

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa ÖNEL

Galleria mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae)
**LARVALARINDA ALÜMİNYUM OKSİT'İN ANTİOKSİDAN
ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA- 2021

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) LARVALARINDA ALÜMİNYUM OKSİT'İN ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Mustafa ÖNEL

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

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÖZALP
Yıl: 2021, Sayfa: 65
Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÖZALP
: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SULANÇ
: Dr. Öğr. Üyesi Benay TUNÇSOY

Yapılan çalışmada, *G. mellonella* L. Büyük bal mumu güvesi (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının, alüminyum oksit(Al_2O_3)'in farklı konsantrasyonlarına (10 ppm , 50 ppm ve 100 ppm) ve sürelerle(2 , 4 ve 8 saatlik) maruz bırakıldığında orta barsak ve yağ dokudaki SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Al_2O_3 uygulama gruplarında, *G. mellonella* larvalarının orta barsak ve yağ dokudaki enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak belirgin değişimler gözlenmiştir.

10 ppm uygulama grubunda her iki dokuda da SOD ve GPx aktiviteleri 2 saatlik süre sonunda kontrole göre azalmıştır. 4 saatlik süre sonunda ise kontrole göre istatistiksel bir farklılık görülmemiştir. 50 ppm konsantrasyonda orta barsaktaki SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri 2 ve 8 saatlik sürelerde kontrole göre artış göstermiştir. Yağ dokuda ise 2 saatlik uygulama süresinde üç enzim aktivitesinde azalırken 8 saatlik süre sonunda SOD ve CAT aktivitesinde azalma görülmüştür. 100 ppm uygulama grubunda 4 saatlik süre sonunda SOD CAT ve GPx aktiviteleri her iki dokuda da kontrole göre artış göstermiştir. 2 saatlik süre sonunda ise orta barsakta incelenen tüm enzim aktivitelerinde azalma görülürken, yağ dokuda SOD ve GPx aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Al_2O_3 çözeltisinin *G. mellonella* larvalarının orta barsak ve yağ dokusunda oksidatif strese neden olduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler : Alüminyum oksit, *Galleria mellonella*, Antioksidan enzimler

ABSTRACT

MSc THESIS

EFFECTS OF Al_2O_3 ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera Pyralidae) LARVAE

Mustafa ÖNEL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Asst. Prof. Dr. Pınar ÖZALP
Yıl: 2021, Sayfa: 65
Jüri : Asst. Prof. Dr. Pınar ÖZALP
: Asst. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ
: Asst. Prof. Dr. Benay TUNÇSOY

In this study, the effects of aluminum oxide at different concentration (10 ppm, 50 ppm and 100 ppm) and period of time (2, 4 and 8 hours) were investigated *G. mellonella* L. Great wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) on SOD, CAT, GPx enzyme activities in the midgut and fat body of the larvae. In Al_2O_3 applications, significant changes were statistically observed in the antioxidant enzyme activities of the midgut and fat body of *G. mellonella* larvae. SOD and GPx activities in both tissues in the 10 ppm application groups decreased at the end of the 2-hour period compared to the control and there is no statistical difference compared to the control at the end of the 4 hour period. SOD, CAT and GPx enzyme activities in the midgut at 50 ppm concentration increased at the 2nd and 8th hours compared to the control. While three enzyme activities decreased in fat body in the 2-hour application period, a decrease in SOD and CAT activity was observed at the end of the 8-hour period. At the end of the 4-hour period in the 100 ppm application group, there was an increase in SOD CAT and GPx activities in both tissues compared to the control. In the 2-hour period, a decrease in all enzyme activities in the midgut, and a decrease in SOD and GPx activities in fat body were observed. According to the results, it was observed that Al_2O_3 solution induced oxidative stress in the midgut and fat body of *G. mellonella* larvae.

Keywords: Aluminum oxide, *Galleria mellonella*, Antioxidant enzymes

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Endüstriyel devrim ile başlayan sanayileşmenin bir sonucu olarak metal kirliliği günümüzde gelişen birçok ülkenin önemli çevresel sorunlarından biridir. Temel kaynağını ağır sanayi kuruluşları, fosil yakıtların kullanımı, madencilik ve (Florea ve Büsselberg, 2006) toksik metallerin biyolojik faaliyetlerinin ortadan kaldırılamaması neticesinde organizmada birikmelerinden dolayı birçok canlı için tehlike oluşturmaktadır (Linde ve ark., 1996).

Doğada çeşitli ortamlarda yaşayan böcekler, kuşlar ve memeliler gibi birçok organizma için önemli protein kaynağı olduğundan ekosistemdeki besin zincirinde önemli rol oynarlar (Zhang ve ark., 2009). Böceklerin fizyolojik toksisite sonucu çok miktarda metalleri vücudunda biriktirdikleri gösterilmiştir (Hsu ve ark., 2006). Ayrıca besin zinciri yoluyla bu metallerin böceklerden diğer canlı organizmalara transfer edildiği bilinmektedir (Zheng ve ark., 2008). Çevresel metal kirliliğinde bazı predatör böcekler yüksek miktarda metal biriktirebilme yeteneklerinden dolayı ağır metal kirliliğinde biyoindikatör tür olarak kullanılmaktadır (Nummelin ve ark., 2007). Bu nedenle böcekler de dahil olmak üzere birçok omurgasız hayvan, metallerin toksisitesini incelemek ve çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmek için iyi bir model organizma olarak kabul edilmiştir. (Wu & Yi, 2015).

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 Bronksill (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 son dönem larvalarına, alimünyum oksitin farklı konsantrasyonları enjeksiyon ile uygulanmıştır. Larvalar %95'lik etanol ile steril

edildikten sonra arka bacağa Hamilton enjektörü ile 10 ppm, 50 ppm ve 100 ppm'lik Al_2O_3 çözeltisi enjekte edilmiştir. Al_2O_3 çözeltisinin farklı konsantrasyonları (10 ppm ,50 ppm ve 100 ppm) larvalara enjeksiyondan sonra 2, 4 ve 8 saatlik sürelerle maruz bırakılmıştır. Kontrol grubundaki larvalara ise sadece distile su enjekte edilmiştir. Kontrol ve uygulama grupları belirtilen süreler sonunda disekte edilerek barsak ve yağ dokuları alınıp incelenmiştir.

Yapılan çalışma ile Al_2O_3 karışımlarının (10,50 ve 100 ppm) larvalarda oksidatif strese neden olduğu, oksidatif stresin belirteci olan CAT, SOD ve GPx enzim aktivitelerindeki belirgin değişimler ile tespit edilmiştir.

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit anyon radikalleri ve reaktif oksijen türlerine karşı önemli bir antioksidan savunma sistemidir. SOD bir süperoksit radikalini O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer bir süperoksit radikalini ise daha az reaktif bir molekül olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini katalize etmesini sağlayan bir enzimdir(Sanyal ve ark., 2009). SOD enziminin etkisi ile oluşan ve hücre için toksik olan hidrojen peroksit (H_2O_2) CAT enzimi sayesinde oksijen ve suya dönüştürülmektedir (Valko, vd.,2007;Singh, vd.,2009).

Yapılan çalışmada, alüminyum oksitin *G. mellonella* larvalarına enjeksiyon yöntemiyle farklı derişim ve sürelerde uygulanması, oksidatif stresin birer göstergesi olan SOD, CAT ve GPx antioksidan enzim aktivitelerinde belirgin artış ve azalışlara neden olmuştur. Alüminyum oksitin yüksek derişimlerinde genelde orta barsak ve yağ dokuda SOD enzim aktivitesi azalış göstermiştir. Metallerin organizmada fazla birikmesi süperoksit radikallerinin ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) oluşumunu arttırır. Böylece SOD aktivitesi artan radikallere paralel olarak azalmış olabilir. Yüksek dozdaki toksisiteye maruz kalan organizmanın artan oksidatif stres karşısında enzim aktivitesinin inhibe edildiğinin göstergesi olabilir. Alüminyum oksitin düşük derişimlerinde SOD aktivitesi yardımı ile bir süperoksit radikalini O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit radikalini ise daha az reaktif bir molekül olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini sağlar. Böylece CAT aktivitesi artan hidrojen peroksit'e bağlı olarak alüminyum oksitin daha düşük derişimlerde

orta barsak ve yağ dokuda aktivitesi artmıştır. Her iki dokunun GPx enzim aktiviteleri genelde kontrole göre azalma göstermiştir.

Laboratuvar ortamında kolay ve hızlı yetiştirilmesi nedeniyle *G. mellonella* toksoloji, fizyoloji gibi pek çok çalışma alanı için model organizma haline gelmektedir. Bu sebeplerle birlikte doğal bağışıklık sisteminin memeliler ile benzer olması ve parazit bir tür olan *G. mellonella*'nın ve diğer zararlı türlerle mücadelede ekosisteme en az olumsuz etkisi olan yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.





TEŞEKKÜR

Her zaman hoşgürüsünü, yardımını , tecrübesini , ilgi ve önerilerini eksik etmeyen Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim öğretim üyelerinden danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Pınar ÖZALP'e teşekkür ederim. Ayrıca Alparslan Türkeş Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğretim Üyesi Benay TUNÇSOY'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.Yüksek lisans öğrenimim boyunca desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Yağmur MEŞE ve Ayşe KARA'ya teşekkür ederim. Her zaman maddi, manevi ve iyi dileklerini esirgemeyen, annem Semra ÖNEL, babam Mahmut ÖNEL'e, hoşgörü ve sabrıyla yanımda olan eşim Naime ÖNEL ile eğitim hayatım boyunca desteklerini hissettiğim dayılarıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLERE	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Ağır Metaller.....	1
1.2. Serbest Radikaller(Oksidanlar)	4
1.2.1. Süperoksid radikali (O_2^-).....	7
1.2.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	7
1.2.3. Hidroksil radikali (OH^-).....	7
1.3. Antioksidanlar.....	8
1.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	8
1.3.2. Enzimatik Antioksidanlar	9
1.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD).....	9
1.3.4. Katalaz (CAT)	10
1.3.5. Glutasyon peroksidaz (GP_x)	11
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. <i>G. mellonella</i> Stok Kültürün Devamlılığı ve Deney Böceklerin Elde Edilmesi	21
3.1.2. Deney Besinlerinin ve Ağır Metal Konsantrasyonlarının Hazırlanması	22

3.2. Metod	24
3.2.1. Dokuların İzolasyonu	24
3.2.2. Dokuların Homojenizasyonu	26
3.2.3. Dokuların Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini	27
3.2.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Tayini	27
3.2.3.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Tayini	29
3.2.3.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Tayini	30
3.2.3.4. Total Protein Miktarının Belirlenmesi	32
3.2.3.5. İstatistiksel Analizler	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. Bulgular	35
4.1.1. SOD Enzim Aktivitesi	35
4.1.2. CAT Enzim Aktivitesi	37
4.1.3. GPx Enzim Aktivitesi	40
4.2. Tartışma	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Reaktif oksijen türleri (ROT).....	6
Çizelge 1.2.	Reaktif nitrojen türleri (RNT).....	6
Çizelge 4.1.	Al ₂ O ₃ Çözeltilerinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak ve yağ doku SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri	36
Çizelge 4.2.	Al ₂ O ₃ Çözeltilerinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak ve yağ dokusundaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	38
Çizelge 4.3.	Al ₂ O ₃ Çözeltilerinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak ve yağ dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Endojen ve ekzojen antioksidanlar	9
Şekil 1.2.	<i>G. mellonella</i> yaşam evresi; Yumurta, Larva, Pupa, Ergin	12
Şekil 3.1.	Cam kavanozda besin ortamında <i>G.mellonella</i> larvaları	21
Şekil 3.2.	<i>G.mellonella</i> L. Son dönem larvaları	22
Şekil 3.3.	<i>G.mellonella</i> larvalarına Al_2O_3 çözeltisi enjekte uygulaması	23
Şekil 3.4.	Ağır metal uygulanan deney grupları ve kontrol grupları	24
Şekil 3.5.	<i>G. mellonella</i> larvasının diseksiyonu	25
Şekil 3.6.	<i>G. mellonella</i> larvasından alınan orta bağırsak ve yağ dokunun ependorf tüplere aktarımı	25
Şekil 3.7.	Ultra turrax ve Ultrasonik homejenizatör	26
Şekil 3.8.	Homojenatların Sephadex® G-25 jel kolonlarında süzme işlemi	27
Şekil 4.1.	Al_2O_3 çözeltilerinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak dokusundaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri	36
Şekil 4.2.	Al_2O_3 çözeltilerinin <i>G. mellonella</i> 'nın yağ dokusundaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri	37
Şekil 4.3.	Al_2O_3 çözeltilerinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak dokusundaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri	39
Şekil 4.4.	Al_2O_3 çözeltilerinin <i>G. mellonella</i> 'nın yağ dokusundaki CAT enzim üzerine etkileri	39
Şekil 4.5.	Al_2O_3 çözeltilerinin <i>G. mellonella</i> 'nın orta barsak dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri	41
Şekil 4.6.	Al_2O_3 çözeltilerinin <i>G. mellonella</i> 'nın yağ dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri	42



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
Al ₂ O ₃	: Alüminyum oksit
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)	: Glutasyon 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

Günümüzde dünya nüfusundaki hızlı artış ve bunun sonucunda ortaya çıkan pek çok sorunun başında çevre kirliliği gelmektedir. Çevre kirliliğini artıran ve ekolojik dengenin bozulmasında rol oynayan endüstri kuruluşları, ağır metalleri işlemekte ve bu metallerin gaz halleri atmosfere, hidrosfere ve pedosfere kadar ulaşmaktadır. Metal kontaminasyonu dünya genelinde önemli problemlerden biridir (Çetinkaya ve ark., 1999). Doğada toksik özelliğe sahip pek çok metal, çeşitli kaynaklardan ekosisteme yayılmakta ve günümüzde çevre kirliliğinin önemli nedenlerinden biri haline gelmektedir (Goyer, 1991).

Suya veya toprağa karışabilen bazı zararlı maddeler, uzaklaştırabildikleri veya biyolojik olarak ayrıştırılabildikleri halde, metaller uzaklaştırılmazlar ve yüksek miktarlarda birikmeleri sebebiyle kimyasal ve biyolojik süreçleri olumsuz bir şekilde etkilemektedir (Artan ve Keskinan, 2008).

1.1. Ağır Metaller

Krom, kurşun, kadmiyum, demir, nikel, kobalt, çinko, bakır ve civa metalleri gibi yüksek yoğunluğa ve düşük konsantrasyona sahip toksik metaller ‘ağır metal’ olarak bilinmektedir. Metal elementler doğaları gereği yer kürede genelde karbonat, silikat ve sülfür halde veya silikatlara bağlı olarak bulunurlar (Kahvecioğlu ve ark., 2007).

Biyolojik olarak metaller 3 gruba ayrılır (Clark, 1992;Tuncay, 2007):

1. Temel elementler :Sodyum, potasyum, kalsiyum gibi elementler sıvı ortamda katyonlar hareketli olarak taşınırlar.
2. Yan elementler :Düşük konsantrasyonda temel olan fakat yüksek konsantrasyonlarda zararlı etki gösteren elementlerdir. Demir, kobalt, mangan, bakır, vb.

3. İz elementler :Metabolizma faaliyetleri için zorunlu olmayan fakat oldukça düşük derişimlerde, hücre içinde zararlı etki gösteren elementlerdir. Civa, selenyum, kurşun, arsenik, kalay vb.

Bunlara ek olarak Domingo(1998) tarafından Farmakoloji ile ilgili metaller Alüminyum (Al), Lityum (Li) ,Kalsiyum (Ca) şeklinde sınıflandırma yapmıştır. Tıpta tedavi amacıyla kullanılan birçok ilacın yapısında alüminyum bulunmaktadır (Garbossa ve ark.,1996). En çok kullanılan nanopartiküllerden biri olan Al_2O_3 (aluminyum oksit) katalizör olarak (Hanemann ve Szabó, 2010) ve farklı malzemelerin mekanik özelliklerini geliştirmek için malzeme bilimlerinde yaygın bir kullanıma sahiptir (Nazari ve ark., 2010).

Alüminyum, litosferde metalik halde bulunmaz. Flor ve oksijen diğer elementlerle birleşmiş şekillerde topraklarda ve kayalarda bulunur. Yer kabuğunun % 8'ini teşkil eder (Campbell ve ark., 1957). Yer kabuğunda oksijen ve ve silikondan sonra en çok miktarlarda bulunan üçüncü element olan Alüminyum (Al) yüksek yansıtma özelliği, hafif ağırlığı, işlenebilirliği, esnekliği , oksidasyona dayanıklılığı, ısı ve elektrik iletkenliği ve üstün bariyer kalitesi nedeniyle paketlenme malzemesi, taşıma, ev eşyaları ve ilaçlar başta olmak üzere sanayide yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Müller ve ark.,1998 ;Joshi ve ark.,2003).

Tüm canlı organizmalar yaşamlarını devam ettirebilmek için Sn,Co, Cd, Zn,Cu,Cr, Mo, Mn, Ni,Se ve Fe gibi metallere gereksinim duyarlar. Bu metaller proteinlerle ve organik moleküller birleşerek metal-protein komplekslerini meydana getirirler. Hemosiyanin ve hemoglobin gibi oksijen taşıyıcıları metaloproteinler olup Fe ve Cu barındırırlar. Bununla birlikte ağır metaller bir çok enzim yapısında bulunurlar (Johnston, 1976; Gerlach, 1981). Ağır metallerden bazıları insan ve hayvanlar için esansiyel iken bazıları ise belli miktarların üzerinde vücuda alındığı zaman çeşitli sağlık problemlerini meydana getirmektedir (Yazgan, 2001).

Metallerin zehirleyici etkileri; metalin kimyasal formuna, biyolojik bulunurluğuna, alımın şekline, metalin metabolizmasına ve aksiyon etkisine, metalin akut ve kronik etkisine, toksik etkisini göstereceği hedef bölgeye, diğer metallerle etkileşimine, genetik adaptasyonlara diğer metallerle etkileşimine ve hücre içi fizyolojik süreçlere(solunum, fotosentez gibi) bağlıdır (Patra ve ark., 2004). Ağır metallerin bu toksisite mekanizmaları önemli moleküllerin fonksiyonel gruplarını engelleyerek, hücresel bölgelerdeki gerekli iyonları çıkartarak ya da onlarla yer değiştirerek, enzimleri denatüre ya da inaktive ederek, hücre ve organellerin membran bütünlüğünü bozarak toksik etkilerini göstermektedirler. Aynı zamanda bu metaller, serbest radikal oluşumuna neden olarak da toksik etkilerini göstermektedirler (Mallick, 2004). Değişik habitatlarda yaşamını sürdüren böcekler; memeliler ve kuşlar gibi birçok hayvan için önemli bir Böceklerin fizyolojik toksisite sonucu çok miktarda metalleri vücudunda biriktirdikleri gösterilmiştir (Hsu ve ark., 2006). Dahası besin zinciri yoluyla bu metallerin böceklerden diğer canlı organizmalara transfer edilebilmektedir (Zheng ve ark., 2008). Biyolojik birikime neden olan maddelerin suda değil de yağda protein kaynağı olduğundan dolayı ekosistemdeki besin zincirinde önemli bir yere sahiptir (Zhang ve ark., 2009).

Böceklerin fizyolojik toksisite sonucu çok fazla miktarda metalleri vücudunda biriktirdikleri belirtilmiştir (Hsu ve ark., 2006). Ayrıca besin zincirinde bu metallerin böceklerden diğer canlı organizmalara transfer edilebilmektedir (Zheng ve ark., 2008). Biyolojik birikime neden olan maddelerin suda değil de yağda çözünüyor olması birçoğunun hayvansal yağ dokularında birikmesiyle pek çok maddenin biyolojik ya da kimyasal parçalanmanın olmaması veya geç olmasıyla, besin zincirine enerji 2 döngüsünün bu ağır metal toksitesini dışarı atmakta yetersiz kalmasıyla canlı dokularda istenmeyen birikime neden olur. Besin zinciri yoluyla üst kademelere çıkıldıkça bu birikimin arttığı görülmektedir (Uysal ve Taner, 2010).

Biyolojik çeşitliğin en önemli faktörlerden birisi olan böceklerin ekolojik alanlarda büyümelerini ve gelişimlerini etkileyen biyolojik ve biyolojik olmayan farklı etkenlerin olduğu bilinmektedir. Böceklerin gelişim döneminde maruz kaldıkları önemli faktörlerden birisini de ksenobiyotikler teşkil etmektedir(Wu vd., 2004). Ksenobiyotik terimi vücuda yabancı olan bileşik anlamındadır. Böceklerin ksenobiyotiklere maruz kalmaları, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna ve dolaylı olarak metabolik olayların bozulmasına sebep olmaktadır. Serbest oksijen radikalleri, sahip oldukları paylaşılmamış elektronları sebebiyle yüksek aktiviteye sahip olan atom ve moleküllerdir. Bu radikaller hücre zarının doymamış yağ asitleri ile protein bileşimi üzerine zarar vermektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2007). Hedef organizmalarda, normal metabolizma faaliyetlerinin dışında vücuda dışarıdan alınan kimyasallar, enfeksiyon etkeni mikroorganizmalar (virüs,bakteri parazit vb.), radyasyon ve çevresel stres (su kirliliği, mevsimsel farklılıklar vb.) faktörleri vücutta serbest oksijen radikallerinin artmasına bağlı olarak oksidatif strese neden olmaktadır. Bunun sonucunda, hücrede DNA, karbonhidrat , lipid, protein ve enzimler zarar görebilir (Sies, 1985; 1991; 1997; Halliwell ve Gutteridge, 1999; Sorg, 2004). Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu protein enzim, lipid peroksidasyonu ve DNA oksidasyonu ve glutatyon depleasyonu, böceklerin dokularında oksidatif düzeyde hasara neden olur (Ahmad, 1995). Böceklerde, reaktif oksijen türevlerinin fazla üretilmesi, mideye alınan besinlerin absorpsiyonuna zarar vermekte ve orta barsak hücrelerinde de oksidatif zarara neden olabilmektedir (Bi ve Felton, 1995).

1.2. Serbest Radikaller(Oksidanlar)

Dış yörüngelerinden birinde eşleşmemiş elektron içeren bileşiklere serbest radikal denir. Kısa ve reaktif ömürlüdür. Serbest radikaller, normal bir metabolizmanın devamı olarak veya hücrede enerji üretimi için gerekli olan birçok reaksiyon tarafından üretilmektedir.

Serbest radikaller 3 basamakta oluşmaktadır (Kılınç ve Kılınç, 2002).

- I. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi,
- II. Normal bir molekülün bir elektronun kaybına uğraması,
- III. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi .

Üretilen bu radikaller membran lipitlerine, hücre içi proteinlere ve nükleik asitlere etki ederek bu moleküllerin yapı ve işlevleri üzerinde değişikliklere yol açtığı ve hücre hasar oluşturduğu iyi bilinmektedir.

Organizmadaki serbest radikaller hem eksojen hem de endojen kaynaklar tarafından oluşmaktadır . Serbest radikaller hücrede ve çevrede devamlı üretilmektedir (Ali ve ark., 1996; Bagchi ve Puri, 1998; Cadenas, 1989; Nagendrappa, 2005; Pham-Huy ve ark., 2008; Sarma ve ark., 2010; Sen ve ark., 2010).

Serbest radikal, moleküler ya da atomik yapılarda çiftleşmemiş bir ya da birden fazla tek elektron taşıyan ve genellikle bir elektronunu kaybetmiş olan oksijen atomu bulunduran kararsız moleküllerdir. Yüksek enerjiye sahip olan bu moleküller diğer moleküllerle elektron alışverişi yapabilirler. Bu moleküllere reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilmektedir (Çavdar ve Sifil, 1997). Oksidatif stres; reaktif oksijen türlerinin üretimi ve bozunması arasındaki dengesizliğe dayanan fizyolojik ya da patofizyolojik süreç olarak tanımlanmaktadır (Staerck ve ark., 2017). Oksidatif stresin en önemli nedenlerinden biri serbest radikallerin oluşumudur (Babior, 2000). Serbest radikaller oksijen (Tablo 1) ve nitrojen kaynaklı olabilir (Tablo 2). Oksijen kaynaklı olanlar reaktif oksijen türleri (ROT) ve nitrojen kaynaklı olanlar reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Valko ve ark., 2007).

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen türleri (ROT)

Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO^{\cdot}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil	$HO_2^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipid peroksil	$LOO^{\cdot}$		

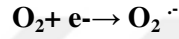
Çizelge 1.2. Reaktif nitrojen türleri (RNT)

Radikaller		Nonradikaller	
Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	Dinitrojen tetroksid	N_2O_4
Nitrojen dioksit	$NO_2^{\cdot}$	Peroksinitrit	$ONOO$
		Dinitrojen triksid	N_2O_3
		Nitrosil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Peroksinitrik asit	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Nitril klorid	NO_2Cl
		Nitrik asit	HNO_3

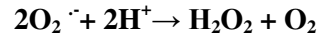
Atmosferde bulunan oksijen, moleküler oksijen (O_2) veya dioksijen olarak isimlendirilir. Normal oksijenin az bir kısmı başlıca mitokondri olmak üzere hücresel kompartımanlardaki metabolizma sırasında indirgenerek reaktif oksijen türlerine (ROT) dönüşür. Temel reaktif oksijen türleri Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) ve Hidrojen peroksit (H_2O_2) 'dir. Bunlardan ilk ikisi serbest radikal olup hidrojen peroksit ise prooksidandır (Navarro and Boveris,2004).

1.2.1. Süperoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu meydana gelmektedir . Süperoksid radikali, bazı oksidaz reaksiyonlarında ve elektron taşınım reaksiyonları sırasında oluşmaktadır. Süperoksid radikali, SOD ile katalizlenen enzimatik dismutasyon reaksiyonu ile detoksifiye edilmektedir (Halliwell ve ark, 1992).

**1.2.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)**

Moleküler oksijenin, çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksit radikalının bir elektron alması sonucu peroksiti meydana getirmektedir. Peroksit molekülü iki hidrojen atomuyla birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturmaktadır . H_2O_2 uzun ömürlü, membranlardan geçebilen bir oksidandır. Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi, süperoksit radikalının dismutasyonu ile olmaktadır (Halliwell ve ark., 1992).

**1.2.3. Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)**

Hidroksil radikali, hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle oluşmaktadır. Son derece reaktif bir oksidan molekülü olup yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştugu yerde büyük hasarlara neden olmaktadır. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına yol açmaktadır (Halliwell ve ark, 1992).



1.3. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek , bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önleyerek ve detoksifikasyon oluşumunu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” denir (Şener ve Yeğen, 2009). Antioksidanlar, radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler olarak bilinmektedir (Dündar ve Aslan,1999). Antioksidanların görevleri arasında serbest radikallerin fazlasını etkisiz hale getirmek toksik etkilere karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı sağladığı bilinmektedir (Pham-Huy ve ark., 2008).

1.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, eksojen ve endojen olmak üzere iki grup altında toplanabilir.

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR		NONENZİMATİK
ANTİOKSİDANLAR		
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Urik asit	α -lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin
EKZOJEN ANTİOKSİDANLAR		
VİTAMİN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR	
α -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri(allopürinol,oksisipürinol, pterin aldehit, tungsten)	
β -karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kal- siyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)	
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)	
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferoksamin)	
	Nötrofil adezyon inhibitörleri	
	Sitokinler (TNF ve IL-1)	
	Barbitüratlar	

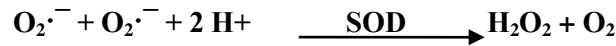
Şekil 1.1. Endojen ve ekzojen antioksidanlar (Aydemir ve Karadağ, 2009; Sen, 2011)

1.3.2. Enzimatik Antioksidanlar

1.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD'lar yüksek katalitik aktiviteye sahip metalloproteinlerdir (Fridovich, 1986). Süperoksit dismutaz (SOD), ROT'lara karşı öncül antioksidan enzimdir.

SOD, süperoksit molekülünün moleküler oksijene ve hidrojen peroksitine karşı dismutasyonunu katalizler. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik bir antioksidan olarak bilinmektedir. Hidrojen peroksit daha sonra, GPx ya da CAT ile ortamdan uzaklaştırılır (Young ve Woodside, 2001).



SOD ve CAT enzimlerinin birlikte bulunması oksidatif stresin etkilerini azaltmaktadır. Çünkü SOD enzimi $O_2^{\cdot-}$ 'in diğer bir reaktif aracı olan hidrojen peroksitine (H_2O_2) dönüştürülmesinde rol alırken, CAT enzimi, H_2O_2 'in suya ve oksijene dönüşmesini sağlar (Kono ve Fridovich, 1983; Liszkay, vd., 2004). SOD, aerobik canlılarda bulunmaktadır ve memelilerde üç ayrı tipi vardır. Bunlar ekstraselüler etki gösteren ECSOD, sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn içeren Cu-Zn SOD ve mitokondride tetramerik Mn içeren Mn-SOD izomerlerdir. SOD'un Fe içeren izomeri Fe-SOD ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. SOD'un bütün tipleri süperoksit dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler (Buettner ve ark, 2006).

1.3.4. Katalaz (CAT)

Her aerobik hücrede CAT enzimi, %80 oranında hücrenin peroksizomlarında bulunurken %20 sitozolde bulunur. CAT enzimi dört alt ünitelerden meydana gelmektedir. Her bir alt ünitesi de bir hem Fe (III) grubu bulunduran 240 000 dalton molekül ağırlığında bir proteinden oluşur. SOD enziminin etkisiyle meydana gelen ve hücre için toksik olan hidrojen peroksit (H_2O_2) CAT enzimi sayesinde su ve oksijene dönüştürülmektedir (Valko, vd., 2007; Singh, vd., 2009). Ancak CAT enziminin aktivite göstermemesi durumunda SOD enzim aktivitesinin artması sonucu H_2O_2 miktarı da artmaktadır ve bunun sonucunda da OH radikalleri oluşmaktadır (Çaylak, 2011). CAT enziminin

reaksiyon hızı oldukça yüksektir ve optimum şartlar altında bir mol CAT enzimi bir dakika içerisinde 500 bin hidrojen peroksidi ayrıştırabilir (Antunes, vd.,2002). Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına ve biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmemesine rağmen, Fe ve Cu iyonlarının katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır (Cheung, vd.,2001; Larson,1988).



1.3.5. Glutasyon peroksidaz (GP_x)

Glutasyon peroksidaz, hücrelerin sitoplazmasında bulunup H_2O_2 'den kaynaklanan oksidatif hasara karşı hücreleri koruyan bir enzimdir . Böylece H_2O_2 'den $\text{OH}^\cdot$ 'nin oluşmasını engeller. Glutasyon peroksidaz, dört protein alt biriminden oluşur. Her bir alt birim bir selenyum atomu içerir(Sen, 2011). Bu nedenle sıklıkla selenosistein peroksidaz olarak da bilinmektedir (Ighodaro ve Akinloye ,2018).

Glutasyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutasyonu (GSH) kullanarak H_2O_2 'yi ve organik hidroperoksitleri (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) metabolize eden bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz enziminin iki ana tipi saptanmıştır. Bunlardan biri aktif bölgesinde selenyum içeren selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz (Se- GP_x)'dır. Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz, H_2O_2 ve organik hiperoksitlere karşı etkilidir. Selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz (GST) ise daha çok organik hidroperoksitlerin metabolize edilmesinde faaliyet gösterir(Cnubben, vd., 2001; Reiter, vd., 1995). Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi Lepidoptera takımına ait türlerde nispeten düşüktür (Tunçsoy, 2016).

Bu metabolize etme reaksiyonları sırasında GSH, hidrojen verici olarak hareket ettiğinden dolayı H_2O_2 ve hidroperoksitler indirgenirken GSH okside olur (Reiter, vd., 1995). Okside glutatyon, glutatyon disülfittir (GSSG). GSH dokularda birbiriyle denge halinde, okside glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) olarak iki şekilde bulunur (Halliwell ve Gutteridge, 1999). GSH, GSH peroksidaz enzimi tarafından okside glutatyon (GSSG) dönüştürülmektedir. Hücrede bulunan glutatyon'un %95'i GSH oluştururken, geri kalan az bir kısmını da okside glutatyon (GSSG) oluşturmaktadır (Reed, 2000).



Çalışmada kullanılan *Galleria mellonella* L. Lepidoptera takımı, Pyralidae familyasına ait holometabol bir böcek olup yumurta, larva, pupa ve ergin yaşam evresine sahiptir (Kwadha ve ark, 2017).



Şekil 1.2. *G. mellonella* yaşam evresi; Yumurta, Larva, Pupa, Ergin

Arıcılık sektörüne ekonomik açıdan büyük zarar veren bir böcektir (Özer, 1961). *G. mellonella* erginleri, yumurtalarını kovanlarda ahşap kısımlardaki çatlaklara bırakırlar. Yumurtadan çıkan genç larvalar petekler içinde tüneller şeklinde oyuklar açarak polen ve bal ile beslenirler. İlerleyen evrelerdeki larvalar ise ördükleri ipeksi ağlarla petekleri birbirine yapıştırarak ve onları tamamıyla yemek suretiyle zarar verirler (Özer, 1961, Ali ve ark., 1973).

Laboratuvar koşullarında kolayca yetiştirilebilmesi sebebiyle, deneysel çalışmalar için oldukça uygun bir model organizmadır (Altınççek ve ark., 2007; Junqueira, 2012).

G. mellonella larvalarının diğerk omurgasızlara göre bazı avantajları vardır. Bu larvalar hızlı bir üreme döngüsüne sahiptir. Yetiştirilmesi açısından kolaydır ve maliyeti de düşüktür. Boyutlarının büyük olması (~2-4 cm) farklı enfeksiyon etkenlerinin ve çeşitli antimikrobiyal ajanların enjeksiyonuna olanak sağlar. Ayrıca immün savunma sistemi memeliler ile benzerlik gösterir ve bu durum enfeksiyon sürecinin izlenmesinde avantaj sağlayabilir(Junqueira,2012).

Çalışmamızda *G. mellonella*'nın son evre larvaları kullanılarak, Al₂O₃'ün farklı derişimlerinin böceklerin önemli detoksifikasyon enzimlerinden olan katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), aktivitelerine olan etkilerinin laboratuvar ortamında araştırılması amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ortel (1995), *G. mellonella* larvalarının besinlerine kurşun(Pb) ve kadmiyum(Cd) eklemiş, larvaların gelişimine ve parazitoidi *Pimpla turionellae*'ya (Hymenoptera: Ichneumonidae) etkilerini araştırmıştır. Yüksek dozlarda pup oluşumunun olumsuz etkilendiğini ve mortalitenin arttığını gözlemlemiştir.

Meşe (2019), yaptığı çalışmada, *G. mellonella* larvalarının, bakır ve çinkonun farklı konsantrasyonlarıyla tek başlarına ve karışım halinde beslenmeleri durumunda orta barsak ve yağ dokusundaki antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimleri belirlemiştir. 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.

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

Canlı (2017), Model deney hayvanı *G. mellonella*'yı kullanarak yaptığı çalışmada, TiO₂ nanopartikülünün hücresel düzeyde toksik etki yarattığını ortaya koymuştur. Çalışma sonuçlarına göre TiO₂ naopartikül dozları uygulanan gruplarda canlı hücre sayısının önemli oranda azaldığını , bu bağlamda TiO₂ nanopartikülünün hücrelere etki ederek DNA hasarı oluşturduğunu düşünmekte ve hücrelerdeki bu DNA hasarı apoptozu tetikleyerek, hemolenfteki canlı hücre sayısını azaltabileceğini belirtmiştir. TiO₂ (titanyumoksit) nanopartikülünün *G. mellonella* larvalarının bağışıklık sistemini olumsuz yönde etkilediğini ve hücrelerde genotoksik etkilere neden olduğunu belirtmiştir.

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

Çalık ve ark. (2015), antihelmintik bir ilaç olan mebendazolün dört farklı konsantrasyonunu (% 0,005, 0,05, 0,5 ve 1 g) kullanarak *G. mellonella* 'nın yaşama, gelişme, ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi, yumurta açılımı üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu maddenin böceğin 7. evre larvalarında, pup ve ergin evrelerinde yaşama oranını önemli derecede düşürdüğü, 1 g'lık konsantrasyonun ise böceğin tüm evrelerinde gelişme sürelerini kısalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bu besin (1 g'lık) ile beslenmiş dişilerden hiç yumurta elde edilemediğini belirtmişlerdir.

Yılmaz (2013), *G. mellonella* 'nın alüminyum klorür uygulamasına bağlı olarak, larval ve pupal gelişim süreleri ve ergin yaşam süresinin kısalacağını, ölüm oranlarında, yaş ağırlıklarında ve hemosit sayılarında kontrol gruplarına göre fark olmadığını bulmuş ve uygulamaya bağlı olarak morfolojik anormallik oranında da önemli bir artış olmadığını belirlemiştir. Gelişim ve ergin yaşam sürelerinin kısalması, böceğin stres koşulunda olumsuzlukları yönetebilmesi açısından bir avantaj olarak değerlendirilebileceğini ve elde ettiği sonuçlara göre ; alüminyum klorürün *G. mellonella* için toksik olmadığını ve bu türün alüminyum stresinin meydana getirebileceği olumsuzlukları çok iyi düzenleyebildiğini belirtmiştir.

Zorlu ve ark., (2015), çalışmasında 100, 500, 1000, 3000 ve 5000 ppm dozlarında TiO₂ nanopartikülü, *G. mellonella* larvalarının beslendiği peteklere eklenmiş ve toplam hemosit sayısındaki değişimleri incelemişler ve elde edilen sonuçlara göre 100 ppm dozunda toplam hemosit sayısının önemli miktarda arttığını belirtmişlerdir.

Dere (2015), AZA molekülünün bitkilerden elde edilen sekonder bir metabolit ve allelokimyasal özellikte bir molekül olduğu ve belirtilen bütün sonuçlar ışığında, *G. mellonella* üzerinde larval ve pupal öldürücü etki ile toksik

etkilere sahip olduğu ve özellikle lipid peroksidasyonu ile antioksidan savunma sistemi üzerinde önemli değişikliklere yol açtığını söylemiştir.

Sezer Tunçsoy (2017), çalışmasında kullandığı Pyriproxyfen ve *Bacillus thuringiensis* gibi insektisitlerin *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ doku hücrelerinde membran lipidlerinin oksidatif hasarı sonucunda lipid preoksidasyonuna ve buna bağlı olarak serbest radikallerin oluşumuna neden olduğunu düşünmekte ve SOD, CAT ve GPx aktivitelerinin oluşan bu artışın, serbest radikalleri yok etmek amacıyla meydana geldiğini söylemiştir.

Büyükgüzel ve Kalender (2007, 2008, 2009), böcek beslenmesinde yapay besinlere çok uzun yıllar antimikrobiyal kontaminasyonları önlemek amacıyla ilave edilen eski kuşak antibiyotiklerin *G. mellonella* üzerinde oksidatif etkileri çalışılmıştır. Deneyde kullanılan penisilin, streptomisin ve flukonazol gibi antimikrobiyal antibiyotikler larvaların orta bağırsağında önemli oksidatif stres göstergesi olan malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin miktarını ve antioksidan enzimlerden süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini artırdığını belirtmişlerdir.

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

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

Durmuş (2007), Sodyum tetraboratın *G. mellonella* 'nın antioksidan enzimlerine olan etkilerini incelemiş ve sodyum tetraboratın, *G. mellonella* 'daki

MDA miktarındaki artma ile birlikte gelişim süresinin uzamasını ve hayatta kalabilme oranının düştüğünü gözlemlemiştir. Bunun sebebi olarak da larvaların yağ dokularında oluşan oksidatif stres sonucuna bağlı antioksidan savunma mekanizmalarını bozduğunu söylemiştir.

Altuntaş (2015), *G. mellonella* larvaları ile yaptığı bir çalışmada bitki büyüme düzenleyicisi olan giberillik asitin SOD, CAT ve GST aktiviteleri üzerine etkilerini incelemiştir. Düşük dozlarda SOD ve GST aktivitelerinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. Son evre larvaların hemolenfinde CAT aktivitesinde bütün dozlarda (2.000 ve 5.000 ppm) artış gözlenmiştir.

Regan ve Sumen (2010), alüminyumun *Vanessa cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae) üzerindeki etkilerini incelemiştir. Larvaların besinlerine farklı konsantrasyonlarda alüminyum klorür heksahidrat eklemişler ve tüm gelişme sürecinde biyolojilerini ve meydana gelen erginlerin yumurta üretimini araştırmışlardır. Yüksek dozlarda, larvalarda mutasyon ve ölüm oranı artmış, ergin çıkışı azalırken, erginleşen bireylerde mutasyon artışı bulunmuş ve yumurta verimi önemli derecede düşmüştür. Tüm bu olumsuz etkiler dozun yükselmesine paralel olarak artış göstermiştir.

Suganya ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada *Spodoptera litura* larvalarına farklı konsantrasyonlara sahip Cd ve Pb metalleri besin ortamına konularak 24-48 saat sonra antioksidan enzimlerinin etki parametrelerini incelemiştir. Larvalar, 48 saatte Cd 0.3, 0.44 ve 0.50 mg veya Pb 0.48 , 4.8 ve 9.6 mg konsantrasyonları içeren besinlere uygulandıktan sonra antioksidan enzimlerin aktivitesinde değişiklikler yapıldığını tespit etmişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda enzim aktivitelerinin sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında SOD, CAT, GST gibi enzim aktivitelerinin artan konsantrasyonlarda arttığını söylemişlerdir.

Vuori ve Kukkonen (1996), alüminyum, kadmiyum, bakır, kurşun ve çinko gibi ağır metallerin sucul bir böcek türü olan *Hydropsyche pellucidula* (Trichoptera: Hydropsychidae) larvalarında vücut yüzeyindeki dokular tarafından

absorblandığı ve ekzokütikula oluşumunu etkileyerek morfolojik anormalliklere neden olduğu tespit edilmiştir.

Garcia-Medina vd. (2010),Alüminyumun farklı derişimlerine 96 saat süre ile maruz bırakılan *C. carpio*'da lenfosit antioksidan enzim aktivitelerini incelemişler. SOD aktivitesi kontrole göre azalma gösterirken, CAT ve GPx aktiviteleri düzeyinde alüminyum konsantrasyonuna bağlı olarak artışların olduğunu belirtmişlerdir.

Pettersson ve ark. (1985), *Anabaena cylindrica*'da pH değeri 6 olan bir ortamda 3.7 μM ' lık alüminyum uygulamasının büyüme ve nitrogenaz aktivitesini inhibe ettiğini, aynı pH değerinde 180 μM 'lık alüminyum konsantrasyonunun 120 saat sonra büyüme % 50 oranında azalttığını rapor etmişlerdir.

Omurgalılarla yapılan benzer çalışmalarda , Benavides ve ark. (2016), 7, 14 ve 21 gün boyunca ZnO ve Al_2O_3 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.

Shrivastava ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada Al_2O_3 , TiO_2 ve ZnO nanopartiküllerine maruz bırakılan farelerin beyin, karaciğerde ve eritrositlerinde oluşan etkileri gözlemlemişlerdir. Araştırma sonucunda Al_2O_3 , TiO_2 ve ZnO nanopartiküllerinin ROS seviyelerini artırmasına neden olarak antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı değişimlere neden olduklarını bulmuşlardır.Araştırma sonucunda Al_2O_3 , TiO_2 ve ZnO nanopartiküllerinin beyin, karaciğerde ve eritrositlerinde oksidatif strese neden olma bakımından önemli etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda, Al_2O_3 , TiO_2 ve ZnO nanopartiküllerin beyinde de ciddi etkilerinin olabileceğini, özellikle nörotoksik etkiler görülebileceği hakkında yorumlar yapmışlardır. Bir sıralama yapıldığında en fazla etki ZnO tarafından oluşturulurken, bunu Al_2O_3 ve TiO_2 izlemiştir.

Kim ve ark. (2009), Al_2O_3 nanopartikülünün genotoksisitesini belirlemek için uygulama sonrası fare lenfoma hücrelerine canlılık testi, komet testi ve

thymidine kinase gen mutasyon testi uygulamışlardır. Sonuç olarak; Al_2O_3 nanopartikülünün sitotoksik olduğu ve DNA hasarına neden olduğu fakat mutagen etki göstermediği ortaya çıkmıştır.



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, Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvar ortamında kitle üretimi yapılan $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve $\%70\pm5$ bağıl neme sahip ortam koşullarında Bronksil (1961) tarafından belirlenmiş olan yarı sentetik besin ile beslenen stok kültüründen elde edildi. Sentetik besinin hazırlanması için 5 litrelik cam kavanozlara, 2000 ml kepek, 250 ml gliserin, 350 ml petek, 100 ml bal ve 100 ml saf sudan oluşan besin bileşenleri konularak geniş bir kap içerisinde el yardımı ile iyice karıştırıldı. Hazırlanan besin, beş litrelik cam kavanozların yaklaşık 2/3'ne kadar dolduruldu.



Şekil 3.1. Cam kavanozda besin ortamında *G.mellonella* larvaları

İçerisinde besin bulunan cam kavanozların içine bırakılan ergin erkek ve dişi böceklerinin çiftleşmesi sonucunda dişilerin bıraktığı yumurtaların açılmasıyla stok kültürün devamlılığı sağlandı. Yumurtalardan çıkan larvalar gelişimlerini 7 evrede tamamladı.



Şekil 3.2. *G.mellonella* L. Son dönem larvaları

3.1.2. Deney Besinlerinin ve Ağır Metal Konsantrasyonlarının Hazırlanması

G. mellonella (L.)' nin son dönem larvalarına, Alimünyum oksitin farklı konsantrasyonları enjeksiyon metodu uygulandı. Larvalar %95'lik etanol ile silindikten sonra, birinci arka bacak üstünden ince uçlu mikromakas ile delinip, mikropipet ile 10 ppm, 50 ppm ve 100 ppm lik Al_2O_3 çözeltisi enjekte edildi.



Şekil 3.3. *G.mellonella* larvalarına Al_2O_3 çözeltisi enjekte uygulaması

Denemede 180 adet larva kullanıldı. Al_2O_3 çözeltisinin farklı konsantrasyonları (10 ppm , 50 ppm ve 100 ppm) *G.mellonella* larvalarına enjekte edildikten sonra, 2 , 4 ve 8 saatlik sürelerle maruz bırakıldı. Kontrol grubundaki larvalara ise, sadece distile su enjeksiyonu yapıldı. Kontrol ve uygulama grupları belirtilen süreler sonunda diseksiyon yöntemi ile bağırsak ve yağ dokuları alınıp incelendi.

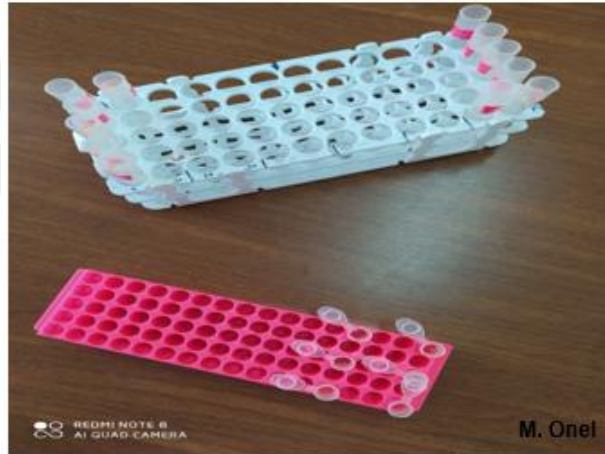


Şekil 3.4. Ağır metal uygulanan deney grupları ve kontrol grupları

3.2. Metod

3.2.1. Dokuların İzolasyonu

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

Şekil 3.5. *G. mellonella* larvasının diseksiyonuŞekil 3.6. *G. mellonella* larvasından alınan orta bağırsak ve yağ dokunun ependorf tüplere aktarımı**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 edildi. Daha sonra 500 g’ de 15 dakika +4 °C’de santrifüj edildi ve santrifüj sonunda alınan süpernatant başka bir tüpe aktararak, 12000 g’ de +4 °C’de 45 dk. (10.249 rpm) tekrar santrifüj edildi.

Bağırsak doku örneklerinin ise, ilk önce ultra turrax ile homojenizasyonu sağlandı ve sonrasında yağ doku için uygulanan santrifüj işlemleri uygulandı. Her iki dokudan da Bradford tayini için eppendorflara 100 µl süpernatantlardan ayrıldı.



Şekil 3.7. Ultra turrax ve Ultrasonik homejenizatör

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



Şekil 3.8. Homojenatların Sephadex® G-25 jel kolonlarında süzme 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 kullanıldı. 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 yapıldı. Ölçümler, 550 nm absorbansta bir dakika boyunca üçer kez tekrar edildi.

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 absorbandsa 1 dakika boyunca kinetik olarak spektrofotometrede ölçüldü.

3.2.3.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Tayini

Katalaz (CAT) enzim aktivitesi için Greenwald (1985) yöntemi kullanıldı. Katalaz (CAT: EC: 1.11.1.6) aktivitesi bir dakika boyunca 240 nm absorbansta H_2O_2 ' in parçalanmasıyla açığa çıkan azalan absorbandsın 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 ₂ PO ₄	10.9 g	K ₂ HPO 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 yapıldı.

3.2.3.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Tayini

Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi için Lawrence ve Burk (1976) yöntemleri kullanıldı. 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 konsantrasyonunun 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 ölçüldü.

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 absorbanansı 595 nm’de ölçülür (Bradford, 1976).

a- Standart grafiğin hazırlanması

Stok protein çözeltisi bovin serum albümin (BSA)’ den 1 mg/mL olarak hazırlandı. Stok protein çözeltisi 0, 10, 20, 30 ve 50 µg/L derişimlerinde seyreltilerek çözeltiler hazırlandı. Örnek protein derişimlerinin ölçülmesinde kullanılan yöntem ile standartların absorbanans değerleri tespit edildi ve standart grafiğin oluşturulmasında kullanıldı. Çözeltiler hazırlandıktan sonra 5 saniye vortekste karıştırıldı.

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 hazırlandı.

c- Örneklerin hazırlanması

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

d- Standartların ve örneklerin okunması

Hazırlanan standart çözeltilerden başka bir tüpe 250 µl eklendi, üzerine 750 µl Bradford reaktifi ilave edildi. Örnekler 595 nm absorbansta spektrofotometrede okundu. Kör olarak örnekle aynı miktarda ultra saf su kullanıldı.

3.2.3.5. İstatistiksel Analizler

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



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. SOD Enzim Aktivitesi

G. mellonella'nın orta barsak ve yağ dokusundaki 10 ppm, 50 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 çözeltilerinin 2, 4 ve 8 saatlik süre sonundaki SOD enzim aktivitelerindeki değişiklikler Çizelge 4.1. ile Şekil 4.1. ve 4.2. de verilmiştir. Elde edilen verilere göre; her iki doku içinde SOD enzim aktivitelerinde istatistiki olarak belirgin farklılıklar gözlenmektedir.

Orta barsakta SOD aktivitesinde 2 saatlik süre sonunda bütün konsantrasyonlarda kontrole göre artış ve azalışlar gözlenmiş, özellikle 50 ppm Al_2O_3 derişiminde belirgin bir artış olmuş ve istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. 4 saatlik süre sonunda artan konsantrasyonlarda kontrole göre aynı şekilde artış ve azalışlar olmuş en fazla artış oranı ise 100 ppm lik konsantrasyonda gözlenmiştir. 8 saatlik süre incelendiğinde kontrol grubuna göre 10 ppm Al_2O_3 çözeltilisinde önemli bir fark gözlenmezken, 50 ppm Al_2O_3 çözeltilisinde artış, 100 ppm Al_2O_3 grubunda ise enzim aktivitelerinde azalış gözlenmiştir.

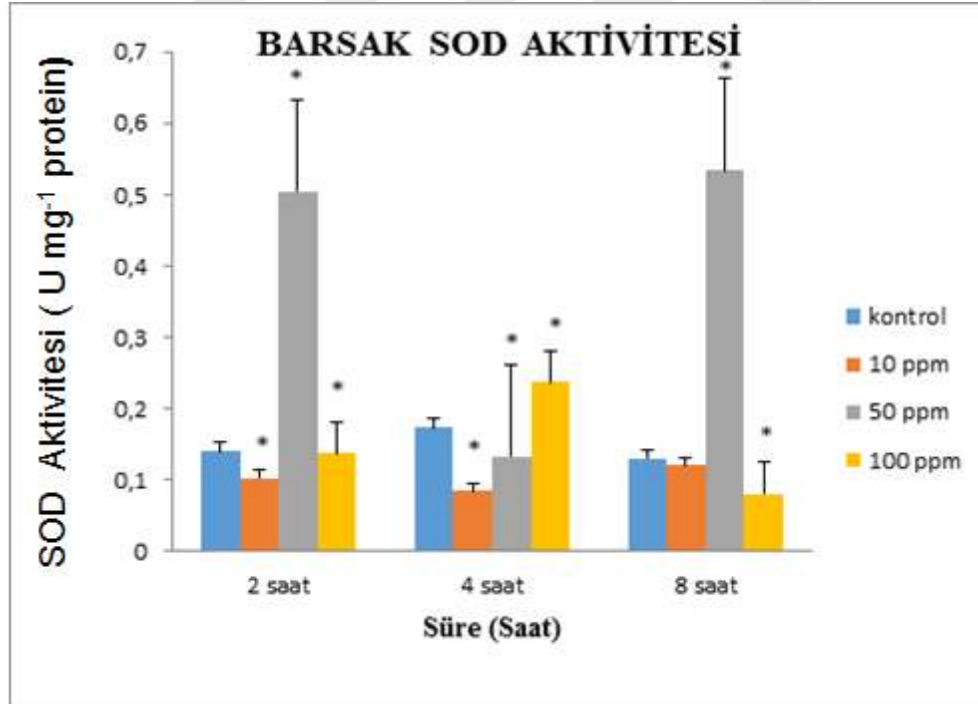
Yağ dokusunda SOD aktivitesinde 2 saatlik süre sonunda bütün konsantrasyonlarda kontrole göre önemli azalış gözlenmiştir. 4 saatlik süre sonunda artan konsantrasyonlarda belirgin olarak artışlar gözlenmiş ve bu artışlar istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). 8 saatlik süre sonunda kontrole göre 100 ppm Al_2O_3 grubunda belirgin bir fark gözlenmezken 10 ppm Al_2O_3 çözeltilisinde artış ve 50 ppm Al_2O_3 grubunda ise azalış görülmüştür.

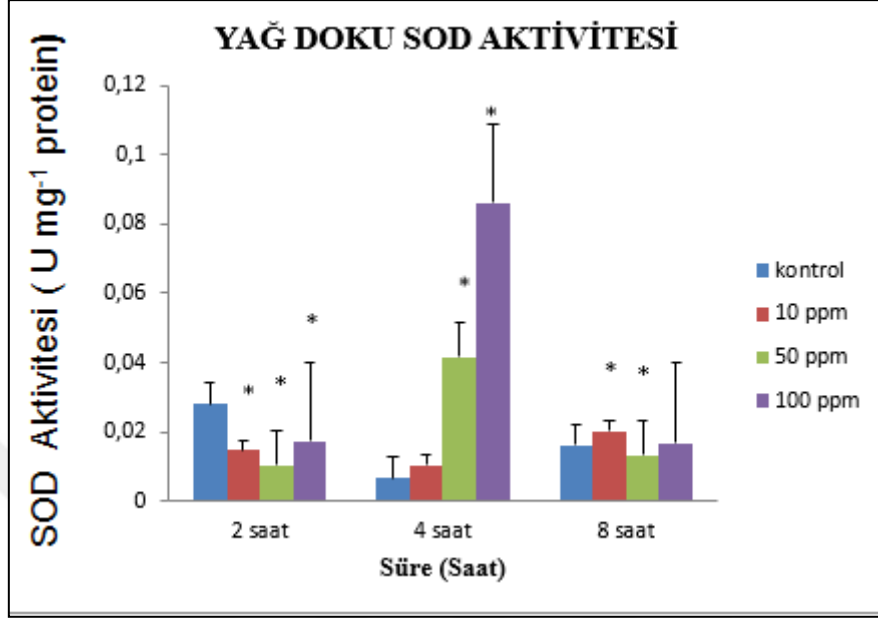
Çizelge 4.1. Al₂O₃ Çözeltilerinin *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ doku SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri

DERİŞİM (mg/l)	SOD AKTİVİTESİ (U mg ⁻¹ protein) (X ± sx)*					
	ORTA BARSAK			YAĞ DOKU		
	2 saat	4 saat	8 saat	2 saat	4 saat	8 saat
Kontrol	0,1405±0,0004 a	0,1732±0,0024 a	0,1311±0,0034 a	0,0279±0,0007 a	0,0065±0,0001 a	0,0161±0,0001 a
10 ppm	0,1034±0,0001 b	0,0849±0,0049 b	0,1206±0,0017 a	0,0147±0,0007 b	0,0104±0,0001 a	0,0203±0,0001 b
50 ppm	0,5049±0,0024 c	0,1329±0,0016 c	0,5331±0,0147 b	0,0104±0,0001 c	0,0416±0,0011 b	0,0132±0,0001 c
100 ppm	0,1370±0,0014 d	0,2367±0,0000 d	0,0810±0,0021 c	0,0172±0,0001 d	0,0860±0,0025 c	0,0167±0,0003 a

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

$\bar{x} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart hata

Şekil 4.1. Al₂O₃ çözeltilerinin *G. mellonella*'nın orta barsak dokusundaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 4.2. Al_2O_3 çözeltilerinin *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri

4.1.2. CAT Enzim Aktivitesi

Çizelge 4.2 ile Şekil 4.3. ve 4.4'de *G. mellonella* larvalarının orta barsak ve yağ dokusundaki 10 ppm, 50 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 çözeltilerinin 2, 4 ve 8 saatlik süre sonundaki CAT enzim aktivitelerindeki değişiklikler verilmiştir.

Elde edilen verilere göre orta barsaktaki CAT aktivitesinde 2 saatlik süre sonunda kontrole göre tüm gruplarda istatistiksel olarak farklılıklar ortaya çıkmıştır. 10 ppm ve 50 ppm Al_2O_3 grubunda kontrole göre enzim aktivitelerinde artış gözlenmiş, 100 ppm de ise azalış olmuştur. 4 saatlik süre sonunda kontrole göre bütün konstrasyonlarda artışlar gözlenmiştir. 8 saatlik süre sonunda ise kontrole göre 10 ppm Al_2O_3 çözeltilisinde azalış olurken 50 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 çözeltilerinde enzim aktivitesinde belirgin bir artış tespit edilmiştir.

Yağ dokusundaki CAT aktivitesinde 2 saatlik süre sonunda 10 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 konsantrasyonlarında kontrole göre önemli derecede artış gözlenirken, 50 ppm Al_2O_3 çözeltilisinde kontrole göre azalış gözlenmiştir ve

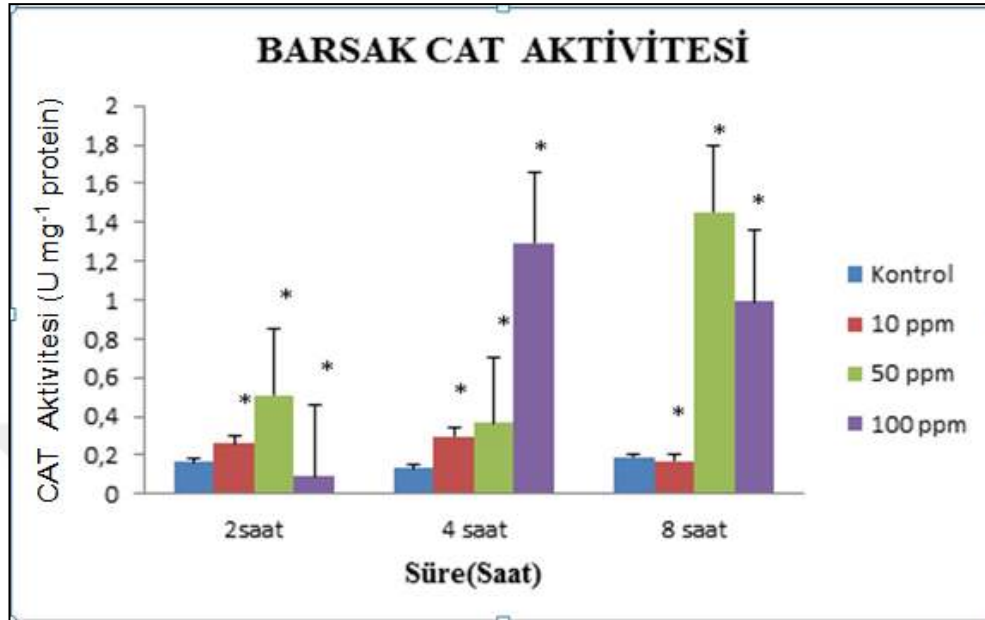
istatistiki olarak önemli bulunmuştur. 4 saatlik süre sonunda kontrole göre 10 ppm Al_2O_3 konsantrasyonunda istatistiki açıdan herhangi bir fark gözlenmezken , 50 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 enzim aktivitelerinde belirgin bir artış olmuştur. 8 saatlik süre sonunda kontrol grubuna göre 10 ppm Al_2O_3 çözeltisinde önemli derecede artış tespit edilirken 50 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 konsantrasyonunda ise istatistiki açıdan önemli bir fark gözlenmemiştir($p < 0.05$).

Çizelge 4.2. Al_2O_3 Çözeltilerinin *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri

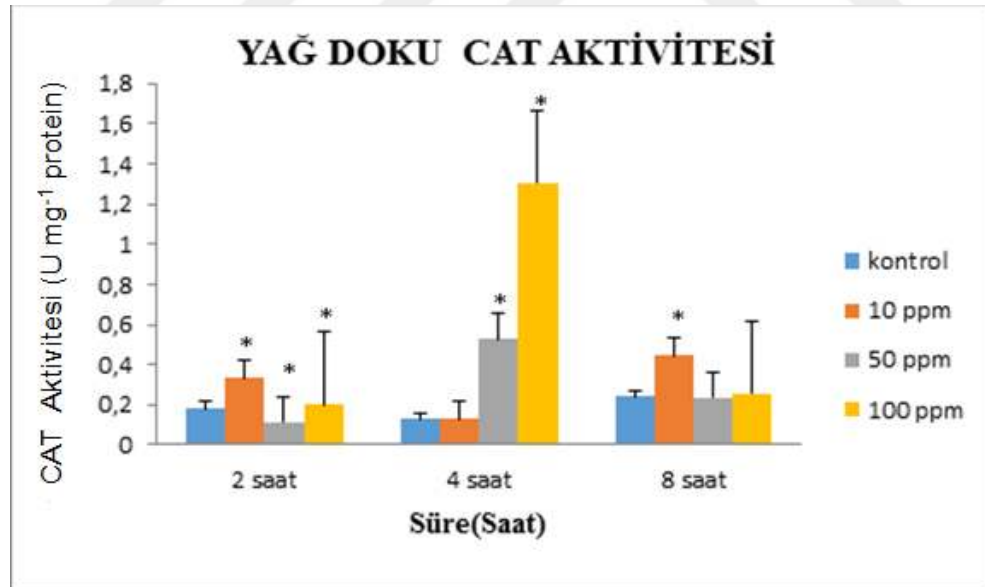
DERİŞİM (mg/l)	CAT AKTİVİTESİ (U mg-1 protein) ($\bar{X} \pm s_x$)*					
	ORTA BARSAK			YAĞ DOKU		
	2 saat	4 saat	8 saat	2 saat	4 saat	8 saat
Kontrol	0,1646 $\pm$ 0,0024 a	0,1324 $\pm$ 0,0036 a	0,1908 $\pm$ 0,0091 a	0,1815 $\pm$ 0,0049 a	0,1265 $\pm$ 0,0026 a	0,2401 $\pm$ 0,0103 a
10 ppm	0,2578 $\pm$ 0,0326 b	0,2990 $\pm$ 0,0006 b	0,1687 $\pm$ 0,0029 b	0,3304 $\pm$ 0,0059 b	0,1276 $\pm$ 0,0155 a	0,4424 $\pm$ 0,0142 b
50 ppm	0,5118 $\pm$ 0,0337 c	0,3665 $\pm$ 0,0238 c	1,4542 $\pm$ 0,0084 c	0,1141 $\pm$ 0,0057 c	0,5284 $\pm$ 0,0078 b	0,2356 $\pm$ 0,0030 a
100ppm	0,0922 $\pm$ 0,0039 d	1,2954 $\pm$ 0,0187 d	0,9942 $\pm$ 0,0377 d	0,1988 $\pm$ 0,0040 d	1,3073 $\pm$ 0,0372 c	0,2538 $\pm$ 0,0153 a

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

$\bar{x} \pm s_x$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart hata



Şekil 4.3. Al_2O_3 çözeltilerinin *G. mellonella*'nın orta barsak dokusundaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 4.4. Al_2O_3 çözeltilerinin *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki CAT enzim üzerine etkileri

4.1.3. GPx Enzim Aktivitesi

Çizelge 4.3. ile Şekil 4.5. ve 4.6. da *G.mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki GPx enzim aktivitelerindeki değişimler gösterilmiştir. . Elde edilen verilere göre orta barsaktaki GPx enzim aktivitesinde 2 saatlik süre sonunda kontrol gruba göre, 10 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 çözeltilerinde azalış olmuş, 50 ppm de ise artış gözlenmiş ve istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. 4 saatlik süre sonunda kontrol grubuna göre 10 ppm ve 50 ppm de enzim aktivitelerinde benzer yönde azalış gözlenirken 100 ppm Al_2O_3 'de artış tespit edilmiştir. 8 saatlik süre sonunda kontrole göre, 50 ppm Al_2O_3 uygulaması yapılan grup dışında azalış gözlenmiş ve istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

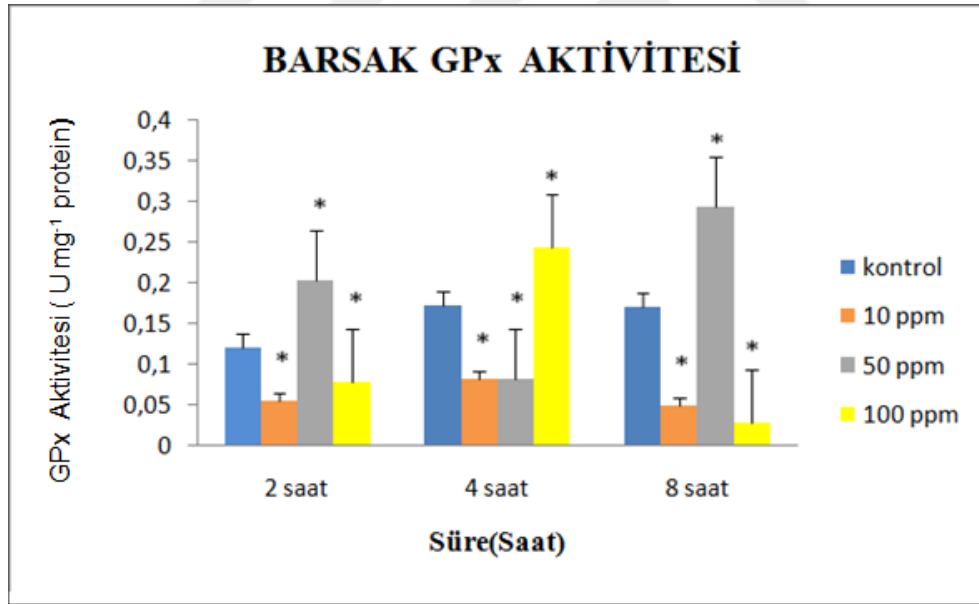
Yağ dokusundaki GPx enzim aktivitelerinde 2 saatlik süre sonunda kontrole göre bütün konsantrasyonlarda azalış gözlenmiş ve istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 4 saatlik süre sonunda kontrole göre 10 ppm Al_2O_3 'de istatistiki açıdan bir fark gözlenmezken 50 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 'de ise belirgin olarak artış gözlenmiştir. 8 saatlik süre sonunda kontrole göre 10 ppm Al_2O_3 'de azalış , 50 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 'de ise belirgin olarak artış görülmüştür.

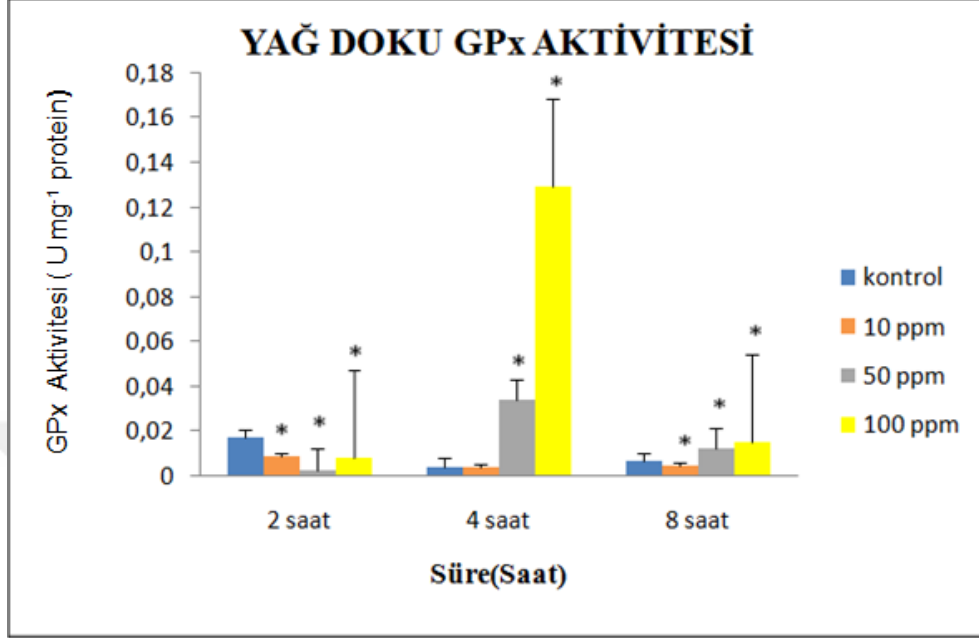
Çizelge 4.3. Al₂O₃ Çözeltilerinin *G. mellonella*'nın orta barsak ve yağ dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri

DERİŞİM (mg/l)	GPx AKTİVİTESİ (U mg ⁻¹ protein) (X ± sx)*					
	ORTA BARSAK			YAĞ DOKU		
	2 saat	4 saat	8 saat	2 saat	4 saat	8 saat
Kontrol	0,1196±0,0005 a	0,1720±0,0022 a	0,1693±0,0005 a	0,0169±0,0004 a	0,0040±0,0003 a	0,0063±0,0000 a
10 ppm	0,0530±0,0013 b	0,0802±0,0002 b	0,0474±0,0033 b	0,0088±0,0006 b	0,0039±0,0002 a	0,0042±0,0004 b
50 ppm	0,2017±0,0171 c	0,0802±0,0042 b	0,2927±0,0109 c	0,0027±0,0006 c	0,0338±0,0018 b	0,0122±0,0002 c
100 ppm	0,0776±0,0034 b	0,2422±0,0080 c	0,0270±0,0040 d	0,0078±0,0001 b	0,1289±0,0095 c	0,0150±0,0003 d

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

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart hata

Şekil 4.5. Al₂O₃ çözeltilerinin *G. mellonella*'nın orta barsak dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 4.6. Al_2O_3 çözeltilerinin *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri

4.2. Tartışma

Yapılan çalışmada, Al_2O_3 çözeltisinin farklı konsantrasyonları (10 ppm , 50 ppm ve 100 ppm) *G.mellonella* larvalarına enjekte edildikten sonra 2 , 4 ve 8 saatlik sürelerle maruz bırakıldığında orta barsak ve yağ dokusundaki süperoksit dismutaz (SOD) , katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) antioksidan enzim aktivitelerine olan etkileri incelenmiştir.

Toprağa ya da suya karışan bazı zararlı maddeler uzaklaştırılabilir veya biyolojik olarak parçalanabilirler fakat ağır metaller uzaklaştırılmaz ve bununla birlikte ortamda çok fazla birikerek kimyasal ve biyolojik prosesleri olumsuz olarak etkilerler. Bu nedenle çevresel kirleticilerin büyük bir kısmını ağır metal ve tuzları oluşturmaktadır. Alüminyumun saf hali doğada bulunmakta ve suda çözünmemektedir. Alüminyum hidrür (AlH_3) , Alüminyum klorür (AlCl_3) , Alüminyum sülfat (Al_2SO_4)₃ ve Alüminyum oksit (Al_2O_3) gibi alüminyum tuzları günümüzde pek çok alanda kullanılmaktadır.(Alkan, 2006). Alüminyum tıp

alanında birçok ilacın içeriğinde kullanılmaktadır (Garbossa ve ark., 1996). En çok kullanılan nanopartiküllerden biri olan Al_2O_3 (alüminyum oksit) katalizör olarak (Hanemann ve Szabó, 2010) ve farklı malzemelerin mekanik özelliklerini geliştirmek için malzeme bilimlerinde yaygın bir kullanıma sahiptir (Nazari ve ark., 2010).

Serbest radikallerin ana kaynağı olan moleküler oksijen paralel spin halinde eşlenmemiş iki elektrona sahiptir. Eşlenmemiş elektrona sahip moleküler oksijen, ROT ortaya çıkmasında önemli rol oynar. Organizmada geçiş metallerine sahip enzimler aracılığıyla moleküler oksijene bir elektron transferiyle oksitlenme reaksiyonları gerçekleşir. (Gutteridge, 1994). Superoksit anyon radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri, oksijen tüketen organizmalar tarafından sürekli olarak üretilmektedir. Ksenobiyotiklere veya toksik kirleticilere maruz kalmak bu endojen ve eksojen ROT'lar arasında bir dengesizlik oluşturarak, organizmalarda doğrudan oksidatif hasara veya antioksidan savunma sisteminde bir zayıflamaya neden olabilir (Valavanidis vd., 2006). SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimleri içeren savunma sistemleri ROT oluşumlarını azaltmaya eğilimlidir (Van der Oost vd., 2003).

Serbest radikaller vücutta sürekli oluşabilir ve oluşan bu radikaller antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılırlar. Antioksidanlar hücrede serbest radikalleri temizleyerek hücrenin hasar görmesini önler ya da geciktirir. Antioksidanlar vücutta doğal olarak üretilmektedir bununla birlikte dışardan besinlerden de alınabilir (Lobo ve ark., 2010). Antioksidan sistem enzimatik ve enzimatik olmayan karmaşık sistemlere sahiptir. Bu nedenle hücrede birinci, ikinci ve üçüncü antioksidan savunma mekanizmalarından bahsedebiliriz. SOD, CAT ve GPx serbest radikallere karşı ilk savunma basamağını oluşturmaktadır. (Niki, 1993). SOD, ROT ve anyonuna karşı önemli bir antioksidan enzimdir. SOD bir süperoksit radikalini O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer bir süperoksit radikalini ise daha az reaktif bir molekül olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini katalize eder (Sanyal ve ark., 2009). SOD

enziminin etkisiyle meydana gelen ve hücre için toksik olan hidrojen peroksit (H_2O_2) CAT enzimi sayesinde su ve oksijene dönüştürülmektedir (Valko, vd.,2007; Singh, vd.,2009).

Yapılan çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre, *G.mellonella* larvalarının orta barsakta 2, 4, ve 8 saatlik süreler sonunda SOD aktivitesinde kontrole göre artış ve azalışlar gözlenmiştir. Giberellik asit (GA_3) ile yapılan bir çalışmada yüksek dozlardaki uygulamaya maruz kalan *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki SOD aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Altuntaş, 2015). *G. mellonella* ile yapılan bir diğer çalışmada ise, larvaların hemolenfinde krom(Cr) ve kurşunun (Pb) artan konsantrasyonlarında kontrole göre CAT ve SOD enzim aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Wu ve Yi, 2015). *G. mellonella* larvalarındaki antioksidan enzimler üzerine *Bacillus thuringiensis* uygulunarak yapılmış bir çalışmada ise SOD aktivitesinin artmış olduğu ifade edilmiştir (Dubovskiy ve ark, 2008). Yapılan farklı bir çalışmada ise *G.mellanella* larvalarına potasyum nitrat uygulaması sonucunda SOD aktivitesinde belirgin bir artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Maguire ve ark., 2017). Çalışmamızda yağ dokusunda 2 ve 8 saatlik uygulama gruplarında kontrole göre SOD enzim aktivitelerinde azalış görülürken 4 saatlik bütün uygulama gruplarında artan konstrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir. Metallerin organizmada fazla birikmesi süperoksit radikallerinin ve hidrojenperoksitin (H_2O_2) oluşumunu arttırır. Böylece SOD aktivitesi artan radikallere paralel olarak azalmış olabilir. Çalışmamızda özellikle orta barsakta 8 saatlik süre sonunda 100 ppm' lik çözeltide yağ dokuda ise 2 saatlik süre sonunda kontrole göre gözlenen bu azalışlar , yüksek dozdaki toksisiteye maruz kalan organizmanın artan oksitatif stres karşısında enzim akivitesinin inhibe edildiğinin göstergesi olabilir. Stres oluşumuna sebep olan etkenler süperoksit radikallerini oluşturduğunda SOD enzim aktivitesi artmaktadır. Ancak SOD enzim aktivitesi baskılanır ve düşerse oluşan radikaller engellenemez ve hücrelerdeki stres etkenleri altında lipid peroksidasyonu ile beraber MDA miktarı da artar (Ahmad ve Pardini, 1990). *G. mellonella*

larvalarının hemolenflerine ZEB uygulamasından sonra SOD enzim aktivitelerinde gözlenen bu azalmanın larvaların fazla miktardaki MDA içeriği ile ilişkisi olabileceği belirtilmiştir(Çakır,2019). Yine yapılan benzer bir çalışmada larval hemolenfteki süperoksit dismutaz aktivitesinin azalma nedeninin Azadiraktin (AZA) uygulanan larvaların yüksek MDA içeriği ile bağlantılı olabileceği söylenmiştir. Stres faktörlerinin süperoksit radikali ürettiğinde SOD aktivitesinin arttığı, eğer SOD enzimi inhibe olur veya azalır ise radikaller uzaklaştırılmaya ve stres altında hücredeki lipid peroksidasyonunu ve dolayısıyla MDA içeriğinin artacağını ifade etmişlerdir (Dere,2015).

Benavides ve ark. (2016) 7, 14 ve 21 gün boyunca ZnO ve Al₂O₃ NP maruz bırakılan *Carassius auratus*'da SOD ve CAT aktivitesinde tüm nanopartikül 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.

Deniz omurgasızlarında ve omurgalılarda yapılan bazı çalışmalar, kısa süreli düşük seviyeli ağır metal maruziyetinden sonra bağışıklık tepkilerinin artabileceğini, daha uzun maruz kalma veya daha yüksek konsantrasyonların aynı tepkileri engelleyebileceğini göstermiştir (Galloway ve Depledge, 2001).

Yapılan çalışmada *G. mellonella* larvalarının orta barsakta CAT aktivitesinde 2 saatlik süre sonunda 10 ve 50 ppm çözeltide kontrole göre artış gözlenmiş 100 ppm de ise azalma olmuştur. En yüksek derişim olan 100 ppm Al₂O₃ çözeltisinde CAT enzim aktivitesinin azalmasının sebebi SOD aktivitesinde olduğu gibi, H₂O₂ gibi serbest radikallerin enzim aktivitesini inhibe etmiş veya enzim aktivitesine karşı savunma yapmış olabileceği görüşünü kuvvetlendirmektedir(Krishnan ve Kodrik,2006; Emre ve ark.,2013; Kono ve Fridovich, 1982). Yapılan benzer bir çalışmada *G. mellonella* larvalarının

hemolenfine uygulanan Zebularin'in kontrol grubuna göre CAT enzim aktivitesinde 8 ve 16 ppm'lik dozlarda artış olduğu gözlenirse de 32 ppm'lik en yüksek doz seviyelerinde azalma belirlenmiştir (Çakır, 2019). *G.mellonella* larvaları yağ dokusu üzerinde borik asit uygulaması yapılan bir çalışmada ise CAT enzim aktivitesinde azalma gözlenmiş, 4 saatlik süre sonunda 10, 50 ve 100 ppm lik çözeltilerde kontrole göre önemli artış olmuştur (Hyrsl ve ark., 2007). Çalışmamızda orta barsaktaki CAT aktivitesinde 8 saatlik süre sonunda kontrole göre 10 ppm Al_2O_3 çözeltisinde azalış olurken 50 ppm ve 100 ppm Al_2O_3 çözeltilerindeki enzim aktivitesinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. Bu durum bize metallerin organizmada fazla birikmesi ve sürenin uzaması durumunda böceklerin immün sisteminin artan serbest radikallere karşı daha fazla aktive edildiğinin göstergesidir.

Yağ dokusundaki enzim aktiviteleri incelendiğinde sadece 2 saatlik 50 ppm çözeltisinde azalış gözlenmiş olup diğer 2, 4 ve 8 saatlik bütün çözeltilerde enzim aktivitelerinde artışlar görülmüştür. Yapılan benzer çalışmalarda *G. mellonella* larvalarına uygulanan organofosforlu insektisit fenthion maddesinin CAT enzim aktivitelerinde denenen tüm doz seviyelerinde artış gösterdiği (Yalçınkaya, 2013) , bu artışların H_2O_2 üretiminin artması nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (Alves vd., 2002).

Yapılan bir diğer çalışmada Azadiractin uygulaması yapılan *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde CAT aktivitesinde 24 ve 72 saat diliminde farklı doz derişimlerinde artış yaşanmıştır. AZA'ya maruz kalan *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde SOD'un azaldığını fakat süreye bağlı olarak CAT aktivitesinin arttığı görülmüştür. Katalaz aktivitesinin hidrojen peroksitleri ortadan kaldırmak için uyarıcı bir tepki olduğu ve bununla birlikte böceklerin memelilerden daha yüksek CAT aktivitesine sahip olduğu ve CAT aktivitesinin H_2O_2 seviyesi azaldığında inhibe olabileceği yorumu yapılmıştır. (Dere,2015).

Gongqing ve Yunhong (2015), *G. mellonella* larvalarında yaptıkları çalışmada, artan Pb ve Cr konsantrasyonlarının kontrole göre karşılaştırıldığında

CAT ve SOD enzim aktivitesinde artışa neden olduğunu bulmuşlardır. Borik asidin *G. mellonella* son evre larvalarında hemolenf SOD, GST ve GPx aktivitelerinin benzer şekilde arttığı tespit edilmiştir (Hyrsl et al,2007).

Yapılan çalışmada tüm uygulama gruplarında GPx enzim aktivitesi artan konsantrasyonlarda kontrole göre artış ve azalış göstermiş ve istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Yağ dokusundaki GPx enzim aktivitelerinde 2 saatlik süre sonunda kontrole göre bütün konsantrasyonlarda belirgin derecede gözlenen azalış dikkat çekicidir. Araştırmalara göre GPx enzim seviyesinin düşük olması antioksidan sistemin bozulmasına neden olur. Metallerin organizmada fazla birikmesi süperoksit radikallerinin ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) oluşumunu artırır ve bu durum GPx enziminin aktivitesinin düşmesine sebep olabilir. CAT enzim aktivitesi H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarında daha etkiliyken, daha düşük konsantrasyonlarında GPx enzimi daha etkilidir (Duthie vd. 1989). Zn ve Cu ile yapılan bir çalışmada *G. mellonella* larvalarının yağ ve barsak dokularındaki GPx enzim aktivitelerinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlenmiştir (Meşe ,2019). Farklı türlerle yapılan birçok çalışmada, nanopartiküllerin hem sindirim sistemi hem de immün sistem hücrelerini hedef aldıkları bilinmektedir. Ayrıca, nanopartiküller organizmada kimyasal reaksiyonları başlatabilmekte ve bunun sonucunda serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Metal oksit nanopartikülleri, geniş kullanım alanlarından dolayı birçok organizmada toksik etkilere neden olmaktadır. Bombyx mori larvalarında TiO_2 NP'lerinin etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda, TiO_2 NP ile ön muamele sonucunda phoxim uygulaması yapılan larvalarda mortalitenin, beyin hasarının ve oksidatif stresin azaldığını bildirmişlerdir (Xie ve ark., 2014). Ayrıca Tian ve ark. (2016) aynı tür ile yaptığı bir başka çalışmada, TiO_2 NP' nin larvaların yağ dokusunda insülin sinyal yolunu aktive ettiği, protein, yağ ve karbohidrat ve beslenme metabolizmalarını arttırdığını tespit etmişlerdir.

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). Antioksidan enzimlerin aktivitesi, ksenobiyotiklerin uygulama süresi ve derişiminin yanı sıra türlerin hassasiyetine bağlı olarak da artış veya azalış gösterebilir. Antioksidan savunma mekanizması, birçok canlıda reaktif oksijen türevlerinin yol açtığı hücrel zarardan korunmak için bulunur. Katalaz (CAT), GSH-Px, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon-S-trasferaz (GST) gibi antioksidan enzimlerle birlikte, askorbik asit (Vitamin C), A, E vitamini, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da reaktif oksijen türevlerinin toksik etkisini yok etmektedir (Kale ve ark., 1999).

Sonuç olarak alüminyum oksitin farklı konsantrasyonlarının enjeksiyon yöntemiyle *G.mellonella* larvalarına uygulandığı çalışmamızda, doku farklarına, uygulanan süreye ve farklı konsantrasyonlara bağlı olarak SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri değişiklik göstermiştir.

Laboratuvar ortamında kolay ve hızlı yetiştirilmesi nedeniyle *G. mellonella* toksiloloji, fizyoloji gibi pek çok çalışma alanı için model organizma haline gelmektedir. Bu sebeplerle birlikte doğal bağışıklık sisteminin memeliler ile benzer olması ve parazit bir tür olan *G. mellonella*'nın ve diğer zararlı türlerle mücadelede ekosisteme en az olumsuz etkisi olan yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Endüstriyel devrim ile başlayan hızlı sanayileşmenin bir sonucu olarak ağır metal kirliliği günümüzde gelişmekte olan birçok ülkenin önemli çevresel sorunlarından biridir. Böceklerin fizyolojik toksisite sonucu çok miktarda metalleri vücudunda biriktirdikleri ve besin zinciri yoluyla bu metallerin böceklerden diğer canlı organizmalara transfer edilebildikleri belirlenmiştir.

Sunulan çalışmada, *G. mellonella* son dönem larvalarına Al_2O_3 çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının enjeksiyon metodu ile 2,4 ve 8 saatlik sürelerle maruz bırakılarak orta barsak ve yağ dokusundaki SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerindeki değişimler tespit edilmiştir.

Al_2O_3 'in farklı derişim ve sürelerde uygulanması, oksidatif stresin göstergesi olan SOD, CAT ve GPx antioksidan enzim aktivitelerinde belirgin bir şekilde artış ve azalışlara neden olmuştur. Antioksidan enzimlerinin etkinliği, ksenebiyotiklerin uygulama süresine, derişimine, türe, dokuya göre de artış ve azalışlar gösterebilir.

Metallerin organizmada fazla birikmesi süperoksit radikallerinin ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) oluşumunu artırır. Bulunan sonuçlara göre yüksek dozdaki toksisiteye maruz kalan organizmanın artan oksidatif stres karşısında enzim aktivitesinin inhibe edildiğini göstermiştir.

G. mellonella larvalarının oda sıcaklığında üretiminin kolay ve kısa sürede yapılabilmesi ve ticari yönden üretime uygun olmasından dolayı sıklıkla tercih edilen model organizmadır. *G. mellonella* türü gibi böceklerin memeliler ile benzer doğal bağışıklık sistemine sahip olması immünolojik çalışmalarda tercih edilmesine neden olmaktadır. Ayrıca doğal ortamlarda karşılaşılabilecek diğer ağır metallerin toksik etkilerinin belirlenmesiyle ve antioksidan savunma sistemlerinin aktivelerinin gözlenmesi bundan sonraki yapılacak fizyolojik ve toksikolojik alanlardaki çalışmalara katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Ahmad, S., 1995. Antioxidant Mechanisms of Enzymes and Proteins. In: Ahmad, S. (Ed.), Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman and Hall, New York, s. 238-272.
- Ahmad, S., Pardini, R. S., Mechanisms for Regulating Oxygen Toxicity in Phytophagous Insects, Free Radical Biology and Medicine, 1990, 8(4), 401-413.
- Ali, A.D., Bakry, N.M., Abdellatif, M.A., El-Sawaf, S.K., 1973. The Control of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L., by Chemicals I. Susceptibility of the Wax Moth Larvae and Honey-Bee Workers to Certain Chemicals Z. Ang. Entomology, 74, 170- 177.
- Ali, A.T.M.M., Al-Swayeh, O.A., Al-Rashed, R.S., 1996. Role of oxygen-derived free radicals on gastric mucosal injury induced by ischemiareperfusion. Saudi J Gastroenterol. 2(1), 19-28.
- Alkan, U., Teksoy, A., Bařkaya , S.H(2006). Yüzeysel sulardaki doğal organik maddelerin gideriminde uygun koagölasyon şartlarının belirlenmesi, Ekoloji,15(59), 18-26.
- Altınçiçek, B., Lindner, M., Linder, D., Preissner, K., Vilcinskas, A. (2007) Microbial Metalloproteinases Mediate Sensing of Invading Pathogens and Acitivate Innate Immune Responses in the Lepidopteran Model Host *Galleria mellonella*. Infection and Immunity, 75, 175-183.
- Altuntaş, H., 2015. Determination of Gibberellic Acid(GA3) – Induced Oxidative Stress in a Modem Organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), Enviromental Entomology , 44(1),100-105.
- Alves , S.R.C., Severino, P.C. and Ibbotson , D.D., 2002. "Effects of furadanin the Brown mussel *Perna perna* and in the man grave oyster *Crassostrea rhizophorae*". Marine Environmental Research,54.1-5.

- Antunes, G., Evans, S. A., Lordan, J. L., & Frew, A. J. (2002). Systemic cytokine levels in community-acquired pneumonia and their association with disease severity. *European Respiratory Journal*, 20(4), 990-995.
- Artan, R., Keskinan, O. Kadmiyum İçeren Atık Suların İleri Arıtımında Su Mercimeği (*Lemna minor*) Bitkisinin Kullanılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Cilt:19-2, 2008.
- Aydemir, B., Karadağ, S. E., 2009. Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2): 56-60.
- Babior, B. M. 2000. "Phagocytes and Oxidative Stress." *American Journal of Medicine* 109(1): 33–44.
- Bagchi, K., Puri, S., 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterr Health J.* 4(2), 350-360.
- 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.
- Bi, J.L.G., Felton, W., 1995. Foliar Oxygen Stress and Insect Herbivory: Primary Compounds, Secondary Metabolites, and Reactive Oxygen Species as Components of Induced Resistance. *Journal of Chemical Ecology*, 21:1511-1530.
- 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>.
- Bronksil, J.F. 1961. "A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae)." *Journal of Lepidopteran Society*: 102–4.
- Buettner, G. R., Ng, C. F., Wang M., Rodgers, V.G.J., Schafer, F. Q., A New Paradigm: Manganese Superoxide Dismutase Influences the Production of H₂O₂ in Cells and Thereby Their Biological State, *Free Radical Biology Medicine*, 2006, 41(8), 1338- 1350.

- Büyükgüzel, E., and Kalender, Y., 2007. Penicillin-induced oxidative stress: effects on antioxidative response of midgut tissues in larval instars of *G.mellonella*. J. Econ. Entomo.l, 100: 1533-1541.
- Büyükgüzel, E., and Kalender, Y., 2008. *Galleria mellonella* survivorship, development and protein content in response to dietary antibiotics. J. Entomol. Sci., 43: 27-40.
- Büyükgüzel, E., and Kalender, Y., 2009. Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. Pest. Biochem. Physiol., 94: 112-118.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. Annu. Rev. Biochem. 58, 79-110.
- Campbell, I.R.,Cass, J.S., Cholak, J.,Keheo, R.A.,1957. Aluminum in the Environmental of man. A.M.A. Archives of industrial Health,15(5):359-448.
- Canlı, G., 2017. Titanyum dioksit (TiO₂) nanopartikülünün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın gelişimine ve hemositlerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi.Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Cheung, CCC., Zheng, GJ., Li, AMY., Richardson, BJ., Lam, PKS. Relationship Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna viridis*. Aquat Toxicol. 2001; 52(3-4): 189-203.
- Clark, R, B., 1992. Marine Pollution. Third edition. Clarendon Press. 64-82.Oxford.
- Cnubben, NHP., Rietjens, IMCM., Wortelboer, H., Van-Zanden, J., Van Bladeren, PJ. The Interplay of Glutathione Related Processes in Antioxidant Defense. Environ Toxicol Pharmacol. 2001; 10(4): 141- 152.
- Çakır, E.,2019. Zebularin'ın *G. mellonella* L.(*Lepidoptera* : *Pyralidae*) 'in antioksidan enzimlerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi.

- Çalık, G., Büyükgözel, K., and Büyükgözel, E., 2015. Reduced Fitness in Adults From Larval, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Reared on Media Amended with the Anthelmintic, Mebendazole. *Journal of Economic Entomology*, 109 (1): 182-187.
- Çavdar, C., A. Sifil, A.T., (1997). Çamsarı, Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 3-4, 92.
- Çaylak, E., 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
- Çetinkaya, G., Dönmez, Z., Aksu, A., Öztürk, T., Kutsal, A., 1999. Comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae, *Process Biochemistry*, 34, 885–892.
- Dere, B., Azadiraktin'in *G.mellonella* L. Hemolenfinde bulunan bazı antioksidan enzimlerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2015, 394345.
- Domingo, J. L., 1998. Developmental Toxicity of Metal Chelating agents. *Reproductive Toxicology*, 12: 499- 510. 48.
- Dubovskiy, I. M., Martemyanov, V. V., Vorontsova, Y. L., Rantala, M. J., Gryzanova, E. V., and Glupov V. V., 2008 . Effect of Bacterial Infection on Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation in the Midgut of *G. mellonella* L. Larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comparative Biochemistry Physiology C Toxicol Pharmacol*, 148(1), 1-5.
- 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.

- Durmuş Y.,2007. Sodyum Tetraboratın Büyük Bal Mumu Güvesi *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)’nın Yaşama, Gelişimi ve Bazı Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, 199795.
- 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/ty
pe/journal_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422489000089/type/journal_article).
- Dündar, Y., Aslan, R., 1999. Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller, Antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi*, 2(2): 134-142.
- Emre. I., Kayış, T., Coşkun, M., Dursun, O., Yeter Cogun, H.,2013. Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* Larvae. *Physiology, Biochemistry, and Toxicology*, 106(3), 371-377.
- Florea, A., Büsselberg, D.,2006. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds.
- Fridovich, I., 1986 .Biological effect of superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*,; 247: 1-11.
- Galloway, T. S., Depledge, M.H., 2001. **Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance** *Ecotoxicology*, 10 (2001), pp. 5-23.
- Garbossa, G., Gutnisky, A., Nesse, A.,1996.Depressed erythroid progenitor cell activity in aluminum-overloaded mice. *Miner. Electrolyte Metab*, 22: 214–18.
- Garcia-Medina, S., Razo-Estrada, A. C., Gomez-Oliva’n, L. M., Amaya-Chavez, A., Madrigal-Bujaidar, E. and Galar-Martí’nez, M., “Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*)”, *Fish Physiology and Biochemistry*, 36:875-882, (2010).

- Gerlach, S. A., 1981. Marine Pollution. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 218s. Newyork.
- 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>.
- Goyer, R. A., 1991. Toxic effects of metals. In: Caserett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (Eds. Amdur M. O., Doull, J., Klaassen, C. D.) Pergamon Press, New York, 1032.
- Gutteridge, JMC., 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection, *Chem. Biol. Interact.* 91: 133-140.
- Greenwald, R. A.. 1985. *Handbook Methods For Oxygen Radical Research*. CRC Press. <https://www.taylorfrancis.com/books/9781351072922>.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Cross, C.E., 1992. Free Radicals, Antioxidants An Human Disease: Where Are We Now? *J Lab Clin Med* 119: 598-620.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed., Oxford, New York, s. 944.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, USA.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn. Oxford: Oxford Science Publications. New York, 936s.
- Hanemann, T., Szabó, D.V., 2010. Polymer-Nanoparticle Composites: From Synthesis to Modern Applications. *Materials*, 3(6), 3468-3517.
- Hsu, MJ., Selvaraj, K., Agoramoorthy, G., 2006. Taiwan's industrial heavy metal pollution threatens terrestrial biota. *Environmental Pollution* 143: 327-334.

- Hyrsl, P., 2007. The effects of boric acid-induced oxidative stress on antioxidant enzymes and survivorship in *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem Physiol.*, 66:23-31.
- 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.
- Johnston, R., 1976. *Marine Pollution*. Academic Press. 185-290. London.
- Joshi, S.P., Toma, R.B., Medora, N., O'Connor, K., 2003. Detection of aluminium residue in sauces packaged in aluminium pouches. *Food Chem*, 83(3):383-386.
- Junqueira, J.C., 2012. *Galleria mellonella* as a model host for Human Pathogens: Recent Studies and New Perspectives. *Virulence*, 3(6), 474-476.
- 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.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven A. and Timur S., 2007. Metallerin Çevresel Etkileri-I. (erişim adresi: www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf).
- Kılınç, K., Kılınç, A., 2002. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33:110-118.
- Kim, Y.G., Choi, H.S., Song, M.K., Youk, D.Y., Kim, J.H., Ryu, J.C., 2009. Genotoxicity of Aluminum Oxide (Al₂O₃) Nanoparticle in Mammalian Cell Lines. *Molecular & Cellular Toxicology*, 5(2), 172-178.
- Kono, Y., and Fridovich, I., 1982. Superoxide inhibits Catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5751-5754.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1983. Functional Significance of Manganese Catalase in *Lactobacillus plantarum*. *Journal Bacteriology*, 155, 742-746.

- Krishnan, N., Kodrik, D., 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boiseval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress. *Journal of Insect Physiology*, 52, 11-20.
- Kwadha, C.A., Ong'amo, G.O., Ndegwa, P.N., Raina, S.K., and Fombong, A.T., 2017. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8 ,61.
- Larson, RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 1988; 27(4): 969-978.
- 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>.
- Linde ve ark., 1996. Eel (*Anguila anguila*) and Brown trout (*Salma trutta*) target species to assess the biological impact of trace metal pollution in freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31: 297-302.
- Liszkey, A., et al., 2004. Production of Reactive Oxygen Intermediates (O₂, H₂O₂, and OH) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth, *Plant Physiology*, 136, 3114-3123.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010; 4(8): 118–126.
- Maguire, R., Kunc, M., Hyrs, 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>.
- Mallick, N., 2004. Copper- Induced Oxidative Stress in the Chlorophycean Microalga *Chlorella vulgaris*: Response of the Antioxidant System. *J. Plant Physiology*, 161: 591- 597.

- McCord, J. M. ve Fridovich, I. 1969. "Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemoglobin)." *The Journal of biological chemistry* 244(22): 6049–55.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>.
- Meşe, Y., 2019. Cu, Zn ve karışımlarının *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarında antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi ,Çukurova Üniversitesi.
- Müller, M., Anke, M., 1998. Illing-Günther H. Aluminium in foodstuffs. *Food Chem* ,61(4):419-428.
- Nagendrappa, CG., 2005. An appreciation of free radical chemistry - 3. free radicals in diseases and health. *Resonance*. 10, 65-74.
- Navarro, A., Boveris, A., 2004. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*,287:1244-1249.
- Nazari, A., Riahi, S.H., Riahi, S.H., Shamekhi, S. K. A., 2010. Mechanical properties of cement mortar with Al₂O₃ nanoparticles. *Journal of American Science*, 6(4): 94-97.
- Niki, E., 1993. Antioxidant defenses in eukaryotic cells. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, editors. *Free radicals: From basic science to medicine*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1993. pp. 365–73.
- Ortel, J., 1995. Accumulation of Cd and Pb in successive stages of *Galleria mellonella* and metal transfer to the pupal parasitoid *Pimpla turionellae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 77(1), 89–97.
- Özer, M., 1961. Arı Kovanlarında Önemli Zarar Yapan Bal Mumu Güvesinin (*Galleria mellonella*) Morfoloji, Biyoloji ve Yayılışı Üzerinde Araştırmalar. Tarım Bakanlığı, Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü, Bitki Koruma Bölümü, 2(12), 26- 35.

- Patra, M., Bhowmik, N., Bandoadhyay, A., 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental And Experimental Botany*, 52, 199-223.
- Pettersson A., Bergman, B., 1985. Physiological and structural responses of the *Cyanobacterium anabaena cylindrica* to aluminium, *Physiol. Plant.*, 63, 153- 158.
- Pham-Huy, LA., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, 4(2): 89-96.
- Reed, D.J. (2000). Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection, (E. Hodgson; R.C. Smart, Editörler). Introduction to biochemical toxicology. United States of America: Wiley and Sons Inc.; s. 221-253.
- Regan, G.M., Sumen, G.P., 2010. The effects of Aluminum on *Vanessa cardui*. California State Science Fair 2010 Project Summary, Project no. J2318. www.usc.edu/CSSF/History/2010/Projects/J2318.pdf.
- Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G., Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 1995; 18(1): 1-11.
- Sanyal, J., Bandyopadhyay, SK., Banerjee, TK., Mukherjee, SC., Chakraborty, DP., Ray, BC., Rao, VR., 2009. Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 13(2): 129– 132.
- Sarma, AD., Mallick, AR., Ghosh, AK., 2010. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Int J Pharm Sci Res.* 1(3), 185-192.

- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Res.* 3(1), 91-100.
- Sen, S., Chakraborty, R., 2011. The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society, *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*. Chapter 1: 1-37.
- 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>.
- Sezer, T.B., 2017. Pyriproxyfen ve *Bacillus thuringiensis*'in *Galleria mellonella* L.'nin Oksidatif stres düzeyi , enzimatik antioksidan savunma sistemi ve hemosit sayılarına etkileri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., Flora, S. J., 2013. Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug Chemistry Toxicology*, 37(3): 336-347.
- Sies, H., 1985. *Oxidative Stress: Introductory Remarks in Oxidative Stress*. London, Academic Press , s. 1-8 .
- Sies, H., 1991. *Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application*. American Journal of Medicine, 91:31-38.
- Sies, H., 1997. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Progress of Theoretical and Experimental Physics, 82:291-295.
- Singh, B.K., Sharma, S.R., Singh, B. (2009). Combining ability for superoxide dismutase, peroxidase and catalase enzymes in cabbage head (*Brassica oleracea* var. capitata L.). *Scientia Horticulturae* 122: 195–199.

- Sorg, O., 2004. Oxidative Stress: A Theoretical Model or a Biological Reality? *CR Biologies*, 327:649-662.
- Staerck,C., 2017. "Microbial Antioxidant Defense Enzymes." *Microbial Pathogenesis* 110: 56–65.
- Suganya , M., Karthi, S., and Shivakumar, M.S., 2016. Effect of Cd and Lead Exposure on Tissue Spesific Antioxidant Response in *Spodoptera litura* Free Radicals and Antioxidants, Vol.6: 90-100.
- Şener, G., Yeğen, B. Ç., 2009. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*,22: 5-13.
- Tian, J., Liu, Z., Wu, B., Dong, Y., Zhou, L., Zheng, L., ... & Yang, A. (2016). Ferritin has an important immune function in the ark shell *Scapharca broughtonii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 59, 15-24.
- Tuncay, Y. 2007. Kovada Gölü'nde Yaşayan İstakozlarda (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) Ağır Metal Birikiminin İncelenmesi.Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta,Türkiye.
- Tuncsoy, S. B.,Ozalp, P. 2016. "Combined effects of pyriproxyfen and *Bacillus thuringiensis* on antioxidant activity of hemolymph, midgut and fatbody og *G. mellonella* larvae." *Fresenius Environmental Bulletin* 25(5): 1661–66.
- Uysal Y., Taner, F., 2010. Bioremoval of Cadmium by *Lemna Minor* in Different Aquatic Conditions. *CLEAN - Soil, Air, Water*, Vol:38(4), pp.370 – 377.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. and Scoullas, M.,2006. "Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 178-189.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal Biochemistry Cell Biology*, 39: 44 84.

- Van der Oost. R., Beyer. J. and Vermeulen, N. P.,2003 "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review", Environmental Toxicology Pharmacology. 13:57-149.
- Vuori, K.M., Kukkonen, J., 1996. Metal concentrations in *Hydropsyche pellucidula* larvae (Trichoptera, Hydropstchidae) in relation to the anal papillae abnormalites and age of exocuticle. Wat. Res., 30(10), 2265–2272.
- Xie, G., Yu, Z., Jia, D., Jiao, R., Deng, W.M.,2014. E(y)1/TAF9 mediates the transcriptional output of Notch signaling in Drosophila. J. Cell Sci. 127(17): 3830--3839.
- Wu, G., Jiang, S., Miyata, T., 2004. Effects of Synergists on Toxicity of Six Insecticides in Parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae). Journal of Economic Entomology, 97, 2057-2066.
- Wu, G., Yi, 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, 131–139.
- Yalçinkaya, E., Organofosforlu İnsektisit Fenthion'un *Galleria mellonella* L.'nin Antioksidan Savunma Sistemi ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman, 2013, 334704.
- Yazgan, M., 2001. Antalya Körfezinde Avlanan Bazı Su Ürünlerinde Cu, Zn, Pb ve Cd İçeriği. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Antalya.
- Yılmaz, E., 2013. Farklı dozlardaki alüminyum klor'ün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın biyolojisine ve hemosit sayılarına etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi.
- Young, I. S., Woodside, J. V., 2001.Antioxidants in Health and Disease, Journal of Clinical pathology, 54(3), 176-186.

- Zhang, ZS., Lu, XG., Wang, CQ., Zheng, DM.,2009. Mercury, cadmium and lead biogeochemistry in the soilplant-insect in Hulado City. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 83: 255-259.
- Zheng, DM., Wang, QC., Zhang, ZS., Zheng, N., Zhang, XW.,2008. Bioaccumulation of total and methyl mercury by arthropods. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 81: 95-100.
- Zorlu, T., Nurullahoğlu, Z.U., Kaya, S., 2015. Effects of Titanium dioxide Nanoparticles on Hemocytes of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) International Conference on Civil and Enviromental Engineering, 20-23 May, Cappadocia, Turkey.

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa ÖNEL, İlköğrenimini İsmail Sefa Özler İlkokulu'nda, ortaöğrenimini İmadettin Levent Ortaokulu'nda, lise öğrenimini Yüreğir Cumhuriyet Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazandı. 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimini , 2015 yılında Çukurova üniversitesi Eğitim Fakültesinde formasyon eğitimini tamamlayarak mezun oldu. 2016 yılında Milli Eğitim Bakanlığına Biyoloji öğretmeni olarak atandı. 2019 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.