

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yağmur MEŞE

**Cu, Zn ve KARIŞIMLARININ *Galleria mellonella* L.
(Lepidoptera: Pyralidae) LARVALARINDA ANTİOKSİDAN
ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA- 2020

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Cu, Zn ve KARIŞIMLARININ *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera:
Pyralidae) LARVALARINDA ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Yağmur MEŞE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 06/01/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Dr.Öğr.Üyesi Pınar ÖZALP
DANIŞMAN

.....
Doç. Dr. Mustafa COŞKUN
ÜYE

.....
Dr.Öğr.Üyesi Mehmet SULANÇ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2018-11185**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cu, Zn ve KARIŞIMLARININ *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) LARVALARINDA ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Yağmur MEŞE

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÖZALP
İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Benay TUNÇSOY
Yıl: 2020, Sayfa: 49
Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÖZALP
: Doç. Dr. Mustafa COŞKUN
: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SULANÇ

Yapılan çalışmada, *G. mellonella* L. Büyük bal mumu güvesi (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının, bakır (Cu) (10 mg/L) ve çinko (Zn) (30 mg/L)' nun farklı konsantrasyonlarının tek başlarına ve karışım halinde beslenmeleri durumunda orta barsak ve yağ dokusundaki bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Cu, Zn ve Cu+Zn uygulamalarında, *G. mellonella* larvalarının orta barsak ve yağ dokusu antioksidan enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak belirgin değişimler gözlenmiştir. Bakıra maruz kalmış larvalarda CAT aktivitesi yağ dokuda, kontrole göre artış gösterirken, diğer uygulama gruplarının SOD ve GPx enzim aktivitelerinde azalma görülmüştür. Bakır ve çinkoya maruz kalmış larvaların orta barsağında SOD aktivitesi artış gösterirken, GPx aktivitesi azalmıştır. CAT aktivitesi ise sadece bakıra maruz kalmış larvalarda artış göstermiştir. Karışım grubunda ise her iki dokunun CAT, SOD ve GPx enzim aktivitelerinde azalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, bakır ve çinkonun *G.mellonella* larvalarının orta barsak ve yağ dokusunda oksidatif stresi indüklediği görülmüştür.

Anahtar kelimeler : Çinko, Bakır, *Galleria mellonella*, Antioksidan enzim

ABSTRACT

MSc THESIS

EFFECTS OF CU, ZN AND MIXTURES ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) LARVAE

Yağmur MEŞE

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Pınar ÖZALP
Co Supervisor : Asst. Benay TUNÇSOY
Year: 2020, Pages:49
Jury : Asst. Prof. Dr. Pınar ÖZALP
: Assoc. Prof. Dr. Mustafa COŞKUN
: Asst. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ

Toxic effects of Zn (30 mg / L) and Cu(10mg / L) applied singly and in mixture were investigated of CAT, SOD and GPx antioxidant enzyme activities in midgut and fat body of greater wax moth *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. In Cu, Zn and Cu+Zn applications, significant changes were statistically observed in the antioxidant enzyme activities of the midgut and fat body of *G. mellonella* larvae. Compared to control, CAT activity in copper-exposed larvae increased in fat body, whereas SOD and GPx enzyme activities of other treatment groups decreased. CAT activity in midgut was increased only in Cu group. Compared to control, SOD activity increased in the midgut of copper and zinc exposed larvae, whereas GPx activity decreased. In the mixture group, CAT, SOD and GPx enzyme activities of both tissues were decreased. *G.mellonella* larvae showed to induce oxidative stress in midgut and fat body tissue

Keywords: Zinc,Copper, *Galleria mellonella*, Antioxidant enzyme

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Ağır metaller çevre şartlarına dayanıklı olup biyolojik sistemlerde ve besinlerde metalin türü ve derişimine bağılı olarak birikime neden olmakta ve canlı organizmalarda ölüme kadar gidebilen zehirlenmelere yol açmaktadır. Çalışmada kullanılmış olan *Galleria mellonella*, etik sorunlara yol açmaması üretiminin kolay ve ucuz olması, memelilerin verdiği tepkilere benzer durum göstermesinden dolayı model organizma olarak toksikolojik, fizyolojik ve immünolojik çalışmalarda kullanılabilen bir türdür.

Galleria mellonella (L.) larvaları, Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvar ortamında kitle üretimi yapılan $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve $\%70 \pm 5$ bağıl neme sahip ortam koşullarında Bronksil (1961) tarafından belirlenmiş olan yarı sentetik besin ile beslenen stok kültüründen elde edilmiştir. Stok kültürün devamlılığı, besin konulan kavanozların içerisine bırakılan *G. mellonella* ergin dişi ve erkek böceklerin çiftleşmesi sonucunda dişilerin bıraktığı yumurtaların açılmasıyla sağlanmıştır.

G. mellonella (L.)' nin 5. evre larvalarına, bakır ve çinkonun farklı konsantrasyonları, tek başlarına ve karışım halinde, peteklere daldırma metodu ile uygulanmıştır. Kontrol grubundaki larvalar ise, sadece distile suya daldırılmış peteklerle beslenmiştir. Kontrol ve uygulama grupları 72 saatlik deney süresi sonunda besin ortamından alınmıştır.

Sunulan çalışmada, *G.mellonella* larvalarının orta barsak ve yağ dokudaki antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir. Bakır, çinko ve karışımının larvalarda oksidatif strese neden olduğu, oksidatif stresin biyomarkeri olan CAT, SOD ve GPx enzim aktivitelerindeki belirgin değişimler ile tespit edilmiştir.

Hücredeki ilk detoksifikasyon enzimi olan süperoksit dismutaz, reaktif oksijen türlerini hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizler ve lipid peroksidasyonu inhibe eder. Katalaz, süperoksit dismutaz aktivitesi sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksiti (H_2O_2), su ve oksijene dönüştürür. Yaptığımız çalışmada elde edilen verilere göre bakıra maruz kalmış larvalarda SOD ve CAT enzim aktiviteleri her iki dokuda aynı oranda artış göstermiştir. Bakırın yüksek toksik etkisinden nedeniyle SOD enzim aktivitesi büyük ölçüde artmış dolayısıyla ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonunda artmıştır. Artan H_2O_2 konsantrasyonu ise CAT enzim aktivitesini arttırmıştır. Bu durum hücrede serbest radikallere karşı ilk savunma basamağı olan SOD ve CAT antioksidan enzimlerinin birlikte uyumlu çalıştığını göstermektedir. Zn uygulanan grupta kontrole göre CAT ve GPx enzim aktivitesi düşüş gösterirken, SOD aktivitesi orta bağırsakta artmış yağ dokuda ise düşüş göstermiştir.

Her iki dokunun CAT, SOD ve GPx enzim aktiviteleri kontrole göre karışım grubunda azalma göstermiştir. Bakır ve çinkonun birlikte kullanımında çinkonun antagonistik etki göstererek bakırın toksik etkisi azaltılmış dolayısıyla enzim aktiviteleride düşmüştür.

Omurgalılara alternatif bir tür olarak kullanılan *G.mellonella* (L.) larvalarının yağ doku ve barsaktaki makromoleküllerin olası değişikliklerinin tespit edilmesi ve bu biyokimyasal etkilerin anlaşılması hem arıcılık sektöründe büyük kayıplara neden olan, *G. mellonella* ve diğer zararlı türlerle mücadele çalışmalarında zararlı böcek türlerinin popülasyonlarının güvenli bir şekilde kontrol edilebilmesine, hem de hedef olmayan canlılara ve çevreye daha az olumsuz etkisi olan yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans döneminde hiçbir zaman desteğini, yardımlarını ve tecrübesini esirgemeyen, sabrı ve hoşgörüsü ile daima bana yol gösteren Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden kıymetli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÖZALP' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında tecrübeleri doğrultusunda bana her türlü bilgilerini esirgemeyip yardımda bulunan, destek veren ve yol gösteren Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi ve ikinci danışman hocam kıymetli Dr. Öğr. Üyesi Benay TUNÇSOY' a teşekkür ederim. Ayrıca bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SULANÇ 'a ve Sayın Dr. Mustafa TUNÇSOY' a teşekkür ederim. Akademik hayatımda bana bilgiler veren, güler yüzlü, sevecen ve çok değerli merhum hocam Sayın Prof. Dr. İskender EMRE'ye de yaptığı bütün desteklerden dolayı minnet duyarım. Yüksek lisans öğrenimim boyunca sabrı ve hoş görüsüyle, yardımlarını ve desteğini esirgemeyip yanımda olan değerli laboratuvar arkadaşım Uzman Biyolog Ayşe KARA'ya çok teşekkür ederim. Lisans öğreniminde tanıdığım yardımsever ve hoşgörülü arkadaşım Biyolog İlker KAYA'ya teşekkür ederim. Çalışmanın yürütülmesinde desteklerini sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim. Hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, aldığım tüm kararlarda beni destekleyen annem Semiha MEŞE, babam Mehmet MEŞE ve kardeşim Batuhan MEŞE'ye sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
3. MATERYAL VE METOD	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1 <i>G. mellonella</i> Stok Kültürün Devamlılığı ve Deney Böceklerin Elde Edilmesi	13
3.1.2. Deney Besinlerinin ve Ağır Metal Konsantrasyonlarının Hazırlanması	14
3.2. Metod.....	15
3.2.1. Dokuların İzolasyonu.....	15
3.2.2. Dokuların Homojenizasyonu	16
3.2.3. Dokuların Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini	17
3.2.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Tayini.....	17
3.2.3.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Tayini	19
3.2.3.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Tayini.....	20
3.2.3.4. Total Protein Miktarının Belirlenmesi	22
3.2.3.5. İstatistiksel Analizler	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. Bulgular	25

4.1.1. SOD Enzim Aktivitesi	25
4.1.2. CAT Enzim Aktivitesi	27
4.1.3. GPx Enzim Aktivitesi	29
4.2. Tartışma	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	49



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1.	Cu, Zn ve karışımlarının <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak ve yağ dokusundaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	26
Çizelge 4.2.	Cu, Zn ve karışımlarının <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak ve yağ dokusundaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	28
Çizelge 4.3.	Cu, Zn ve karışımlarının <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak ve yağ dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	30





ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Süper Oksit Anyonunun Diğer Reaktif Türlerin Üretimindeki Rolü	3
Şekil 1.2.	Enzimatik Ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	5
Şekil 1.3.	<i>G. mellonella</i> Yaşam Evresi; Yumurta, Larva, Pupa, Ergin.....	8
Şekil 3.1.	<i>G. mellonella</i> L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvaları	13
Şekil 3.2.	Ağır Metal Uygulanan Deney Grupları	14
Şekil 3.3.	<i>G. mellonella</i> Larvasının Diseksiyonu	15
Şekil 3.4.	Ultra Turrax (A) Ve Ultrasonik (B) Homojenizatörlerde Dokuların Homojenizasyon İşlemi.....	16
Şekil 3.5.	Homojenatların Kolonda Süzülme İşlemi	17
Şekil 4.1.	Cu, Zn ve karışımlarının <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak ve yağ dokusundaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri	26
Şekil 4.2.	Cu, Zn ve karışımlarının <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak ve yağ dokusundaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri	28
Şekil 4.3.	Cu, Zn ve karışımlarının <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak ve yağ dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri	30



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: santigrad derece
cm	: santimetre
dk	: dakika
gr	: gram
mg	: miligram
ml	: mililitre
mm	: milimetre
ppm	: milyonda bir birim
sn	: saniye
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre
Ag	: Gümüş
AlCl ₃	: Alüminyum klorür
As	: Arsenik
BSA	: Bovin serum albumin
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
Co	: Kobalt
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTT	: Dithiotreitol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
Fe	: Demir
GPx (GSH-Px)	: Glutatyon peroksidaz

GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş gulutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
Hg	: Cıva
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KCl	: Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
K ₂ HPO ₄	:Dipotasyum hidrojen fosfat
LOO.	: Lipit peroksil
NADPH	:Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ EDTA	: Di sodyum etilen diamin tetra asetik asit
NP	: Nanopartikül
O ₂ .-	: Süperoksit
Pb	: Kurşun
RO.	: Alkoksil
ROO	: Peroksil
ROT	:Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SNK	: Student Newman Keul's
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
Zn	: Çinko

1. GİRİŞ

Gelişen teknoloji ve endüstri ile paralel olarak ağır metal kullanımı ve bununla birlikte oluşan endüstriyel atıklar her geçen gün artmaktadır. Ağır metaller esansiyel (biyolojik süreçlere etki derecelerine göre; çoğunlukla enzimatik bir tepkimede rol oynayan, organizma da belirli bir derişimde bulunması gereken vitamin ve hormonların bileşenlerinde bulunanlar) ve non-esansiyel (ilk konsantrasyondan itibaren toksik etki gösterenler) olarak sınıflandırılmaktadır (Özbolat ve ark., 2016). Çevre şartlarına dayanıklı olan ağır metaller besinlerde ve biyolojik sistemlerde birikim yapmaktadırlar. Son zamanlarda önem kazanan metal zehirlenmelerinde metal konsantrasyonları, metalin türü ve diğer metallerle etkileşimine bağlı olarak canlılarda ölüme kadar gidebilen zehirlenmelere yol açmaktadır. Bazı metaller birçok organizmada canlılığın devamı, çoğalması ve immün sistemin faaliyetlerinin sürdürülmesi için gerekli elementlerdir. Bununla birlikte canlılarda belirli derişimden (1-10 µg/mL) sonra toksik etki gösterirler. Metaller redoks reaksiyonları ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini indükleyerek oksidatif strese neden olabilmektedir. Organizmaya alınan metaller proteinlerle etkileşime girip onların yapısal ve enzimatik işlevlerini değiştirerek inhibe edebilir, temel olan elementlerin yerine geçerek toksik etkiler gösterebilir (Bremner, 1974) ya da bazı toksik metaller, proteinlerle etkileşerek hücre içi birikimlere neden olabilirler (Yoshikawa ve Ohta 1982; Okçu ve ark., 2009).

Ağır metallerin dokularda biriktiği ve derişimi kritik değerlere ulaştığında toksik etkilere yol açtığı yapılan farklı çalışmalarda da gösterilmiştir.(Khangarot ve ark. 1987; Spurgeon ve ark.,1994;Li ve ark., 2005; Tkachenko ve Kurhaluk, 2012)Yaşayan her organizma iç ortamını düzenlemek zorundadır, metallerde taşıma süreçlerinde ve birçok enzim aktivitesinde kilit rol oynamaktadır (Dow, 2017).

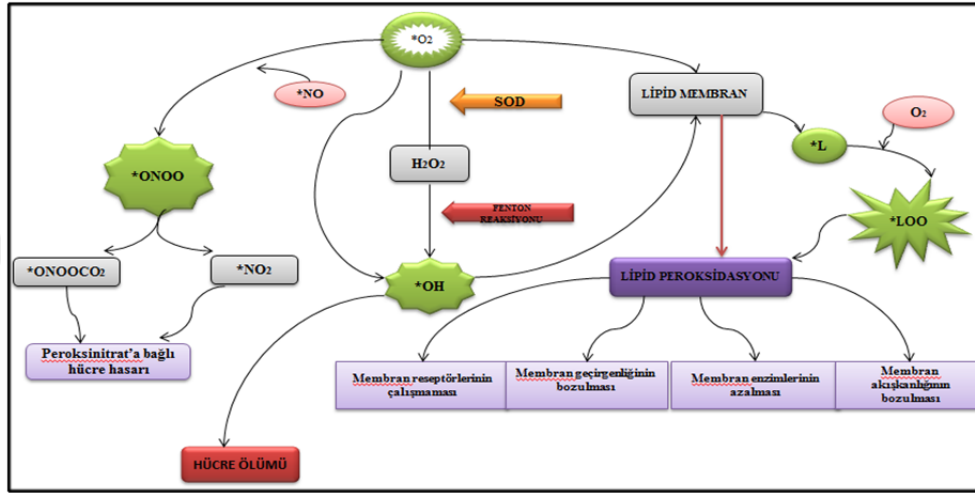
Arsenik(As), kobalt(Co), krom(Cr), kurşun(Pb), bakır(Cu), çinko(Zn), kadmiyum (Cd) gibi çeşitli metaller redoks reaksiyonları ve reaktif oksijen türlerinin üretimini indüklemektedir. Çinko (Zn) 3000 'den fazla metalloenzim ve proteinlerin kofaktörüdür. Özellikle karbonik anhidraz, süperoksit dismutazda ve birçok DNA-bağlayıcı proteinin çinko basamaklarında çok çeşitli enzimlerde aktif bölgeler oluşturan kritik bir elementtir (Dow, 2017). Zn, immün sistem hücreleri ile önemli bileşikler arasında ara bulucu rol oynamaktadır (Weiss ve Carver, 2018).

Bakırın (Cu) elektron ve O₂ transportu, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında katalizör ve O₂ radikallerinin hasarına karşı hücreyi koruma gibi görevleri vardır (Yazgan B. ve Yazgan Y., 2014). Cu ve Zn gibi elementler enzimatik antioksidan aktiviteleri için gereklidir. SOD maksimum etkinlik için çinko, bakır ve mangan; CAT demir gibi geçiş metallerinin; GPx ise selenyum kofaktörlüğüne gereksinim duyar fakat aynı zamanda fazla alındıklarında serbest radikal oluşumunu indükleyerek oksidatif strese neden olabilmektedirler.

Oksidatif stresin en önemli nedenlerinden biri serbest radikallerin oluşumudur (Babior, 2000). Oksidatif stres; reaktif oksijen türlerinin üretimi ve bozunması arasındaki dengesizliğe dayanan fizyolojik ya da patofizyolojik süreç olarak tanımlanmaktadır (Staerck ve ark., 2017).

Serbest radikaller hücrede ekzojen (sigara, x ışınları, ilaçlar ve pestisitler vb.) ve endojen (nötrofil fagositoz sistemi vb.) kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Dış yörüngesinde eşlenmemiş bir elektrona sahip olan reaktif kimyasal türler ve aynı zamanda bağımsız moleküllerdir. Serbest radikaller oksijen (reaktif oksijen türleri) ve nitrojen (reaktif nitrojen türleri) kaynaklı olabilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Valko ve ark., 2007). ROT hücrel makro moleküllere saldırarak proteinlerin oksidasyonuna, nükleik asitlerin zarar görmesine, lipid peroksidasyonuna ve hücrel savunma sistemlerinin aktive olmasına neden olmaktadır (Hermes-Lima ve Zenteno-Savin, 2002; Gavrilovic ve ark., 2017). Oksijen kaynaklı serbest radikal türleri arasında; lipid peroksil (LOO.), alkoksil (RO.), süperoksit (O₂.-), singlet O₂, hidroksil (OH.), peroksil (ROO.), organik

radikaller, hidroperoksil radikalleri (HO_2) sayılabilmektedir. Nitrojen kaynaklı serbest radikalleri ise nitrojen dioksit (NO_2) ve nitrik oksit (NO) oluşturmaktadır. Çoğu dokuda birincil ROT üreten organel mitokondiridir (Turrens, 2014).



Şekil 1.1. Süper oksit anyonunun diğer reaktif türlerin üretiminde ki rolü (Ighodaro ve Akinloye, 2018)

Serbest radikaller canlılarda devamlı oluşan ve antioksidan savunma mekanizması tarafından düzenli olarak yok edilen moleküllerdir. Süperoksit direkt olarak zarar vermemesine rağmen hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olması nedeniyle zararlıdır. H_2O_2 , membran lipidlerinde lipid peroksidasyonuna, süperoksit dismutaz inaktivasyonuna, DNA hasarına neden olmaktadır (Mercan, 2004). Böceklerde, ROT' un artışı, mideye alınan besinlerin emilimine zarar vermekte ve orta barsak hücrelerinde de oksidatif hasara yol açabilmektedir (Bi ve Felton, 1995; Tunçsoy, 2016).

Yaklaşık 2,3 milyar yıl önce bir biyokimyasal olay, dünya gezegeninin atmosferik koşullarını çarpıcı biçimde değiştirmiş ve siyanobakteriler, oksijene neden olan suyu okside etme yeteneğini geliştirmiştir (Kasting ve Siefert 2002; Raymond ve Segre 2006; Turrens, 2018). İlk olarak bu değişimin bir sonucu, bu organizmalar su bol olduğu için gezegendeki hemen hemen tüm ortamlarda koloni

kurmuşlardır. İkinci olarak bu yeni metabolik yol, başlangıçta çevrede bir atık ürün olarak biriken büyük bir oksijen üretimiyle sonuçlanmıştır (Turrens, 2003). Moleküler oksijen (O_2), aerobların yaşamı için zorunlu iken, potansiyel olarak da toksiktir. (Fridovich, 2013). Biriken O_2 nin toksisitesi ile başa çıkmak için birkaç farklı enzim gelişmiş ve bugüne kadar devam etmiştir.

Bilinen böcek türlerinin çoğu otçuldur ve gıdalarda bulunan toksik maddeler ile reaksiyonları hızlı ve güçlüdür. Toksik metallerin bu tür böcekler üzerindeki büyüme inhibisyonu, gelişim bozuklukları, mortalitesi, fizyolojilerinin yeniden düzenlenmesi, biyokimyası vb. akut ve kronik etkiler sıklıkla bildirilmektedir (Peric-Mataruga ve ark., 2019)

Biyolojik olarak antioksidan kavramı, oksitlenebilir bir substratınine karşılık daha düşük bir konsantrasyonda mevcut olması, substratın oksidasyonunu geciktirebilen ya da önleyebilen herhangi bir bileşik olarak tanımlanmasına yol açmaktadır (Pisoschi ve Pop,2015).

Antioksidan enzimlerin, süperoksit, hidrojen peroksit veya katalitik metal iyonları gibi kilit rol oynayan reaktif oksijen türlerini ortamdaki uzaklaştırma ya da daha güçsüz moleküllere çevirme, serbest radikal zararına neden olan zincirleme reaksiyonların oluşmasını inhibe etme ve bunların neden olduğu hasarları onarma gibi etki mekanizmaları vardır. Antioksidanların tükenmesi ve / veya antioksidan enzimlerin indüksiyonu, redoks aktif metallerin yer değiştirmesi, mitokondride elektron taşıma zincirlerinin inhibisyonu ve DNA onarımının kesilmesi oksidatif strese neden olabilir (Peric-Mataruga ve ark., 2019).

Oksidasyona karşı mücadele eden antioksidanlar endojen (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz v.b.) ve ekzojen (askorbik asit, vitamin A ve E, folik asit, NADPH oksidaz inhibitörleri v.b) kaynaklı olup, hem direkt hem de dolaylı yoldan ilaçların, ksenobiyotiklerin, kanser yapıcı ve toksik radikallerin olumsuz etkilerine karşı canlıyı koruyan maddelerdir. Endojen kaynaklı antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) gibi

enzimatik olan, melatonin, albümin, ürik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanlarda reaktif oksijen türlerinin zararlı etkisini yok etmektedir (Kale ve ark, 1999).

ENZİMATİK ANTIOKSIDAN	ENZİMATİK OLMAYAN ANTIOKSIDAN	
Endojen enzimler	Endojen veya metabolik faktörler	Ekzojen veya beslenme faktörleri
• Süperoksit dismutaz • Katalaz • Glutasyon • Paraoksonazlar • Heme oksijenaz-1 • Peroksiredoksinler	• Tiyo-disülfid oksidoredüktazlar • Glutaredoksinler • Tiyoredoksinler • Ürik Asit • Koenzim Q • Bilirubin • Alfa-Lipoik Asit	• E vitamini • C Vitamini • A vitamini • Polifenoller • Tetrasiklinler (doksisisiklin) • Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri (ADEİ) ve Anjiyotensin II Reseptör Blokerleri (ARB) • Pentaeritritol Tetranitrat (PETN) • Nebivolol • Statinler • Resveratrol • Mitokondri Hedefli Antioksidanlar • Gen Tedavisi

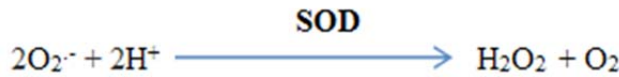
Şekil 1.2. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

Antioksidanlar vücutta zararlı etkileri olan serbest radikallere ve oksidatif strese karşı savunma sağlayan suda ya da yağda çözünebilen hayati biyomoleküllerdir (Nice, 1997). Tüm canlı organizmalar serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için antioksidan mekanizmalara sahiptirler. Diğer çok hücreli ökaryotlar gibi, böcekler de ROT'un neden olduğu hasarı sınırlamak için CAT, SOD, GPx gibi enzimler dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal mekanizmalar kullanılmaktadır (Blagojevic ve Grubor- Lajsic, 2000; Boardman ve ark., 2012; Gavrilovic ve ark., 2017).

1969 yılında ilk olarak McCord ve Fridovich tarafından keşfedilen (Kayalı, 2006) süperoksit dismutaz, hücrede endojen olarak üretilen ilk detoksifikasyon enzimi ve çok güçlü bir antioksidandır. Biyosferde çeşitli SOD izoformları bulunmaktadır. SOD bir metalloenzimdir ve dolayısıyla aktivitesi için kofaktör olarak metale ihtiyaç duymaktadır. Bu bağlamda SOD' lar temelde 3 formda sınıflandırılır bunlar;

- i. Yaygın olarak prokaryotlar ve bazı bitkilerin kloroplastlarında bulunan Fe-SOD,
- ii. Prokaryotlar ve ökaryotların mitokondrisinde bulunan Mn-SOD
- iii. Ökaryotlar ve çoğunlukla sitozolde dağılmış olarak bulunan ama aynı

zamanda kloroplastlar ve peroksizomlarda da bulunan Cu/Zn-SOD' lardır (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Zelko ve ark., 2002; Ighodaro ve Akinloye ,2018). Bunların yanı sıra iki SOD izozimi (Ni içeren bir SOD ve NiFe içeren SOD) *Streptomyces*'ten (Kim ve ark, 1996; Youn ve ark, 1996; Turrens, 2018) ve diğer birkaç prokaryottan (Barondeau ve ark., 2004; Broering ve ark, 2013) izole edilmiştir (Turrens, 2014). FeSOD'un başlangıçta sadece bakterilerde bulunan bir enzim olduğu düşünülmesine rağmen, bitki kloroplastında, bazı bitkilerin sitoplazmasında ve trypanosomatidlerin mitokondri ve glikozomlarında tespit edilmiştir (Dufernez ve ark., 2006; Wilkinson ve ark., 2006; Turrens, 2018). Ayrıca 1982 yılında Marklund tarafından tanımlanan ve CuZn-SOD'dan değişik olarak çinko ve bakır taşıyan ekstraselüler SOD (EC-SOD) bulunmaktadır (Çaylak, 2011).



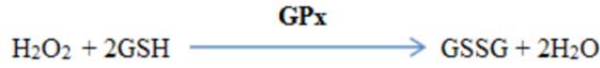
Etki mekanizması tüm SOD' lar için aynıdır: $\text{O}_2^{\cdot -}$ -radikalinin, H_2O_2 ve O_2 ' ye dönüşümünü katalize eder (McCord ve Fridovich, 1969). H_2O_2 ise metal iyonları varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile $\text{OH}^{\cdot}$ (hidroksit) radikaline dönüşmektedir (Gomes, 2012). Lepidoptera takımına ait böceklerin hemolenfinde ve çeşitli dokularında süperoksit radikal üretimi ve SOD aktivitesi görülmüştür (Felton ve Summers 1995, Arakawa 1994).

Katalaz (CAT) dört benzer alt birime sahip 240 kDa tetramerik bir proteindir (Radi ve ark. 1991). Katalazlar üç ayrı gruba ayrılabilir. Bunlar heme-

katalazlar (ayrıca tipik katalazlar olarak da bilinir) en iyi çalışılan enzimlerdir, bakteri ve mantarlarda bulunan ve bitki peroksidazları ile yüksek benzerlik gösteren ancak aynı zamanda H_2O_2 'nin dismutasyonunu katalizleyen katalaz grubu olan katalaz-peroksidazları (KatG) ve manganez dimerlerinin diğer katalazlarda bulunan heme grubunun yerini aldığı homohexamerik bir katalaz içeren bazı bakteri türlerini içeren katalazlardır (Za'moky' ve Koller, 1999; Switala ve Loewen, 2002; Chelikani ve ark., 2004). Tüm memeli formları dahil olmak üzere birçok katalaz, kompleksin bir parçası olarak bir NADPH molekülü içermektedir (Chelikani ve ark., 2004; Kirkman ve Gaetani, 2007; Turrens, 2018). Katalaz süperoksit dismutaz aktivitesi sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksiti (H_2O_2), su ve oksijene dönüştürmektedir (Duthie, 1989). Hem SOD'u hem de CAT' ı aşırı üreten Transgenik sinekler doğal türlerine göre artan bir yaşam döngüsü göstermiştir (Orr ve ark., 2003).



Glutatyon peroksidaz hidrojen peroksiti ve lipid peroksitleri, genelde mitokondri bazen sitozolde, alkole parçalayan önemli hücre içi bir enzimdir (Peric-Mataruga ve ark., 2019). Genellikle aktivitesi mikrobesein kofaktörü olarak bilinen selenyuma bağlıdır. Bu nedenle sıklıkla selenosistein peroksidaz olarak anılır (Ighodaro ve Akinloye ,2018). GPx lipid peroksidasyonunu engelleme sürecinde çok önemli rol oynar ve bu nedenle hücre oksidatif strese korunur (Gill ve Tuteja, 2010). Elektron kaynağı olarak glutatyonu kullanan GPx organik hiperoksit ve hidrojen peroksitlerin redüksiyonundan sorumlu bir enzimdir. Selenyuma bağımlı glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi Lepidoptera takımına ait türlerde nispeten düşüktür (Tunçsoy, 2016).



Galleria mellonella L. (Büyük bal mumu güvesi) Lepidoptera takımı Pyralidae familyasının Galleriinae alt familyasının bir üyesidir. Balmumu güvesi terimi, bal arısı kolonilerine, kovana ve kovan ürünlerini istila eden ve zarar veren farklı türlerdeki güveler anlamına gelen ortak bir isimdir. Büyük bal mumu güvesi holometabol bir böcek olup dört ayrı yaşam evresine (yumurta, larva, pupa, ergin) sahiptir.



Şekil 1.3. *G. mellonella* yaşam evresi; Yumurta, Larva, Pupa, Ergin

Model organizma olarak da kullanılan *G. mellonella* larvaları polen, bal mumu, pupa evresindeki bal arısı derileri ve yavruları ile beslenirler, petekte tüneller oluşturur ve yığın halinde ağ bırakırlar. Bu süre zarfında kovanda hasara neden olurlar. Ayrıca, larvaların kolonileri büyük çapta istila etmesi, çoğu zaman koloni kaybına yol açmaktadır (Kwadha ve ark., 2018). Bunun yanında, in vitro koşullarda kolay yetiştirilebilmesi ve geniş larva gruplarının kullanılabilmesi açısından araştırmaların istatistiksel gücünü arttırmakta (Cook ve McArthur, 2013; Maguire ve ark., 2017; Lange ve ark., 2018) ve araştırmalarla ilgili maliyeti azaltmaktadır.

Çalışmamızda, *G. mellonella* (L.) (Büyük bal mumu güvesi) (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının, bakır (Cu) ve çinko (Zn)' nun farklı konsantrasyonlarının tek başlarına ve karışım halinde beslenmeleri durumunda orta barsak ve yağ dokusundaki süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) antioksidan enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri incelenmiştir.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gautam ve ark. (2018), 14 gün boyunca 100, 500 ve 1000 mg CuSO₄ ve Cu NP maruz bırakılan *Metaphire posthuma* ile yaptıkları çalışmaya göre, SOD aktivitesinin tüm konsantrasyonlarda azaldığını, en fazla azalmanın ise 1000 mg CuSO₄ ve Cu NP de gerçekleştiğini söylemişlerdir. Ayrıca Cu NP'nün tüm konsantrasyonlarında CAT aktivitesinin belirgin bir azalış gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Sezer Tunçsoy ve ark. (2018), CuO NP'nün 4. evre *G.mellonella* larvalarının bazı biyokimyasal parametreleri üzerine olan etkilerini araştırmışlar ve elde ettikleri verilere göre orta barsak ve yağ dokudaki SOD aktivitesi azalırken, CAT aktivitesinin artış gösterdiğini, GPx aktivitesinde ise belirgin bir farklılık olmadığını tespit etmişlerdir.

Benavides ve ark. (2016), 7, 14 ve 21 gün boyunca ZnO ve Al₂O₃ NP maruz bırakılan *Carassius auratus* ile yaptıkları çalışmada, SOD ve CAT aktivitesi tüm NP konsantrasyonlarında hem solungaç hem de karaciğerde 7-14 gün arasında belirgin artış gösterirken 14-21 gün arasında belirgin azalış gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Suganya ve ark. (2016), *Spodoptera litura* larvalarında farklı konsantrasyonlardaki Cd ve Pb ile yaptıkları çalışmada antioksidan enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda yağ dokudaki CAT aktivitesinin Cd 0,44 mg, Pb 4,8 mg, Pb 0,48 mg, Cd 0,50 mg, Cd 0,3 mg, Pb 9,6 mg uygulamalarında azaldığını, orta barsakta ise Pb 0,48 mg, Pb 9,6 mg konsantrasyonlarda azalırken diğer konsantrasyonlarda arttığını bildirmişlerdir. SOD enzim aktivitesi orta barsakta Cd 0,50 mg, Pb 0,48 mg artış gösterirken diğer uygulamalarda azaldığını, yağ dokuda Cd 0,44 mg, Pb 4,80 mg uygulamalarında artış gösterirken diğer uygulamalarda azaldığını tespit etmiş ve enzim aktivitelerinin artan konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini söylemişlerdir.

Nikolic ve ark. (2016), *Apis mellifera* ile yaptıkları çalışmada Cu, Pb ve Cd'un antioksidan enzim aktivitelerine ve enzimlerdeki gen ekspresyonları üzerine etkisini incelemişlerdir. SOD ve CAT aktivitelerinde belirgin bir değişiklik olmadığını sadece Cd'un en düşük konsantrasyonunda CAT aktivitesinin azalış gösterdiğini söylemişlerdir. Katalaz ve süperoksit dismutaz genlerinin ekspresyonu, kadmiyuma ve bakıra maruz kalındığında değişirken kurşun sadece süperoksit dismutaz genlerinin ekspresyonunu indüklemiştir.

Li ve ark. (2005), *Oxya chinensis*'e kadmiyum uygulayarak antioksidan enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre tüm deney gruplarında CAT'ın güçlü bir detoksifikasyon etkisi olduğu, artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak GPx aktivitesinin düştüğü ve bu enzimin düşük detoksifikasyon etkisi gösterdiği, SOD enzimi aktivitesinin ise artış gösterdiğini ve SOD'nin orta derecede detoksifikasyon etki gösterdiği yorumunu yapmışlardır.

Dubovskiy ve ark. (2008), *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında oksidatif stres oluşumu sonucu süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon- S-transferaz (GST), katalaz (CAT), konsantrasyonlarının oksidasyonu yükseltgenmesi, (RSSR/TP) tiyoller ve MDA düzeyleri test edilmiştir. İlk günlerin sonunda MDA ve SOD düzeyi artarken CAT düzeyinin azaldığı görülmüştür.

Yasur ve Pathipeti (2015), gümüş nanopartiküllerinin *S. litura* ve *A. janata* larvalarında büyüme gelişme ve fizyolojisine olan etkilerini incelemişlerdir. Uygulama sonucunda SOD, CAT ve peroksidaz aktivitelerinde değişiklik olduğunu gözlemişlerdir.

Maguire ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada potasyum nitrat uygulanan *G. mellonella* larvalarının SOD aktivitesinde belirgin bir artış gözlemiştir. Bununla birlikte mitokondriyal fonksiyonlarda (mitokondriyal aldehit dehidrogenaz, putative mitokondriyal Mn süperoksit dismutaz) ve nitrat metabolizmasıyla (alifatik nitrilaz, glutatyon S-transferaz) ilgili proteinlerde artışına neden olduğu gözlenmiştir

Perić-Mataruga ve ark. (2019), dördüncü evre *L. dispar* larvalarında beyindeki ve orta barsak dokularındaki Cd biyoakümüleyonunu, oksidatif stresi ve kolinesteraz aktivitesi parametrelerindeki farklılıkları araştırmışlar, sonuç olarak oksidatif stresin belirteci olan enzim aktivitelerinde (SOD, CAT, GR, GST, APOX, GSH ve SH grupları) ve Cd birikiminin her iki doku içinde arttığı gözlenmiştir. Kolinesteraz aktivitesi ise beyinde orta bağırsağa göre önemli derecede artış tespit edilmiştir.

Baghban ve ark. (2014), Zn ve Cu'nun farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmış *H. armigera* larvaları ile yaptıkları çalışmada; Cu'nun tüm konsantrasyonlarında glikojen, protein ve kolesterol miktarının arttığı, glikojen miktarının Zn'nun tüm konsantrasyonlarında arttığı, protein ve kolesterol miktarının düşük konsantrasyonlarında azaldığı gözlenmiştir.

Ibrahim ve Ali (2018), yaptıkları çalışmada, ZnO NPs ve AgNPs uygulanmış hint yapraklarının ekstraktı ile beslenen *S. littoralis* 2. dönem larvalarının gelişimindeki ve fizyolojisindeki değişiklikleri incelemiş ve sonuç olarak ZnO NPs ile beslenen larvaların toplam hemosit, granüler hücre, plazmosit, sayıları ile lipaz, amilaz, G6PD ve CAT, SOD antioksidan enzim aktivitelerinde belirgin bir artış olduğunu bunun tam aksine karbonhidrat, lipid ve protein seviyelerinde Ag NPs göre azalma meydana geldiğini bildirmiştir.

Ahamed ve ark. (2010), *Drosophila*'nın 3. evre larvalarına belirli konsantrasyonlarda Ag NP' leri ile beslemiş ve sonucunda oksidatif stresin ve apoptosisin arttığını söylemişlerdir.

Wu ve Yi (2015) , Cr ve Pb'nin *G. mellonella* larvalarının bağışıklık ve antioksidan sistemine etkisi üzerine çalışmış, Cr ve Pb'nin artan konsantrasyonlarında kontrole göre CAT ve SOD enzim aktivitesinde artışa neden olduğunu belirtmişlerdir.

Shu ve ark. (2012) *Spodoptera litura* ile yaptıkları çalışmada çinko uygulaması ile metallotionin miktarının artışına bağlı olarak orta barsakta çinko

birikimi ve barsak hücrelerinde granül oluşumunun meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Rodrigues ve ark., (2008), Pb, Cd, Rb, Cu, Ca, Zn, Mg ve Mn konsantrasyonlarını toprak, ot (*Lolium perenne*), ve volkanik aktiviteye maruz kalan ve kalmayan yerlerden elde edilen *Pseudaletia unipuncta* larvalarında ağır metal birikimini ölçmüş, Cu, Mn, Rb ve Zn seviyelerinin, Pb ,Cd ve Mg seviyeleri ile benzer şekilde yüksek düzeyde birikim olduğunu kaydetmiştir.

Gongqing ve Yunhong (2015), *G. mellonella* larvalarında yaptıkları çalışmada, artan Pb ve Cr konsantrasyonlarının kontrole göre kıyaslandığında CAT ve SOD enzim aktivitesinde artışa neden olduğunu bulmuşlardır.

Sun ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada *Spodoptera litura* larvalarında besine ilave edilen nikelin GST ve karboksilesteraz aktivitelerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir.

Eesa M. ve ark. (2016), Cd ve Pb maruz bırakılmış *S. littoralis*'in 2. ve 4. evre larvalarıyla yaptıkları çalışmanın sonucunda Cd'un Pb' dan daha toksik etki göstermesine rağmen her iki ağır metalinde en düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etki gösterdiği belirtilmiştir.

Zaman ve ark. (1994), Hg₂C1₂ ve HgC1₂'nin *Musca domestica*'nın ergin dişi ve *Trichoplusia ni*'nin 4. evre larvaları üzerindeki toksik etkisi üzerine yaptıkları çalışmada; SOD, GPx, GST ve GR enzim aktivitelerinde her iki tür ve konsantrasyon için belirgin değişiklikler gösterdiğini, CAT enziminde ise Hg₂C1₂ konsantrasyonunda her iki tür için de belirgin değişiklikler olduğunu, HgC1₂' nin ise sadece *Trichoplusia ni* de belirgin farklılığa neden olduğunu söylemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1 *G. mellonella* Stok Kültürün Devamlılığı ve Deney Böceklerin Elde Edilmesi

Çalışmada materyal olarak kullanılan *Galleria mellonella* L. larvaları, Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvar ortamında kitle üretimi yapılan $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 70 ± 5 bağıl neme sahip ortam koşullarında Bronksil (1961) tarafından belirlenmiş olan yarı sentetik besin ile beslenen stok kültüründen elde edilmiştir. Stok kültürün devamlılığı, besin konulan kavanozların içerisine bırakılan *G. mellonella* ergin dişi ve erkek böceklerin çiftleşmesi sonucunda dişilerin bıraktığı yumurtaların açılmasıyla sağlanmıştır.



Şekil 3.1. *G.mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları

3.1.2. Deney Besinlerinin ve Ağır Metal Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan larvaların beslenmesi için bakır (Cu) 10 ppm ve çinko (Zn) 30 ppm ve karışım için 1:1 oranında çözeltiler hazırlanmıştır. Larvaların beslenmesi için hazırlanan çözeltiler deney kaplarındaki peteklere daldırma yoluyla uygulanmıştır. Kontrol grubundaki larvalar ise, sadece distile suya daldırılmış peteklerle beslenmiştir. Uygulama sonunda küf oluşumunu engelleme amacıyla petekler üzerine bir miktar kepek eklenmiştir. Tüm deney grupları ve kontrol grubuna beşinci evre *G. mellonella* larvalarından 20 adet eklenmiştir. Hava akışının sağlanması için deney kaplarının üzerine delikler açılmıştır. Kontrol ve uygulama grupları 72 saatlik deney süresi tamamlanana kadar her gün kontrol edilmiştir. Deneyler üç kez farklı zamanlarda tekrar yapılmıştır.



Şekil 3.2. Ağır metal uygulanan deney grupları

3.2. Metod

3.2.1. Dokuların İzolasyonu

Larvalar buz üzerinde 2-3 dakika bekletilip hareketleri yavaşlatıldıktan sonra, %95 etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. Larvalar sırt kısmı stratora gelecek şekilde iğneler ile sabitlenerek ve arka bacaklarının önünden orta eksen boyunca alkol ile dezenfekte edilmiş mikro makas ile kesilerek larvaların diseksiyonu yapılmıştır. İlk olarak yağ doku bir pens yardımıyla izole edilmiş ve daha sonra orta bağırsak kısmı alınmıştır. İzole edilen yağ doku ve orta bağırsak, içerisinde homojenizasyon tamponu (20 mM; pH 7,6) bulunan ependorf tüplere aktarılmıştır.



Şekil 3.3. *G. mellonella* larvasının diseksiyonu

Homojenizasyon Tamponu;

Tris (hidroksimetil) aminometan	2,4228 g
EDTA	0,2923 g
Sakkaroz	171,2 g
KCl	11,2 g
Dithiotreitol (DTT)	0,1543 g

3.2.2. Dokuların Homojenizasyonu

Yağ doku örnekleri, +4 °C’de ultrasonik homojenizatörde homojenize edilmiştir. Daha sonra 500 g’ de 15 dakika +4 °C’de santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda alınan süpernatant başka bir tüpe aktarılarak, 12000 g’ de +4 °C’de 45 dk. (10.249 rpm) tekrar santrifüj edilmiştir.

Bağırsak doku örnekleri ise, ilk önce ultra turrax ile homojenizasyonu sağlanmış ve sonrasında yağ doku için uygulanan santrifüj işlemleri uygulanmıştır. Her iki dokudan da Bradford tayini için eppendorflara 100 µl süpernatantlardan ayrılmıştır.



Şekil 3.4. Ultra turrax (A) ve ultrasonik (B) homojenizatörlerde dokuların homojenizasyon işlemi

Tüm bu işlemler sonunda süzme işlemi yapılmıştır. Süzme işleminde düşük molekül ağırlıklı proteinleri uzaklaştırmak için Sephadex® G-25 jel kolonları kullanılmıştır (Gonzalez-Reya ve ark, 2014). Homojenizasyon tamponu ile kolonlar 5 defa temizlenmiş ve temizlenen kolonlara 2500 µl örnek koyularak tamamen süzülmesi beklenmiştir. Süzülme işleminden sonra, 3500 µl tampon eklenmiş ve süzülen örnekler enzim aktivitesi için eppendorf tüplere ayrılmış ve ayrılan örnekler, -80 °C’de enzim aktivitelerinin tayini işlemlerine kadar derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.5. Homojenatların kolonda süzülme işlemi

3.2.3. Dokuların Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini

3.2.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi için McCord ve Fridovich (1969), yöntemi kullanılmıştır. Süperoksit dismutaz (SOD: EC: 1.15.1.1) aktivitesinin tespiti ksantinoksidaz/ hipoksantin sistemi tarafından sitokrom c' nin azalmasının ölçülmesine dayanmaktadır. 1 birim SOD, sitokrom c azalışının %50' sinin inhibe edilmesiyle biriken enzim miktarı ile ifade edilmektedir. SOD aktivitesi, total protein konsantrasyonunun U mg-1 olarak tanımlanmasıyla elde edilir.

a-Çözeltiler:

Fosfat Tamponu;

100 ml Sol A + 850 ml Sol B ; pH 7.8

Solüsyon A		Solüsyon B	
KH ₂ PO ₄	6,8 g	K ₂ HPO ₄	8,7 g
EDTA	0,0292 g	EDTA	0,0292 g
Ultra Saf Su	1 L	Ultra Saf Su	1 L

Hipoksantin;

Hipoksantin	20,4 g
Ultra saf su	100 ml

Tamamen çözülene kadar 50° C 'de ısıtılır.

Sitokrom c oksidaz;

Sitokrom c	37,5 mg
Fosfat tamponu	20 ml

Ksantin oksidaz (56 Um/ml);

Ksantin	50 µl (38,5 Um/ml)
Fosfat tamponu	2 ml

b- Ksantin oksidaz testi:

Fosfat tamponu	2700 µl
Hipoksantin	100 µl
Sitokrom c oksidaz	100 µl
Ksantin oksidaz	100 µl
Toplam	3000 µl

Ksantin oksidaz testi örnekler okunmadan önce yapılmıştır. Ölçümler, 550 nm absorbansta bir dakika boyunca üçer kez tekrar edilmiştir.

c- Örneklerin ölçülmesi:

Solüsyon	Hacim (µl)	Kör (µl)
Fosfat Tamponu	2650	2800
Hipoksantin	100	100
Sitokrom c oksidaz	100	100
Örnek	50	-
Ksantin oksidaz	100	-
Toplam	3000	3000

Örnekler 550 nm absorbansda 1 dakika boyunca kinetik olarak spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.2.3.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Tayini

Katalaz (CAT) enzim aktivitesi için Greenwald (1985) yöntemi kullanılmıştır. Katalaz (CAT: EC: 1.11.1.6) aktivitesi bir dakika boyunca 240 nm absorbansta H_2O_2 ' in parçalanmasıyla açığa çıkan azalan absorbansın ölçülmesi olayına dayanmaktadır. Sabit sayı ($\epsilon_{240} = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak birim zaman başına absorbanstaki değişimler katalaz aktivitesinin ölçümü olarak alınmıştır. Enzim aktivitesi $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein birimiyle verilmiştir.

a- Çözeltiler:**Fosfat tamponu;**

50 ml Sol A+ 250 ml Sol B; pH 7,8 1L ultra saf su ile tamamlanır. pH 7,5 olarak HCl ile ayarlanır.

Solüsyon A		Solüsyon B	
KH_2PO_4	10.9 g	K_2HPO_4	13.92 g
Ultra Saf Su	1 L	Ultra Saf Su	1 L

H₂O₂:

Ayrı bir mezürde %30' luk H₂O₂ 1,7 ml konulur onun üzerine hazırlanan fosfat tamponu ile 100 ml' ye tamamlanır. Hazırlanan bu çözelti ayrı bir şişeye konur.

b- Örneklerin ölçülmesi:

Solüsyon	Hacim (µl)	Kör (µl)
Fosfat tamponu	1900	3000
H ₂ O ₂	1000	-
Örnek	100	-
Toplam	3000	3000

Örneklerin, 240 nm absorbansta 10 saniye aralıklarla 1 dakika boyunca kinetik olarak ölçümleri spektrofotometrede yapılmıştır.

3.2.3.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Tayini

Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi için Lawrence ve Burk (1976) yöntemleri kullanılmıştır. Total glutasyon peroksidaz (GPx: EC: 1.11.1.9) NADPH' ın 340 nm' de oksidasyonunu takiben glutasyon reduktaz, redükte glutasyon ve substrat olarak kümen hidroperoksit varlığında ölçülmektedir. GPx aktivitesi, total protein konsantrasyonun nmol dk-1 mg-1 cinsinden ifade edilmektedir.

a- Çözeltiler:**Fosfat tamponu;**

50 ml Sol A+ 250 ml Sol B; pH 7,8

Solüsyon A		Solüsyon B	
KH ₂ PO ₄	13.6 g	K ₂ HPO ₄	17,4 g
Ultra Saf Su	1 L	Ultra Saf Su	1 L

GSH (redükte glutatyon);

GSH	0,123 g
Fosfat tamponu	10 ml

Kümen hidroperoksit;

Kümen (%80)	0,563 ml
Etanol	20 ml

100 ml' ye kadar ultra saf su ilave edilir.

GR (glutatyon reduktaz);

GR	38,4 µl (38,5 U/ml)
Fosfat tamponu	1,78 ml

NADPH;

NADPH	4 mg
Fosfat tamponu	2 ml

b- Kümen hidroperoksit testi:

Solüsyon	Hacim (µl)
Fosfat tamponu (100mM)	450
GSH (40 mM)	50
GR (20 U/ml)	50
NADPH (2,4 mM)	50
Tris tamponu*	300
Kümen hidroperoksit	100
Toplam	1000

*Örneğin homojenizasyonunda kullanılan Tris HCl tamponu

c- Örneklerin ölçülmesi:

Solüsyon	Hacim (µl)	Kör (µl)
Fosfat tamponu (100mM)	450	1000
GSH (40 mM)	50	-
GR (20 U/ml)	50	-
NADPH (2,4 mM)	50	-
Örnek	300	-
Kümen hidroperoksit	100	-
Toplam	1000	1000

Örnekler, 340 nm absorbansda 1 dakika boyunca spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.2.3.4. Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Bradford yöntemi, proteinlerde bulunan arjinin, triptofan, tirozin, histidin ve fenilalanin gibi aminoasit rezidülerinin, Coomassie brilliant blue G-250 boyasına bağlanmasıyla mavi renkli kompleks oluşması esasına dayanır. Renklendirilmiş çözeltinin absorbansı 595 nm’de ölçülür (Bradford, 1976).

a- Standart grafiğin hazırlanması

Stok protein çözeltisi bovin serum albümin (BSA)' den 1 mg/mL olarak hazırlanmıştır. Stok protein çözeltisi 0, 10, 20, 30 ve 50 µg/L derişimlerinde seyreltilerek çözeltiler hazırlanmıştır. Örnek protein derişimlerinin ölçülmesinde kullanılan yöntem ile standartların absorbans değerleri tespit edilmiş ve standart grafiğin oluşturulmasında kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlandıktan sonra 5 saniye vortekste karıştırılmıştır.

Standart Protein çözeltileri:

Konsantrasyon (µg/L)	0	10	20	30	50
BSA (ml)	0	0,05	0,1	0,15	0,25
Ultra saf su (ml)	5	4,95	4,9	4,85	4,75

b- Bradford Reaktifi:

10 ml Bradford reaktifi üzerine 40 ml ultra saf su eklenerek hazırlanmıştır.

c- Örneklerin hazırlanması

Dokuların homojenizasyonu sonucunda elde edilen supernatantlar ilk önce 1/100 oranında, daha sonra tekrar 1/5 oranında seyreltilmiştir.

d- Standartların ve örneklerin okunması

Hazırlanan standart çözeltilerden başka bir tüpe 250 µl eklenmiş, üzerine 750 µl Bradford reaktifi ilave edilmiştir. Örnekler 595 nm absorbansta spektrofotometrede okunmuştur. Kör olarak örnekle aynı miktarda ultra saf su kullanılmıştır.

3.2.3.5. İstatistiksel Analizler

Kontrol ve ağır metal uygulanmış deney grupları arasındaki istatistiksel veriler SPSS 21.0 bilgisayar programında SNK testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. SOD Enzim Aktivitesi

G. mellonella'nın orta barsak ve yağ dokusundaki 72 saatlik süre sonundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişiklikler Çizelge 4.1.1. ve Şekil 4.1.1. de verilmiştir. Elde edilen verilere göre; her iki doku içinde SOD enzim aktivitelerinde istatistiki olarak belirgin farklılıklar gözlenmektedir.

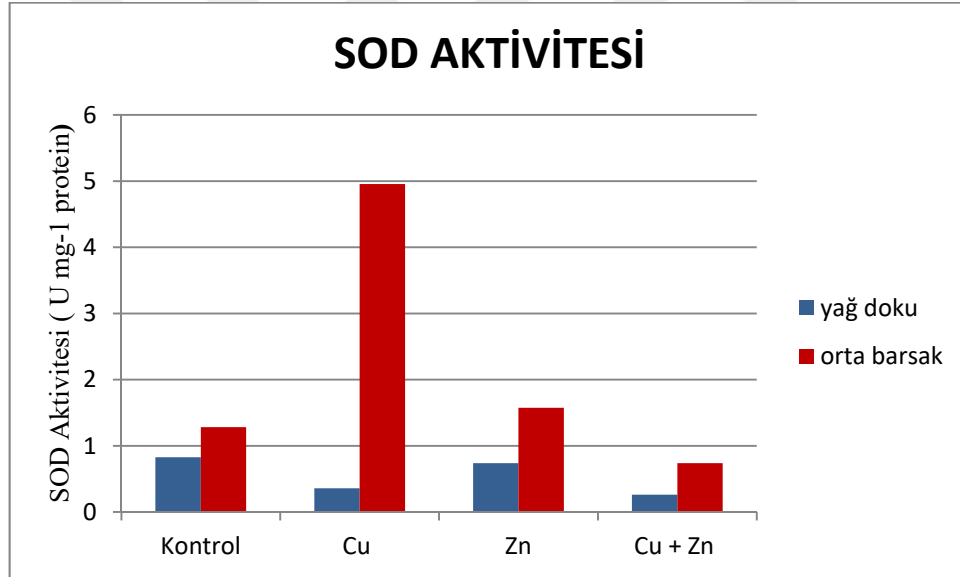
Cu (10 mg/l) ve Zn (30 mg/l) ve Cu+Zn (10:30 mg/l) karışım uygulanan besin ile beslenmiş larvaların yağ dokusundaki SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre belirgin bir azalış görülmektedir. Cu grubu SOD aktivitesi kontrole göre %56, Zn grubu kontrole göre %10' luk bir düşüş göstermiştir. Cu+Zn grubu kontrol ile karşılaştırıldığında %68 oranında büyük bir düşüş göstermiştir. Karışım grubu Zn ve Cu grupları ile karşılaştırıldığında bakıra göre %26, çinkoya göre %64 oranında belirgin bir azalış göstermiştir.

Orta barsaktaki SOD aktivitesinde Cu grubu kontrole göre %285 oranında büyük bir artış göstermiştir. Zn uygulanan grupta kontrole kıyasla %22 oranında bir artış meydana gelmiştir. Cu+Zn grubunun enzim aktivitesinde kontrole göre %42'lik bir azalış olduğu görülmüştür. Karışım grubu Cu ve Zn grupları ile karşılaştırıldığında, bakıra göre SOD aktivitesinde %85, çinkoya göre %53 oranında belirgin bir azalış görülmüştür. İncelenen her iki dokudaki farklılıklar kontrole göre istatistiki açıdan önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Cu, Zn ve karışımlarının *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri

	SOD AKTİVİTESİ (U mg ⁻¹ protein) ($\bar{X} \pm s\bar{x}$)*	
AĞIR METAL (mg/l)	YAĞ DOKU	ORTA BARSAK
Kontrol	0,827 ± 0,000 a	1,284 ± 0,001 a
Cu (10 mg/l)	0,358 ± 0,000 b	4,956 ± 0,003 b
Zn (30 mg/l)	0,738 ± 0,001 c	1,576 ± 0,001 c
Cu + Zn (10:30 mg/l)	0,263 ± 0,000 d	0,739 ± 0,000 d

*SNK; Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur(P< 0.05).



Şekil 4.1. Cu, Zn ve karışımlarının *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri

4.1.2. CAT Enzim Aktivitesi

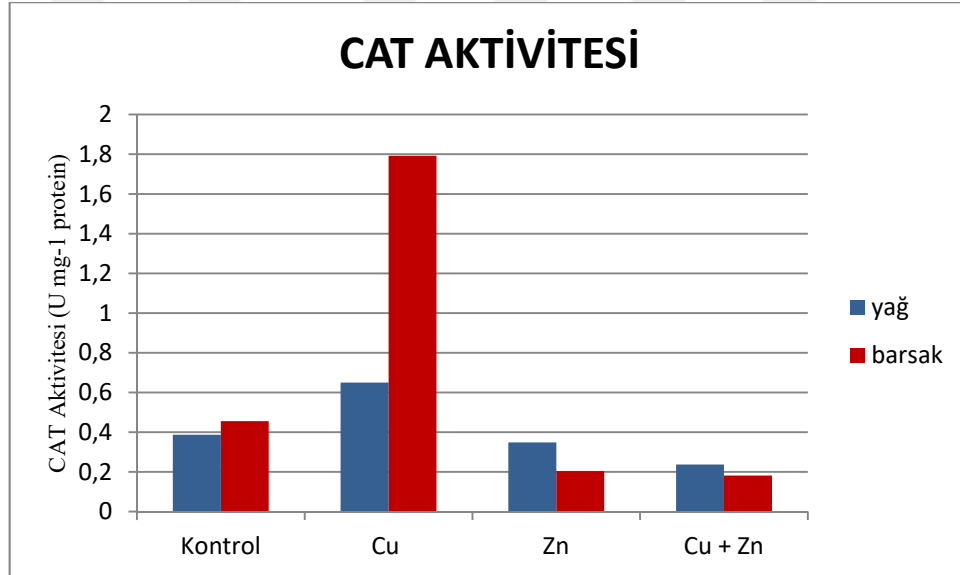
Çizelge 4.1.2.ve Şekil 4.1.2.’de *G.mellonella* larvalarının tek başlarına (Cu 10 mg/l ve 30 mg/l Zn) ve karışım halinde (10:30 mg/l Cu+Zn) uygulanan besin ile beslenmeleri sonunda orta barsak ve yağ dokusundaki CAT enzim aktiviteleri gösterilmiştir. 72 saatlik uygulama süresince *G. mellonella*’nın yağ dokusundaki CAT enzim aktivitesinde kontrole göre Cu grubunda %67 oranında belirgin bir artış görülmüştür. Zn grubunda kontrole göre %10’luk bir düşüş gözlenmiştir. Karışım grubunun CAT aktivitesi kontrole göre % 38 oranında beligin bir azalış göstermektedir. Karışım grubu Cu ve Zn grupları ile kıyaslandığında bakıra göre CAT aktivitesinde %63, çinkoya göre %31 oranında belirgin bir azalış görülmektedir.

Orta barsaktaki CAT aktivitesi kontrole göre Cu grubunda %75 oranında büyük bir yükseliş gösterirken, Zn grubunda %55 ve Cu+Zn uygulanmış grupta %60 oranında bir düşüş göstermiştir. Karışım grubu Cu ve Zn gruplarıyla kıyaslandığında, bakıra göre CAT enzim aktivitesinde %89, çinkoya göre %10 oranında bir azalış meydana gelmiş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 4.2. Cu, Zn ve karışımlarının *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri

	CAT AKTİVİTESİ (U mg ⁻¹ protein) ($\bar{X} \pm s\bar{x}$)*	
AĞIR METAL (mg/l)	YAĞ DOKU	ORTA BARSAK
Kontrol	0,387 ± 0,018 a	0,456 ± 0,006 a
Cu (10 mg/l)	0,650 ± 0,023 b	1,792 ± 0,009 b
Zn (30 mg/l)	0,349 ± 0,012 a	0,204 ± 0,003 c
Cu + Zn (10:30 mg/l)	0,237 ± 0,005 c	0,182 ± 0,005 d

*SNK; Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur(P< 0.05).

Şekil 4.2. Cu, Zn ve karışımlarının *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri

4.1.3. GPx Enzim Aktivitesi

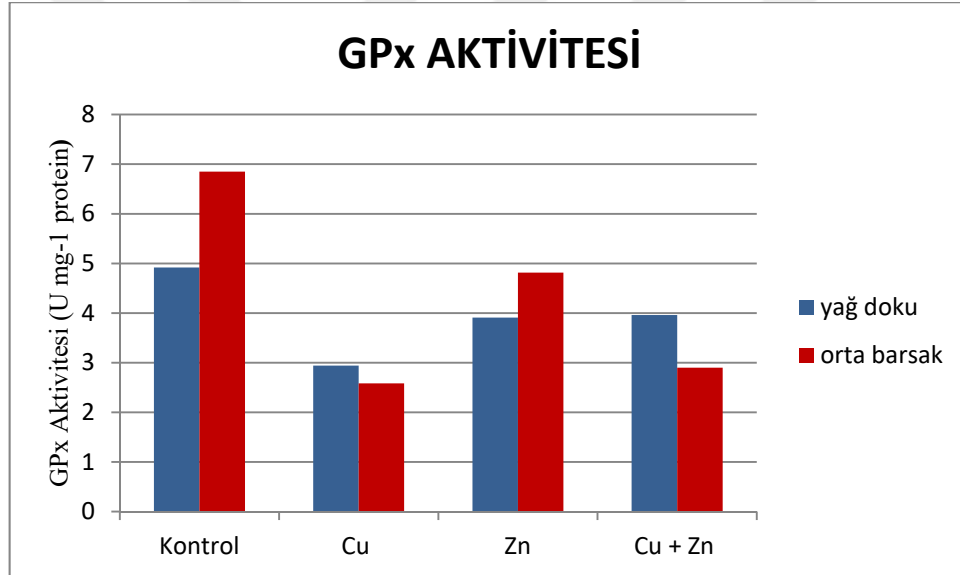
Çizelge 4.1.3. ve Şekil 4.1.3. de *G.melonlella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki GPx enzim aktivitelerindeki değişimler gösterilmiştir. Bulunan sonuçlara göre tek başlarına (Cu 10 mg/l ve Zn 30 mg/l) ve karışım (10:30 mg/l) halinde besin ile beslenen larvaların her iki dokusundaki GPx enzim aktivitesinde kontrole göre belirgin farklılıklar tespit edilmiştir. *G. mellonella* larvalarının yağ dokusunda kontrole göre Zn %20, Cu %40 ve karışım uygulamasında %19 oranında bir düşüş gözlenmiştir. Karışım grubu Cu uygulanan grup ile kıyaslandığında %35 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterirken, Zn uygulamasına göre %1 oranında bir düşüş göstermiştir.

Orta barsaktaki GPx enzim aktivitesinde kontrole göre Cu %62, Zn %29 ve karışım uygulanan grup %57 oranında düşüş göstermiş ve istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Karışım grubunun GPx aktivitesi, Zn grubuna göre %39 oranında belirgin bir azalış, Cu uygulanan gruba göre %12'lik bir artış göstermiştir.

Çizelge 4.3. Cu, Zn ve karışımlarının *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri

	GPx AKTİVİTESİ (U mg ⁻¹ protein) ($\bar{X} \pm s\bar{x}$)*	
AĞIR METAL (mg/l)	YAĞ DOKU	ORTA BARSAK
Kontrol	4,919 ± 0,035 a	6,850 ± 0,047 a
Cu (10 mg/l)	2,942 ± 0,007 b	2,584 ± 0,242 b
Zn (30 mg/l)	3,910 ± 0,022 c	4,814 ± 0,060 c
Cu + Zn (10:30 mg/l)	3,962 ± 0,005 c	2,899 ± 0,017 b

*SNK; Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur (P < 0.05).



Şekil 4.3. Cu, Zn ve karışımlarının *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri

4.2. Tartışma

Ağır metaller çevre şartlarına dayanıklı olup biyolojik sistemlerde ve besinlerde birikime neden olmaktadır. Metal zehirlenmelerinde metalin türü, diğer metallerle etkileşimi ve konsantrasyonlarına bağlı olarak insan ve hayvanlarda ölüme kadar gidebilen ciddi zehirlenmelere yol açmaktadır. Bazı metaller canlılığın devamı, çoğalması, immün sistemin faaliyetlerinin sürdürülmesi için gerekli elementlerdir. Cu ve Zn gibi elementler enzimatik antioksidan aktiviteleri için gereklidir. SOD maksimum etkinlik için çinko, bakır ve mangan; CAT demir gibi geçiş metallerinin; GPx ise selenyum kofaktörlüğüne gereksinim duymaktadır. Antioksidan enzimlerin, süperoksit, hidrojen peroksit veya katalitik metal iyonları gibi kilit rol oynayan reaktif oksijen türlerini ortamdan uzaklaştırma ya da daha güçsüz moleküllere çevirme, serbest radikal zararına neden olan zincirleme reaksiyonların oluşmasını inhibe etme ve bunların neden olduğu hasarları onarma gibi etki mekanizmaları vardır. Ancak belirli konsantrasyonlardan sonra redoks reaksiyonları ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini indükleyerek oksidatif strese neden olabilmektedir.

SOD enzimi $O_2^{\cdot-}$ radikalinin, H_2O_2 ve O_2 ' ye dönüşümünü katalize eder (McCord ve Fridovich, 1969). Meydana gelen toksik hidrojen peroksit (H_2O_2), CAT enzimi etkisiyle su ve oksijene ya da metal iyonları varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile $OH^{\cdot}$ (hidroksil) radikale dönüşmektedir (Gomes, 2012). CAT, H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarında daha etkilidir. Daha düşük H_2O_2 konsantrasyonunun söz konusu olduğu durumlarda, GPx daha etkilidir (Duthie vd. 1989).

Yapılan çalışmada, *G. mellonella* L. (Büyük bal mumu güvesi) (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının, bakır (Cu) ve çinko (Zn)' nun farklı konsantrasyonlarıyla tek başlarına ve karışım halinde beslenmeleri durumunda orta barsak ve yağ dokusundaki süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) antioksidan enzim aktivitelerine olan etkileri incelenmiştir.

S. litura larvaları ile yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlarda larvalara Cd ve Pb uygulaması sonucunda SOD enzim aktivitesinin orta barsakta artış gösterdiği bildirilmiştir (Suganya ve ark., 2016). *G. mellonella* ile yapılan bir çalışmada, larvaların Krom (Cr) ve kurşunun (Pb) artan konsantrasyonlarında kontrole göre CAT ve SOD enzim aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Wu ve Yi, 2015). Yine *G. mellonella* ile yapılan farklı bir çalışmada larvalara potasyum nitrat uygulaması sonucunda SOD aktivitesinde belirgin bir artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Maguire ve ark., 2017). Dördüncü evre *L. dispar* larvalarında yapılan bir çalışmada beyindeki ve orta barsak dokularındaki Cd biyoakümüülasyonunun, SOD ve CAT enzim aktivitelerini arttırdığı görülmüştür (Perić-Mataruga ve ark. 2019).

Elde ettiğimiz verilere göre *G. mellonella* larvalarının orta barsakta kontrole göre tek başlarına uygulama yapılan Cu ve Zn gruplarının SOD aktivitesinde artış görülürken, yağ dokusunda tüm uygulama gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görülmektedir. *M. posthuma* ile yapılan benzer bir çalışmada CuSO₄ ve Cu NP'nin farklı konsantrasyonlarının SOD aktivitesinde azalma olduğu ve en fazla azalmanın en yüksek konsantrasyonda gerçekleştiği görülmüştür (Gautam ve ark. 2018).

Serbest radikaller hücrel makro moleküllere saldırarak hücrel savunma sistemlerinin aktive olmasına neden olmaktadır. SOD, CAT ve GPx serbest radikal olma potansiyeli olan herhangi bir molekülü ya da diğer radikallerin üretimini tetikleyebilecek herhangi bir serbest radikali nötrleştirmede ilk savunma antioksidanlardır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Bundan dolayı serbest radikallere karşı oksidatif stresin bir sinyali olarak kullanılabilir (Benavides ve ark., 2016). Metaller uzun süre maruz kalmak, organizmalarda metallerin birikmesine neden olmaktadır. Metallerin birikmesi, yüksek süperoksit radikallerinin veya hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi türevlerin oluşumunu artırır dolayısıyla, azalan SOD aktivitesinin nedeninin, SOD enzimine zarar veren

ROT' un aşırı üretilmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Gopi ve ark.,2019).

Yapılan çalışmada *G. mellonella* larvalarının CAT aktivitesi her iki dokuda sadece Cu grubunda artış göstermiştir. Bakır birçok önemli enzimin ayrılmaz bir parçası olmasına rağmen artan bakır konsantrasyonu fenton benzeri reaksiyonlarla oksidatif hasara yol açabilir ya da organizmadaki glutatyon rezervlerini boşaltabilir. (Nikolic ve ark.,2016). Yaptığımız çalışmada karışım halinde uygulanan besin ile beslenen larvaların hem orta barsak hem de yağ dokusundaki SOD ve CAT enzim aktivitelerinde belirgin bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca karışım grubu diğer iki metalle kıyaslandığında her iki dokuda da CAT aktivitesinde azalma gözlenmiştir.

G. mellonella larvalarının CAT aktivitesi Zn ve karışım uygulamalarında kontrole göre belirgin bir düşüş göstermektedir. Yapılan benzer bir çalışmada Benavides ve ark. (2016) 7, 14 ve 21 gün boyunca ZnO ve Al₂O₃ NP maruz bırakılan *Carassius auratus*'da SOD ve CAT aktivitesinde tüm NP konsantrasyonlarında 7-14 gün arasında belirgin artış, 14-21 gün arasında ise belirgin bir azalış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu azalışın kirleticilere maruz kalındığında, enzim aktivitesinin yükselmesine yol açmış olabileceğini, ancak daha yüksek seviyelerde veya sürekli maruz kalındığında, artan oksidatif stresin enzim aktivitesini inhibe ederek savunma mekanizmalarını azaltmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Yapılan farklı bir çalışmada ise Ibrahim ve Ali (2018) ZnO NPs ve AgNPs uygulanmış hint yapraklarının ekstraktı ile beslenen *S. littoralis*'in CAT antioksidan enzim aktivitesinde belirgin bir artış olduğunu gözlemlemiştir. Metallerin farklı boyut, konsantrasyon, uygulanan süre ve başka metallerle birlikte kullanılmasına bağlı olarak bu farklılıkların olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca antioksidan enzim aktivitelerinin türe, gelişme evresine ve dokuya özgü olarak değiştiği de gözlenmiştir (Durmuş, 2007).

Yaptığımız çalışmada tüm uygulama gruplarında GPx aktivitesinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. *Oxya chinensis* de artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak GPx aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Li ve ark., 2005). *G. mellonella* ile yapılan başka bir çalışmada, CuO NP'nün *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusunda SOD aktivitesi azalırken, CAT aktivitesinin artış gösterdiği, GPx aktivitesinde ise belirgin bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. CuO nanopartikülünün antioksidan enzim aktivitelerini indüklediği ve bu enzim aktivitelerinin farklı dokularda reaktif oksijen türlerini nötralize ettiği yorumu yapılmıştır (Tunçsoy ve ark. 2018).

M. domestica'nın ergin dişi ve *Trichoplusia ni* 'nin 4. evre larvaları ile yapılan çalışmada Hg_2Cl_2 ve $HgCl_2$ 'nin SOD ve GPx enzim aktivitelerinde belirgin değişiklikler olduğu saptanmıştır (Zaman ve ark., 1994). Lepidoptera türleri olan *S. litura* ve *A. janata* larvalarına Ag NP uygulamasının sonucunda SOD, CAT ve peroksidaz aktivitelerinde değişiklik olduğu gözlemlenmiştir. Bu değişimin Ag NP oksidatif stresi indüklemesinden kaynaklandığı yorumu yapılmıştır. (Yasur ve Pathipeti, 2015).

Yapılan çalışmada, Cu uygulanmış grupta GPx aktivitesinin diğer iki enzime göre daha düşük olduğu fark edilmiştir. Zn ve karışım uygulamalarında GPx aktivitesinin SOD ve CAT aktivitesine göre bir artış gösterdiği görülmektedir. CAT aktivitesi H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarında daha etkili olup daha düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında GPx enzimi daha etkilidir (Duthie vd. 1989). Bakırın yüksek toksik etkisinden dolayı SOD enziminin aşırı H_2O_2 üretmesiyle CAT enzim aktivitesinin aşırı üretilen H_2O_2 'yi ortadan kaldırmak için arttığı söylenebilir.

G. mellonella larvaları ve farklı canlı türleri ile yapılan çalışmalarda, ağır metallerin dokularda biriktiği ve dokulardaki derişimi kritik değerlere ulaştığında toksik etkilere yol açtığı açıkça görülmektedir. Metaller, bağışıklık ve detoksifikasyon sistemleri gibi bazı doğal böcek direnç mekanizmaları üzerinde doğrudan etkiye sahiptirler.

Yapılan çalışmada, bakır ve çinkonun tek başına ve karışım halinde kullanılması, oksidatif stresin birer göstergesi olan SOD, CAT ve GPx antioksidan enzim aktivitelerinde belirgin artış ve azalışlara neden olmuştur. Bakıra maruz kalan larvalarda SOD ve CAT enzim aktiviteleri her iki dokuda aynı oranda artmış, bu durum hücrede serbest radikallere karşı ilk savunma basamağı olan bu iki enzimin birlikte uyumlu çalıştığını göstermiştir.

Toksisite çalışmaları için basit, ucuz ve hızlı üretilen bir model olan *G. mellonella*'nın yağ doku ve barsaktaki makromoleküllerin olası değişikliklerinin tespit edilmesi ve bu biyokimyasal etkilerin anlaşılması hem arıcılık sektöründe büyük kayıplara neden olan *G. mellonella* ve diğer zararlı türlerle mücadele çalışmalarında zararlı böcek türlerinin popülasyonlarının güvenli bir şekilde kontrol edilebilmesine hem de hedef olmayan canlılara ve çevreye daha az olumsuz etkisi olan yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada, *G. mellonella* larvalarının, bakır ve çinkonun farklı konsantrasyonlarıyla tek başlarına ve karışım halinde beslenmeleri durumunda orta barsak ve yağ dokusundaki antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler belirlenmiştir.

Bakır ve çinkonun tek başına ve karışım halinde kullanıldığında orta barsak ve yağ dokuda oksidatif strese neden olduğu, oksidatif stresin birer göstergesi olan SOD, CAT ve GPx antioksidan enzim aktivitelerindeki belirgin azalış ve artışlarla tespit edilmiştir.

G.mellonella larvalarının memelilerin verdiği tepkilere benzer durum göstermesi, in vitro koşullarda kolay yetiştirilebilmesi ve geniş larva gruplarının kullanılabilmesi açısından araştırmaların istatistiksel gücünü arttırmakta ve araştırmalarla ilgili maliyeti azaltmaktadır. Bu nedenle insan akut toksisite, bakteriyel ve fungal patojenite, antimikrobiyal farmokinetik etkilerinin araştırılması çalışmalarında omurgalılara alternatif olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır.

Ağır metallerin böcek fizyolojisinde önemli bir parametre olan, antioksidan savunma sistemine olan etkilerinin araştırılması ileride yapılacak birçok genotoksik, fizyolojik ve toksikolojik çalışmalara katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Aebi, H.1984. "Methods in Enzymology,Volume 105, 1984, Pages 121-126<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>.
- Ahamed, M. 2010. "Silver Nanoparticles Induced Heat Shock Protein 70, Oxidative Stress and Apoptosis in Drosophila Melanogaster." *Toxicology and Applied Pharmacology* 242(3): 263–69. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X09004542>.
- Arakawa, T.. 1994. "Superoxide Generation in Vitro in Lepidopteran Larval Haemolymph." *Journal of Insect Physiology* 40(2): 165–71. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022191094900884>.
- Babior, B. M. 2000. "Phagocytes and Oxidative Stress." *American Journal of Medicine* 109(1): 33–44.
- Baghban, A., Jalal, J.S., Arash, Z., Roya K.. 2014. "Effect of Heavy Metals (Cd, Cu, and Zn) on Feeding Indices and Energy Reserves of the Cotton Boll Worm *Helicoverpa Armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)." *Journal of Plant Protection Research* 54(4): 367–73.
- Barondeau, D.P., Carey, J. K.,Cami, K. B., John, A. T., Elizabeth, D. G., 2004. "Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism†." *Biochemistry*43(25):8038–47.<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi0496081>.
- Benavides, M., 2016. "Single and Combined Effects of Aluminum (Al₂O₃) and Zinc (ZnO) Oxide Nanoparticles in a Freshwater Fish, *Carassius Auratus*." *Environmental Science and Pollution Research* 23(24): 24578–91. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>.
- Bi, J. L. ve Felton, G. W.. 1995. "Foliar Oxidative Stress and Insect Herbivory: Primary Compounds, Secondary Metabolites, and Reactive Oxygen Species as Components of Induced Resistance." *Journal of Chemical Ecology* 21(10): 1511–30. <http://link.springer.com/10.1007/BF02035149>.

- Blagojevic, D.P., Grubor-Lajsic, G. 2000. "Multifunctionality of Antioxidant System in Insects. A Review." *Arch. Biol. Sci.* 52, 185e194. 52: 185–94.
- Boardman, L. 2012. "Reactive Oxygen Species Production and Discontinuous Gas Exchange in Insects." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279(1730): 893–901.
- Bradford, M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72(1–2): 248–54. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269776699996>.
- Bremner, I. 1974. "Heavy Metal Toxicities Quart." *J. Biophys.* 7: 74–124.
- Broering E.P., Phan T. T., Eric M. G. ve Todd C. H., 2013. "Synthetic Analogues of Nickel Superoxide Dismutase: A New Role for Nickel in Biology." *Biochemistry* 52(1): 4–18. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi3014533>.
- Bronksil, J.F. 1961. "A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria Mellonella* (Pyralidae)." *Journal of Lepidopteran Society*: 102–4.
- Çaylak, E.. 2011. "Hayvan ve Bitkilerde Oksidatif Stres Ile Antioksidanlar." *Tip Araştırmaları Dergisi* 9(1): 73–83.
- Chelikani, P., I. Fita, Loewen, P. C.. 2004. "Diversity of Structures and Properties among Catalases." *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61(2): 192–208. <http://link.springer.com/10.1007/s00018-003-3206-5>.
- Cook, S. M., McArthur, J.D.. 2013. "Developing *Galleria Mellonella* as a Model Host for Human Pathogens." *Virulence* 4(5): 350–53. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.25240>.
- Dow, J.A.T. 2017. "The Essential Roles of Metal Ions in Insect Homeostasis and Physiology." *Current Opinion in Insect Science* 23: 43–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.07.001>.
- Dubovskiy, I.M., Martemyanov, V.V., Vorontsova, Y.L., Rantala, M.J., Gryzanova, E.V., Glupov, V.V., 2008. Effect of Bacterial Infection on Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation in the Midgut of *Galleria mellonella* L. Larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 148:1-5.

- Dufernez, F., Cédric, Y., Delphine, G., Christophe, N., Mélanie, C., René, W., Virginia, P.E., Monique, C., Fred R.O., Eric, V. 2006. "The Presence of Four Iron-Containing Superoxide Dismutase Isozymes in Trypanosomatidae: Characterization, Subcellular Localization, and Phylogenetic Origin in Trypanosoma Brucei." *Free Radical Biology and Medicine* 40(2): 210–25.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584905003837>.
- Duthie, G. G., Wahle, K. W. J., James, W. P. T.. 1989. "Oxidants, Antioxidants and Cardiovascular Disease." *Nutrition Research Reviews* 2(1): 51–62.
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422489000089/type/journal_article.
- Felton, Gary W., Summers, C.B.. 1995. "Antioxidant Systems in Insects." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 29(2): 187–97.
- Fridovich, I. 2013. Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition *Superoxide Dismutase*. 2nd ed. Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00129-8>.
- Gautam, A., 2018. "Immunotoxicity of Copper Nanoparticle and Copper Sulfate in a Common Indian Earthworm." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148(May 2017): 620–31.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>.
- Gavrilović, A. 2017. "Effects of Benzo[a]Pyrene Dietary Intake to Antioxidative Enzymes of Lymantria Dispar (Lepidoptera: Lymantriidae) Larvae from Unpolluted and Polluted Forests." *Chemosphere* 179: 10–19.
- Gill, S. ve Narendra, T.. 2010. "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909–30.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942810001798>.
- Gomes, T. 2012. "Effects of Nanoparticles Exposure in the Mussel Mytilus Galloprovincialis." *Faculdade De Ciências E Tecnologia*.

- Gongqing, W., Yunhong, Y., 2015. "Effects of Dietary Heavy Metals on the Immune and Antioxidant Systems of *Galleria Mellonella* Larvae." *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 167: 131–39.
- Gonzalez-Rey, M., 2014. "Effects of Active Pharmaceutical Ingredients Mixtures in Mussel *Mytilus Galloprovincialis*." *Aquatic Toxicology* 153: 12–26. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X14000563>.
- Gopi, N., 2019. "Chronic Exposure of *Oreochromis Niloticus* to Sub-Lethal Copper Concentrations: Effects on Growth, Antioxidant, Non-Enzymatic Antioxidant, Oxidative Stress and Non-Specific Immune Responses." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 55(December 2018): 170–79. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>.
- Greenwald, R. A., 1985. *Handbook Methods For Oxygen Radical Research*. CRC Press. <https://www.taylorfrancis.com/books/9781351072922>.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. 1999. "Oxidative Stress: Adaptation, Damage, Repair and Death." In *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford: Oxford University Press, 246–350.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín T., 2002. "Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133(4): 537–56. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045602000807>.
- Ibrahim, A.M.A. ve Ali, M. A., 2018. "Silver and Zinc Oxide Nanoparticles Induce Developmental and Physiological Changes in the Larval and Pupal Stages of *Spodoptera Littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)." *Journal of Asia-Pacific Entomology* 21(4): 1373–78. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.10.018>.
- Ighodaro, O.M. ve Akinloye, O.A., 2018. "First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid." *Alexandria Journal of Medicine* 54(4): 287–93.

- Kale, M., Rathore N., John, S., Bhatnagar, D.. 1999. "Lipid Peroxidative Damage on Pyrethroid Exposure and Alterations in Antioxidant Status in Rat Erythrocytes: A Possible Involvement of Reactive Oxygen Species." *Toxicology Letters* 105(3): 197–205.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427498003993>.
- Kasting, J. F. 2002. "Life and the Evolution of Earth's Atmosphere." *Science* 296(5570): 1066–68.
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1071184>.
- Kayali, R.. 2006. "Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi." : 162–67.
- Khargarot, B. S., Ray P. K., Chandr H.. 1987. "Daphnia Magna as a Model to Assess Heavy Metal Toxicity: Comparative Assessment with Mouse System." *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 15(4): 427–32.
<http://doi.wiley.com/10.1002/aheh.19870150415>.
- Kim, E.J., Kim, H.P., Hah, Y.C., Roe, J.H. 1996. *European Journal of Biochemistry* (241): 178–185.
- Kirkman, H. N., Gaetani, G.F.. 2007. "Mammalian Catalase: A Venerable Enzyme with New Mysteries." *Trends in Biochemical Sciences* 32(1): 44–50.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000406003203>.
- Kwadha, C. A., George, O., Ayuka, T. F., 2018. "The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria Mellonella*." *Insects* 8(2): 1–17.
- Lange, A. et al. 2018. "Genome Sequence of *Galleria Mellonella* (Greater Wax Moth)." *Genome Announcements* 6(2): 1–2.
- Lawrence, R. A. ve Burk, R.F.. 1976. "Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71(4): 952–58.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X76907476>.

- Li, L., Xuemei, L., Yaping, G., Enbo, M.. 2005. "Activity of the Enzymes of the Antioxidative System in Cadmium-Treated *Oxya Chinensis* (Orthoptera Acridoidae)." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20(3): 412–16. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668905000931>.
- Maguire, R., Kunc, M., Hyrsl, P., Kavanagh, K.. 2017. "Analysis of the Acute Response of *Galleria Mellonella* Larvae to Potassium Nitrate." *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 195: 44–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.02.007>.
- McCord, J. M. ve Fridovich, I.. 1969. "Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocuprein)." *The Journal of biological chemistry* 244(22): 6049–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>.
- Mercan, U. 2004. "Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi." *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15(1): 91–96.
- Nice, D. 1997. Antioxidant based nutraceuticals. Pages 105–123 in M. Yalpani, ed. New technologies for healthy foods & nutraceuticals. Science Publishers, Shrewsbury, MA
- Nikolić, T. V., Danijela, K., Snežana, O., Darko, B., Elvira, V., Duško, P., Jelena, P.. 2016. "The Impact of Sublethal Concentrations of Cu, Pb and Cd on Honey Bee Redox Status, Superoxide Dismutase and Catalase in Laboratory Conditions." *Chemosphere* 164: 98–105.
- Okado-Matsumoto, A. ve Fridovich, I.. 2001. "Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver." *Journal of Biological Chemistry* 276(42): 38388–93. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M105395200>.
- Okçu, M., Tozlu, E., Kumlay, A.M., Pehlivan, M.. 2009. "Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri." *Iğdır Üniversitesi*.

- Orr, W. C., Mockett, R. J., Benes, J. J., Sohal, R. S.. 2003. "Effects of Overexpression of Copper-Zinc and Manganese Superoxide Dismutases, Catalase, and Thioredoxin Reductase Genes on Longevity in *Drosophila Melanogaster*." *Journal of Biological Chemistry* 278(29): 26418–22. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M303095200>.
- Özbolat, G., Tuli, A.. 2016. "Ağır Metal Toksisitesinin İnsan Sağlığına Etkileri." *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 25(23783): 502–21.
- Pelgrom, S.M.G.J., Lamers, L.P.M., Lock, R.A.C., Balm, P.H.M., Wenendelaar B. S.E., 1995. Interactions between Copper and Cadmium Modify Metal Organ Distribution in Mature Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Environmental Pollution*, 90 (3), 415-423.
- Perić-Mataruga, V. 2019. "Parameters of Oxidative Stress, Cholinesterase Activity, Cd Bioaccumulation in the Brain and Midgut of *Lymantria Dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Caterpillars from Unpolluted and Polluted Forests." *Chemosphere* 218: 416–24.
- Pisoschi, A., Pop A.. 2015. "The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review." *European Journal of Medicinal Chemistry* 97: 55–74.
- Radi, R.. 1991. "Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria." *The Journal of biological chemistry* 266(32): 22028–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1657986>.
- Raymond, J.. 2006. "The Effect of Oxygen on Biochemical Networks and the Evolution of Complex Life." *Science* 311(5768): 1764–67. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1118439>.
- Rodrigues, A. 2008. "Bioavailability of Heavy Metals and Their Effects on the Midgut Cells of a Phytophagous Insect Inhabiting Volcanic Environments." *Science of the Total Environment* 406(1–2): 116–22.

- Sezer, T. B., Tuncsoy, M., Gomes, T., Sousa, V., Teixeira, M.R., Bebianno, M.J., Ozalp, P. 2018. "Effects of Copper Oxide Nanoparticles on Tissue Accumulation and Antioxidant Enzymes of *Galleria Mellonella* L." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102(3): 341–46. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-018-2529-8>.
- Shu, Y., Yan, D. ve Wang, J.. 2012. "Molecular Characterization and Expression Patterns of *Spodoptera Litura* Heat Shock Protein 70/90, and Their Response to Zinc Stress." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 158(1): 102–10. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643310004770>.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., Jones, D.T.. 1994. "Effects of Cadmium, Copper, Lead and Zinc on Growth, Reproduction and Survival of the Earthworm *Eisenia Fetida* (Savigny): Assessing the Environmental Impact of Point-Source Metal Contamination in Terrestrial Ecosystems." *Environmental Pollution* 84(2):123–30. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0269749194900949>.
- Staerck, C., 2017. "Microbial Antioxidant Defense Enzymes." *Microbial Pathogenesis* 110: 56–65.
- Suganya, M., Sengodan, K., Muthugounder, S. S., 2016. "Effect of Cadmium and Lead Exposure on Tissue Specific Antioxidant Response in *Spodoptera Litura*." *Free Radicals and Antioxidants* 6(1):90–100. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>.
- Sun, H., 2011. "The Effect of Dietary Nickel on the Immune Responses of *Spodoptera Litura* Fabricius Larvae." *Journal of Insect Physiology* 57(7):954–61. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191011001041>.
- Switala, J., Loewen, P.C.. 2002. "Diversity of Properties among Catalases." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 401(2): 145–54. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986102000498>.

- Tkachenko, H., Kurhaluk, N.. 2012. "Pollution-Induced Oxidative Stress and Biochemical Parameter Alterations in the Blood of White Stork Nestlings Ciconia Ciconia from Regions with Different Degrees of Contamination in Poland." *Journal of Environmental Monitoring* 14(12): 3182. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>.
- Tuncsoy, S. B., Ozalp, P. 2016. "Combined effects of pyriproxyfen and bacillus thuringiensis on antioxidant activity of hemolymph, midgut and fatbody of G. mellonella larvae." *Fresenius Environmental Bulletin* 25(5): 1661–66.
- Turrens, J. F. 2003. "Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species." *The Journal of Physiology* 552(2): 335–44. <http://www.jphysiol.org/cgi/doi/10.1113/jphysiol.2003.049478>.
2018. 10–15 Comprehensive Toxicology: Third Edition *Superoxide Dismutase and Catalase*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.01968-1>.
- Turrens, J.F. 2018. "Superoxide Dismutase and Catalase." In *Comprehensive Toxicology*, Elsevier, 251–59. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128012383019681>.
- Turrens, J. F. 2018. "Reactive Oxygen Species." In *Encyclopedia of Biophysics*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1–5. http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-35943-9_49-1.
- Turrens, J.F., McCord, J.M.. 2006. "The Iron-Containing Superoxide Dismutases of Trypanosomatidae." *Free Radical Biology and Medicine* 40(2): 193–95.
- Valko, M., 2007. "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1): 44–84. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272506002196>.
- Weiss, G., Carver, P. L.. 2018. "Role of Divalent Metals in Infectious Disease Susceptibility and Outcome." *Clinical Microbiology and Infection* 24(1): 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.018>.

- Wilkinson, S. R., Radhika, S.P., Martin C.T., Aiyaz A., David H., John M.K., 2006. "Functional Characterisation of the Iron Superoxide Dismutase Gene Repertoire in Trypanosoma Brucei." *Free Radical Biology and Medicine* 40(2): 198–209.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584905003849>.
- Yasur, J., Pathipati, U. R. 2015. Lepidopteran insect susceptibility to silver nanoparticles and measurement of changes in their growth, development and physiology. *Chemosphere* 124 92–102
- Yazgan, B. ve Yazgan, Y. 2014. "Antioksidan Redoks Sistemi Üzerinde Metallothionein ve Çinko İlişkisinin Önemi Importance of Relationship Metallothioneins and Zinc." *Med J SDU* 23(3): 104–11.
- Yoshikawa, H. ve Ohta H. 1982. "Interaction of Metals and Metallothionein." *Developments in toxicology and environmental science* 9: 11–23.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7053960>.
- Youn, H.D., Kim E.J., Roe J.H., Hah Y.C. ve Kang S.O. 1996. "No Title." *Biochemical Journal* 318: 889–896.
- Zaman, K., 1994. "An Insect Model for Assessing Mercury Toxicity: Effect of Mercury on Antioxidant Enzyme Activities of the Housefly (*Musca Domestica*) and the Cabbage Looper Moth (*Trichoplusia Ni*)." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26(1): 114–18.
- Zámocký, M. ve Franz K.. 1999. "Understanding the Structure and Function of Catalases: Clues from Molecular Evolution and in Vitro Mutagenesis." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 72(1): 19–66.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079610798000583>.
- Zelko, I. N., Thomas J. M., Rodney J. F., Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD(SOD1), Mn(SOD2), and EC-SOD(SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 33, No. 3, pp. 337–349, 2002

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Adana’da doğdum. İlköğrenimimi Adana Çukurova Özel Bilfen İlkokulu’nda, ortaöğrenimimi Gazi Ortaokulu’nda, lise öğrenimimi Adana Özel Başkent Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazandım.2011-2014 yılları arasında Viyana Üniversitesinde Biyoloji bölümünde öğrenim gördüm.2014-2017 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimini tamamlayarak mezun oldum. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladım.