreri, S. 2020. The cytoplasmic purge as a resilience response to pore-forming toxins and xenobiotics in the *Drosophila* intestinal epithelium: ROS signaling and protective effects against sustained exposures (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
- Tetik Dündar, S. 2022. CYP1A2 (Sitokrom P450 1A2) Genotiplerine (AA, AC, CC) Göre Kafein Metabolizma Hızlarının Atletik Performansa Etkileri. *Mediterranean Journal of Sport Science (MJSS)*, 5.
- Texada, M. J., Jørgensen, A. F., Christensen, C. F., Koyama, T., Malita, A., Smith, D. K., ... and Rewitz, K. F. 2019. A fat-tissue sensor couples growth to oxygen availability by remotely controlling insulin secretion. *Nature communications*, 10(1), 1955.
- Tice, R. R., and Strauss, G. H. 1995. The single cell gel electrophoresis/comet assay: A potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells*, 13(S1), 207–214.
- Timmers, P. R. H. J. 2020. Human lifespan: Recent trends and genetic determinants [Doctoral dissertation, University of Edinburgh].
- Tiwari, M. N., Agarwal, S., Bhatnagar, P., and Singhal, N. K. 2013. Nicotine-encapsulated poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles improve neuroprotective efficacy against MPTP-induced parkinsonism. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 538–547.
- Tomlinson, D. R., and Gardiner, N. J. 2008. Glucose neurotoxicity. , *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 36–45.

- Tripathi, B. K., and Irvine, K. D. 2022. The wing imaginal disc. *Genetics*, 220(4), iyac020.
- Tryon, M. S., Stanhope, K. L., Epel, E. S., Mason, A. E., Brown, R., Medici, V., ... and Laugero, K. D. 2015. Excessive sugar consumption may be a difficult habit to break: a view from the brain and body. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(6), 2239-2247.
- Tsiamis, G., Weiss, B., and Abdalla, A. M. (Eds.). 2023. *Insect Microbiome: From Diversity To Applications* (Vol. 16648714). Frontiers Media SA.
- Tsikak, D. 2017. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical biochemistry*, 524, 13-30.
- Tuthill, J. C., and Wilson, R. I. 2016. Mechanosensation and adaptive motor control in insects. , *Current Biology*, 26(20), R1022-R1038.
- Ullah, F., Güncan, A., Abbas, A., Gul, H., Guedes, R. N. C., Zhang, Z., ... and Lu, Y. 2024. Sublethal effects of neonicotinoids on insect pests. *Entomologia Generalis*, 44(5).
- USDA Agricultural Research Service. 2018. Caffeine in selected *foods*: USDA National Nutrient Database for Standard Reference Legacy (2018 release). U.S. Department of Agriculture. <https://fdc.nal.usda.gov/>. Son Erişim Tarihi:13.06.2025.
- Va, D. P., Sa, A. A., and Paul, S. F. 2009. Wonder animal model for genetic studies – *Drosophila melanogaster* – its life cycle and breeding methods – a review.
- Valente, T., Hidalgo, J., Bolea, I., Ramirez, B., Anglés, N., Reguant, J., ... and Unzeta, M. 2009. A diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, LMN diet, induces neurogenesis in the subventricular zone and hippocampus of adult mouse brain. *Journal of Alzheimer's Disease*, 18(4), 849-865.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., and Telser, J. 2007. Free radicals and *antioxidants* in normal physiological functions and human disease. , *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3, 1-12.
- Videliier, M., Rundle, H. D. ve Careau, V. 2021. Sex-specific genetic (co)variances of standard metabolic rate, body mass and locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 34(8), 1279–1289.
- Vieira, A. J., Gaspar, E. M., and Santos, P. M. 2020. Mechanisms of potential antioxidant activity of caffeine. *Radiation Physics and Chemistry*, 174, 108968.
- Vijayalakshmi, M. 2013. *Drosophila melanogaster* – Life Cycle.
- Vives-Bauza, C., Starkov, A., and Garcia-Arumi, E. 2007. Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. *Methods in cell biology*, 80, 379-393.

- Vosshall, L. B., and Stocker, R. F. 2007. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 505–533.
- Vu, J. P., McLamb, F., Feng, Z., Griffin, L., Gong, S., and Shea, D. 2023. Locomotion and brain gene expression exhibit sex-specific non-monotonic dose-response to HFPO-DA during *Drosophila melanogaster* lifespan. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 457, 116416.
- Wagner, T., Galante, H., and Czaczkes, T. J. 2024. A high-throughput and sensitive method for food preference assays in walking insects. *bioRxiv*, 2024-04.
- Wang Y. 2018. Insulin/IGF-like signalling and brain ageing in *Drosophila melanogaster* [Doctoral dissertation, University of Warwick]. CORE.
- Wang, J., Ferruzzi, M. G., Ho, L., Blount, J., Janle, E. M., Gong, B., ... and Pasinetti, G. M. 2012. Brain-targeted proanthocyanidin metabolites for Alzheimer's disease treatment. *Journal of Neuroscience*, 32(15), 5144-5150.
- Wang, J., Li, Y., Liu, Y., Zhang, H., and Dai, J. 2010. Disturbance of perfluorooctanoic acid on development and behavior in *Drosophila* larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(9), 2117-2122.
- Wang, X., and Michaelis, E. K. 2010. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in aging neuroscience*, 2, 1224.
- Wang, Z., Qiu, B., Gao, J., and Del Coso, J. 2022. Effects of caffeine intake on endurance running performance and time to exhaustion: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 15(1), 148.
- Weber, D., Richter, V., and Rohwedder, A. 2023. Learning and memory in *Drosophila* larvae. , Cold Spring Harbor Protocols, 2023(3), pdb.top107863.
- Weiner, A. K., Ramirez, A., Zintel, T., Rose, R. W., Wolff, E., Parker, A. L., ... and Smith, S. T. 2014. Bisphenol A affects larval growth and advances the onset of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 101, 7-13.
- Welch, C. J., and Mulligan, K. A. 2022. Evaluating learning and memory in *Drosophila melanogaster* to study the neurodevelopmental impacts of toxicants. *Current Protocols*, 2(9), e576.
- Wierzejska, R. E., and Gielecińska, I. 2024. Evaluation of the caffeine content in servings of popular coffees in terms of its safe intake—can we drink 3–5 cups of coffee per day, as experts advise?. *Nutrients*, 16(15), 2385.
- Wilkinson E 2021. The Role of Vps54 in *Drosophila melanogaster* Neuronal Development and Age Progressive Neurodegeneration [Doctoral dissertation, University of Denver].
- Wiseman, S. B., Anderson, J. C., Liber, K., and Giesy, J. P. 2013. Endocrine disruption and oxidative stress in larvae of *Chironomus dilutus* following short-term exposure to fresh or aged oil sands process-affected water. *Aquatic Toxicology*, 142–143, 414–423.
- Witek, K., Wydra, K., and Filip, M. 2022. A high-sugar diet consumption, metabolism and health impacts with a focus on the development of substance use disorder: A narrative review. , *Nutrients*, 14(14), 2940.

- World Health Organization. 2015. Guideline: sugars intake for adults and children. World Health Organization.
- Wu, M. N., Ho, K., Crocker, A., Yue, Z., Koh, K., and Sehgal, A. 2009. The effects of caffeine on sleep in *Drosophila* require PKA activity, but not the adenosine receptor. *Journal of Neuroscience*, 29(35), 11029-11037.
- Wu, R., Feng, J., Yang, Y., Dai, C., Lu, A., Li, J., and Liao, Y. 2017. Significance of serum total oxidant/antioxidant status in patients with colorectal cancer. *Plos One*.
- Xiao S, Baik LS, Shang X, Carlson JR 2022. Meeting a threat of the Anthropocene: Taste avoidance of metal ions by *Drosophila*. , *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(31), e2204238119.
- Xu, J., Guan, G., Ye, Z., Zhang, C., Guo, Y., Ma, Y., ... Song, G. 2024. Enhancing lipid peroxidation via radical chain transfer reaction for MRI guided and effective cancer therapy in mice. *Science Bulletin*, 69(5), 636-647.
- Yagi, K. 1987. Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45(2-4), 337-351.
- Yamada, T., Habara, O., Yoshii, Y., Matsushita, R., Kubo, H., Nojima, Y., and Nishimura, T. 2019. The role of glycogen in development and adult fitness in *Drosophila*. *Development*, 146(8), dev176149.
- Yamagata, N., Ichinose, T., Aso, Y., Plačais, P. Y., Friedrich, A. B., Sima, R. J., ... and Tanimoto, H. 2015. Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. , *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), 578-583.
- Yamamoto, D., and Jallon, J. M. 1997. Genetic dissection of sexual behavior in *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 551-585.
- Yang, A., Palmer, A. A., and De Wit, H. 2010. Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology*, 211, 245-257.
- Yang, J. L., Weissman, L., Bohr, V. A., and Mattson, M. P. 2008. Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders. , *DNA Repair*, 7(7), 1110-1120.
- Yang, J., Tang, R., Chen, S., Chen, Y., Yuan, K., Huang, R., and Wang, L. 2023. Exposure to high-sugar diet induces transgenerational changes in sweet sensitivity and feeding behavior via H3K27me3 reprogramming. *eLife*, 12, e85365.
- Yang, K. C., Yamada, K. A., Patel, A. Y., Topkara, V. K., George, I., Cheema, F. H., ... and Nerbonne, J. M. 2014. Deep RNA sequencing reveals dynamic regulation of myocardial noncoding RNAs in failing human heart and remodeling with mechanical circulatory support. *Circulation*, 129(9), 1009-1021.
- Yashin, A. I., Stallard, E., and Land, K. C. 2016. Biodemography of aging: Determinants of healthy life span and longevity (Vol. 40). *Springer*.
- Yazar, H. 2023. Investigation of Oxidative Stress Index in Radial Angio Patients. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*, 49(4), 40833-40837.

- Yirün, M. C., Kübranur, Ü. N. A. L., Şen, N. A., Yirün, O., Aydemir, Ç., and Erol, G. Ö. K. A. 2016. Evaluation of oxidative stress in bipolar disorder in terms of total oxidant status, total antioxidant status, and oxidative stress index. *Archives of Neuropsychiatry*, 53(3), 194.
- Yorulmaz, H., Tatar, A., Saltukoglu, G., and Soylu, G. 2013. Analysis of the factors influencing illness perception in patients with diabetes. *FSM Scholarly Studies Journal of Humanities and Social Sciences*, 2, 367-387.
- Yoshida, Y., Umeno, A., and Shichiri, M. 2013. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. , *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 52(1), 9–16.
- Yusuf, A. O., Danborn, B., Bauch, Z. M., Sani, D., and Ndams, I. S. 2024. Aging impaired locomotor and biochemical activities in *Drosophila melanogaster* Oregon R (fruit fly) model. *Experimental Gerontology*, 197, 112593.
- Yuzefovych, L. V., Musiyenko, S. I., Wilson, G. L., and Rachek, L. I. 2013. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet. , *Plos One*, 8(1), e54059.
- Zduńska, A., Cegielska, J., Zduński, S., and Domitrz, I. 2023. Caffeine for headaches: Helpful or harmful? A brief review of the literature. *Nutrients*, 15(14), 3170.
- Zhang J, Yu Z, Shen J, Vandenberg LN. 2021. Influences of sex, rhythm and generation on the obesogenic potential of erythromycin to *Drosophila melanogaster*. *Science of the Total Environment*, 758, 143642.
- Zhang, L., Sun, H., Grosse-Wilde, E., Zhang, L., Hansson, B. S., and Dweck, H. K. 2023. Cross-generation pheromonal communication drives *Drosophila* oviposition site choice. *Current Biology*, 33(10), 2095-2103.
- Zhang, X., Hou, L., Guo, Z., Wang, G., Xu, J., and Zheng, Z. 2023. Lipid peroxidation in osteoarthritis: focusing on 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and ferroptosis. *Cell Death Discovery*, 9, 38.
- Zhang, Z. 2024. Understanding the gut-microbiota-brain axis: a biological model for analyzing the impact of microbiota on learning, memory and defensive behavior in honey bees (Doctoral dissertation, Université de Toulouse).
- Zhao, Z., Jin, H., Li, X., and Shen, J. 2025. Continuous low concentration caffeine exposure enhances *Drosophila* larval locomotion: deep learning analysis. *Behaviour*, 1(aop), 1-15.
- Zhong, H., and Yin, H. 2015. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. *Redox Biology*, 5, 193–199.
- Zykova, T. Y., Levitsky, V. G., and Belyaeva, E. S. 2018. Polytene chromosomes – a portrait of functional organization of the *Drosophila* genome. *Current Genomics*, 19(3), 179–190.

ÖZGEÇMİŞ

ŞİRİN KÜÇÜKBENLİ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2023 – 2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim dalı Antalya
Lisans 2019 – 2023	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya

PROJELER

- TÜBİTAK 2209-A “Yüksek Şeker ve Kafein ile Beslenen *Drosophila melanogaster* Bireylerinde Nesiller Arasındaki Davranışsal ve Gelişimsel Farklılıkların Araştırılması” Yürütücü, 1919B012111594, (2021-2023)
- TUBİTAK-1001 “Farklı Zincir Uzunluklarına ve Yapılarına Sahip Kvarterner Amonyum Silan Bileşiklerinin Toksik Etkilerinin *Drosophila melanogaster* ve *Allium cepa*'da Değerlendirilmesi” Bursiyer, 121Z809, (2022-2023).
- Akdeniz Üniversitesi BAP “Askorbik Asit, Melatonin ve Resveretrolün Gümüş Nitrat ve Gümüş Nanopartiküllerine Karşı Koruyucu Etkilerinin *Drosophila melanogaster*'de Araştırılması” Araştırmacı, 6382, (2023-2025).
- Akdeniz Üniversitesi BAP “Demiz Bazlı Metalik Manyetik nanopartiküllerin RT2 PCR yöntemi aracılığıyla DNA tamir genleri üzerindeki etkilerinin araştırılması, Araştırmacı, 6564, (2024 - Devam Ediyor).
- TUBİTAK-1001 CeO₂ NP-Siringik Asit Kompozitinin Nörokoruyucu Etkisinin *Drosophila melanogaster* ile Araştırılması, Bursiyer, 123Z887, (2025 - Devam Ediyor)
- Akdeniz Üniversitesi BAP TEZ Yüksek şeker ve yüksek kafeinin *Drosophila melanogaster* üzerindeki oksidatif hasar yaratma potansiyelinin araştırılması, Araştırmacı, 6760, (2025 - Devam Ediyor).
- Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler Küçükbenli Ş. Yüksek Şeker ve Kafein ile Beslenen *Drosophila melanogaster* Bireylerinin ileri Nesillerinin Davranışsal ve Gelişimsel Farklılıkların Araştırılması, II. International Biological and Life Sciences Congress (BIOLIC), 30 kasım - 2 Aralık 2024, (Poster).