

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ZEBULARİN'İN *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'NİN
ANTİOKSİDAN ENZİMLERİNE ETKİSİ**

EBRU ÇAKIR

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEBULARIN'IN *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'NİN
ANTIOKSİDAN ENZİMLERİNE ETKİSİ

EBRU ÇAKIR

Dr.Öğr.Üyesi Fevzi UÇKAN

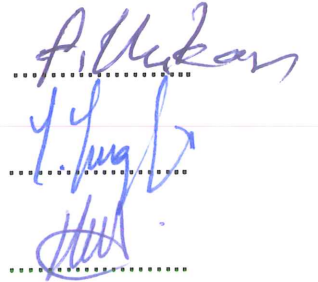
Danışman, Kocaeli Üniv.

Dr.Öğr.Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Doç.Dr. Hülya ALTUNTAŞ

Jüri Üyesi, Eskişehir Teknik Üniv.


.....
.....
.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 19.07.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren desteğini ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren değerli Danışman Hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fevzi UÇKAN'a teşekkürlerimi içtenlikle sunarım. Çalışmalarım süresince deneyim ve bilgileri ile yol gösteren, bana olan güvenini hep hissettiren hocam Sayın Arş. Gör. Rabia ÖZBEK'e, tüm bölüm hocalarıma ve laboratuvar arkadaşlarıma, deney çalışmalarımda beni cesaretlendiren ve destek olan arkadaşım Dilara ÖZYILMAZ'a teşekkürü borç bilirim.

Son olarak, sonsuz sevgi ve şefkatini yaşamım boyunca benden esirgemeyen merhamet ve sevgi duygusunu ben ve kardeşlerime en güzel şekilde aşıl原因an, çocukları için her türlü zorluğa göğüs geren, bana olan güvenlerini her zaman hissettiren canım annem Hatice ÇAKIR'a, ona karşı olan özlem ve sevgimin asla azalmayacağı rahmetli babam Hüseyin ÇAKIR'a sonsuz teşekkür ederim. Her zaman yanımda olduklarını hissettiren, bana sırdaş ve dost olan sevgili ablam Halime KAYABAŞI'na ve kız kardeşim Hilal ÇAKIR'a, Eniştem Onur KAYABAŞI'na içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmam Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 215Z079 kodlu proje ile desteklenmiş olup, desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Haziran – 2019

Ebru ÇAKIR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	5
1.1. Metilasyon.....	5
1.2. <i>Galleria mellonella</i> L. 'nın Biyolojisi;.....	8
1.3. Zebularin.....	7
1.4. Serbest Radikaller (Oksidanlar).....	9
1.4.1. Süperoksit anyon radikali (O_2^-).....	10
1.4.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	10
1.4.3. Hidroksil radikali (OH).....	11
1.4.4. Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO_2).....	11
1.4.5. Singlet oksijen (1O_2).....	11
1.5. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkisi.....	13
1.6. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkisi.....	14
1.7. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	15
1.7.1 Antioksidanların sınıflandırılması.....	16
1.8. Enzimatik Antioksidanlar.....	17
1.8.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	17
1.8.2. Katalaz.....	17
1.8.3. Glutatyon S-Tranferaz.....	18
2. MATERYAL VE METOD.....	19
2.1. Laboratuvar.....	19
2.2. Konak Stok Kültür.....	19
2.3. Konak Süksesif Kültür.....	20
2.4. Deney Gruplarının Hazırlanması.....	21
2.4.1. Zebularin uygulaması.....	22
2.4.2. Hemolenf alma ve saklama.....	22
2.4.3. Antioksidan enzim aktivitesi ve MDA miktarı.....	23
2.4.3.1. Protein tayini.....	23
2.4.3.2. Katalaz aktivitesi.....	24
2.4.3.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi.....	25
2.4.3.4. Glutatyon S-Tranferaz aktivitesi.....	28
2.4.3.5. Malondialdehit Miktarı Tayini.....	29
2.5. İstatistiksel Analiz.....	32
3. BULGULAR.....	33
3.1. Katalaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	33
3.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	35
3.3. Glutatyon S-Tranferaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	36
3.4. Malondialdehit Miktarı Üzerindeki Etkisi.....	37
4. TARTIŞMA.....	39
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	47

KAYNAKLAR.....	49
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER.....	63
ÖZGEÇMİŞ	64



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. DNA metiltransferaz (DNMT) İnhibitörleri ve İnhibitör sistemleri.....	7
Şekil 1.2. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonuçları.....	12
Şekil 1.3. Oksidatif stres oluşumu	15
Şekil 2.1. <i>Galleria mellonella</i> 'nın larva, pupa, olgun erkek, olgun dişi formları.....	20
Şekil 2.2. Zebularin'in yapısal formülü.....	21
Şekil 2.3. Zebularin'in uygulaması.....	22
Şekil 2.4. Sığır serum albümin (BSA).....	24
Şekil 2.5. SOD standart eğrisi.....	27
Şekil 2.6. MDA standart eğrisi.....	31
Şekil 3.1. Farklı Dozlardaki ZEB'in <i>G. mellonella</i> larva formları üzerindeki katalaz aktivitesine etkileri.....	34
Şekil 3.2. Farklı dozlardaki ZEB'in <i>G. mellonella</i> larva formları üzerindeki süperoksit dismutaz aktivitesine etkileri.....	36
Şekil 3.3. Farklı dozlardaki ZEB'in <i>G. mellonella</i> larva formları üzerindeki glutatyon s-tranferaz aktivitesine etkileri.....	37
Şekil 3.4. Farklı dozlardaki ZEB'in <i>G. mellonella</i> larva formları üzerindeki malondialdehit miktarına etkileri	38

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Serbest radikallerin oluşturduğu oksidanlar ve antioksidan enzim mekanizmaları.....	13
Tablo 1.2. Antioksidanların sınıflandırılması.....	16
Tablo 2.1. Sak ve ark tarafından besin modifiyesi.....	21
Tablo 2.2. SOD standartları.....	26
Tablo 2.3. MDA kolorimetrik standartları.....	30
Tablo 3.1. Zebularinin CAT SOD ve GST antioksidan enzimleri ile MDA seviyesi üzerine etkisi.....	33
Tablo 3.2. Farklı dozlardaki ZEB'in <i>G. mellonella</i> larva formları üzerindeki katalaz aktivitesine etkisi.....	34
Tablo 3.3. Farklı dozlardaki ZEB'in <i>G. mellonella</i> larva formları üzerindeki süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi.....	35
Tablo 3.4. Farklı dozlardaki ZEB'in <i>G. mellonella</i> larva formları üzerindeki glutatyon s-tranferaz aktivitesine etkisi.....	36
Tablo 3.5. Farklı dozlardaki ZEB'in <i>G. mellonella</i> larva formları üzerindeki malondialdehit miktarına etkisi.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Derece celcius
cm	: Santimetre
dak	: Dakika
g	: Gram
Kg	: Kilogram
L	: Litre
Mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
M	: Molar
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
ppm	: Parts per million
U	: Ünite

Kısaltmalar

AZA	: Azadiraktin
BSA	: Bovine serum albümin (Sığır serum albümini)
CAT	: Katalaz
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CH ₃	: Metil
CpG	: Sitozin, Fosfat, Guanin
Cu	: Bakır
Cu/ZnSOD	: Bakır/çinko süperoksitdismutaz
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNMT	: DNA metiltransferaz
EDTA	: Diaminetetraasetik asit
Fe	: Demir
GA ₃	: Giberellik asit
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon-s-transferaz
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HDAC	: Histon deasetilaz
IAA ₃	: İndol-3-asetik asit
KCl	: Potasyum klorür
KPO ₄	: Potasyum fosfat
LD ₅₀	: Deney hayvanlarının % 50'sini öldürmek için gerekli lethal doz

LO ⁻	: Alkoksil
LOO ⁻	: Peroksil
LOOH	: Lipid Hidroperoksit
LPO	: Lipid Peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
Mn	: Mangan
NaCl	: Sodyum Klorür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojen
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NO	: Nitrik Oksit
NO ₂	: Nitrojen dioksit
O ₂	: Moleküler Oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit
¹ O ₂	: Singlet Oksijen
OH ⁻	: Hidroksil
PMSF	: Fenil Metil Sülfonilflorid
RNA	: Ribonükleik Asit
RO	: Alkoksil
ROO	: Peroksil radikali
ROOH	: Organik peroksitler
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TCA	: Tiyokloro Asetik Asit
UV	: Ultraviyole
XA	: Ksantotoksin
XOD	: Ksantin Oksidaz
ZEB	: Zebularin
Zn	: Çinko

ZEBULARIN'İN *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)'NİN ANTIOKSIDAN ENZİMLERİNE ETKİSİ

ÖZET

Sitozin metilasyonu, DNA'daki sitozin kalıntısını 5-metilsitozine dönüştürmek için bir metil grubu ekleyen süreçtir. Metilasyon sürecine DNA metiltransferazları tarafından aracılık etmektedir. Zebularin (ZEB), ur ve kist tümör hücrelerinde hipermetile edilmiş genleri yeniden aktive eder, ayrıca kanser hücreleri üzerinde tercihli bir etki gösteren DNA metiltransferazları ile kovalent bir kompleks oluşturan sitidin analogudur. Bal mumu güvesi *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) son evre larvalarına farklı dozlarda (0,25-32 mg / ml) verilen ZEB'in antioksidan enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri incelendi. *G. mellonella* erginleri 25 ± 5 ° C' de, % 60 ± 5 RH' (bağıl nem) ve 12: 12 (Aydınlık: Karanlık) saatlik bir fotoperiyod uygulanan laboratuvar şartlarında yetiştirildi.

SOD, GST, MDA aktivitesi ticari olarak temin edilen deney kitleri kullanılarak belirlendi. Bir mikroplaka okuyucuda ksantin ve ksantin oksidaz sistemler kullanılarak 450 nm'de SOD absorbansı belirlendi. GST aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen ve substrat olarak indirgenmiş glutatyon ile 5 dakika boyunca 340 nm'de belirlendi. CAT aktivitesi ise, 240 nm'de hidrojen peroksit (H_2O_2) bozunmasına bağlı olarak absorbanstaki azalmanın ölçülmesiyle tayin edildi. Malondialdehid (MDA), lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir. MDA-Tiyobarbitürik asit (TBA) katkısı, MDA ve TBA'nın yüksek sıcaklıkta reaksiyonu ile oluşturuldu ve asidik koşullarda 540 nm'de absorbansı ölçüldü. ZEB enjeksiyonu, son evre *G. mellonella* larvalarının antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliğe neden olmaz iken tüm dozlarda MDA seviyesinde artışa neden oldu. Sonuçlar için iki olası sebep öngörülmektedir. Birincisi, ZEB'in, *G. mellonella*'da DNA metilasyonu üzerindeki engelleyici etkisinin bir sonucu olabilir, bu da böceklerde gen transkripsiyonunun azaltılmasına yol açabilmektedir. İkincisi, yüksek oksidatif stresin enzimlerin azalan aktivitesine neden olmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan Enzimler, DNA Metilasyonu, *Galleria mellonella*, Lipid Peroksidasyonu, Zebularin.

EFFECT OF ZEBULARINE ON ANTIOXIDANT ENZYMES OF *Galleria mellonella* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

ABSTRACT

Cytosine methylation is a process that adds a methyl group to a cytosine residue of DNA to convert it to 5-methylcytosine. The process of methylation is mediated by DNA methyl transferases. Zebularine (ZEB) reactivates hypermethylated genes in yeast and solid tumor cells, with DNA methyltransferases that show a preferential effect on cancer cells, is a cytidine analog that forms covalent complex. Were investigated the effects of various doses (0.25-32 mg/ml) of ZEB, on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) in the of last instars. *G. mellonella* were grown at 25 ± 5 ° C, 60 ± 5 RH (relative humidity) and 12: 12 (light: dark) hours of a photoperiod applied laboratory. SOD, GST, and MDA activities were determined using commercially available test kits. Absorbance was read in a microplate reader and SOD activity was determined at 450 nm using xanthine and xanthine oxidase systems. GST activity was determined with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene and reduced glutathione as substrates at 340 nm for 5 min. CAT activity was determined by measuring the decrease in absorbance at 240 nm due to hydrogen peroxide decomposition. Malondialdehyde (MDA) is an indicator of lipid peroxidation. The complex of MDA-Thiobarbituric acid (TBA) was determined by high temperature reaction of MDA and TBA and absorbance was measured at 540 nm under acidic conditions. Injection of ZEB in last instars *G. mellonella* resulted in a considerable increase in MDA level at all doses but not in antioxidant enzyme activities. Two possible reasons may be to explain of these results. First, this effect could be a result of the inhibitory effect of ZEB on DNA methylation in *G. mellonella*, which led to reducing gene transcription in insects. Second, it was likely that high oxidative stress might cause a decreasing activity of enzymes.

Keywords: Antioxidant Enzymes, DNA Methylation, *Galleria mellonella*, Lipid Peroxidation, Zebularine.

GİRİŞ

Günümüzde ksenobiyotiklere maruz kalmadığımız gün yok denemeyecek kadar azdır. Ksenobiyotikler; yani çevremizdeki sanayi atıkları, çevresel kirleticiler, radyoloji cihazları, bağımlılık etkisi olan maddeler, ağır metaller, besin katkı maddeleri, tarım zararlıları için kullanılan pestisidler ile psikotropik ilaçlar gibi birçok kimyasal ve biyolojik madde doğrudan veya dolaylı olarak canlılar da toksik etkiye sebep olmaktadır. Bu gibi etkenlere maruz kalmada, zaman, sıklık ve doza bağlı özelliklerin yanında, bu etkenlerin toksik etkisinde görev alan gen ve enzimlerdeki birçok farklı özelliğe bağlı olarak canlılarda yüksek veya düşük seviyede toksik etki oluşmaktadır (Alam, 2014). Kısa bir süre ile düşük seviyede doza maruz kalınan ksenobiyotikler, DNA'da kalıcı etkiye neden olmayabilirler. Fakat kronik olarak maruz kalınan ksenobiyotikler mutasyonlara veya birçok farklı kansere neden olabilmektedir (Young, 2002).

Kanser genetik veya epigenetik değişikliklerin birikmesi ile sonuçlanan, çok yollu kompleks bir hastalıktır. Kanser oluşumu onkogenlerin başlangıcına veya tümör baskılayıcı genlerin işlevsel kaybı ile hücrelerin kontrolsüz çoğalma ve metastatik özellikler kazanması ile ifade edilir. Kanserde epigenetik düzenlenmenin bozulması erken evrelerde meydana gelmektedir. Böylece gen işlevlerinin değişmesinde, malign dönüşümde ve kanserin ilerlemesinde önemli rolü vardır (Kanwal ve Gupta, 2002). Tüm genomda 5-metilsitozin içeriğinin azalması ile tüm genom hipermetilasyonu çoğunlukla kanser hastalarında saptanmakta ve kanser ilerleyişini arttırmaktadır (Matsusaka ve ark, 2014). DNA metilasyonu memelilerde, CpG dinükleotidlerindeki sitozin halkasının 5' karbon molekülüne metil (CH₃) grubu eklenmesi ile oluşan kovalent bir olaydır. DNA'ya metil grubunun eklenmesi ile transkripsiyon baskılanır ve gen sessizleştirilir (Choi ve Lee, 2013). DNA metilasyonu memeli genomunda fizyolojik olarak embriyo gelişimi, yer değiştirebilen (transposable) elementlerin etkisizleştirilmesi, kromatin yapısının düzenlenmesi, genomik imprinting, gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik görevlerde rol oynar. Bu kovalent değişiklik DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri ile katalize olmaktadır (Kanwal ve Gupta, 2002).

DNA hipermetilasyonu karsinogenezin erken evrelerinde ortaya çıktığı için kanserde erken teşhis amacıyla kullanılabilme potansiyeline elverişlidir. Çeşitli doku (taze, parafine gömülü) ve vücut sıvılarında (kan, idrar, tükürük, gaita, bronşial sıvı, mide sıvısı vs) metilasyon belirlenebilir (Mikeska ve Craig, 2014).

DNA metilasyonunun inhibitörleri susturulmuş olan genleri tekrardan aktive edebilirler. Bu tür ilaçların iki örneği 5-azasitidin ve 5-aza-2'-deoksisitidindir (Egger ve ark, 2004). Bu ilaçlar sitozin nükleotidi gibi davranarak ve DNA eşlenmesi sırasında kendilerini DNA'ya katarak çalışmaktadırlar. Sonrasında ise, DNMT enzimlerinin çalışmasını engelleyerek DNA metilasyonunu önlemede rol oynarlar (Egger ve ark, 2004). Fakat kanser iyileştirmesinde metile edici ilaçların klinik faydaları, toksik etkileriyle de kısıtlıdır (Juttermann ve ark, 1994). Günümüzde bu ajanlardan hematolojik kanserlerin iyileştirilmesinde faydalanılmaktadır (Goffin ve Eisenhauer, 2002).

Organizmanın farklı organlarında gelişerek organizmayı etkileyen kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra çok sık görülen ölüm sebeplerinden biridir (Onat ve Emerk, 1997). Kanser hastalığının %10-15'lik kısmının kalıtsal olarak, %85-90'lık kısmının da canlılık süresince organizma DNA'sının, mutajenik etkilere maruz kalması, DNA'da ki ilerleyen değişimler ve replikasyonda oluşan hatalar ile kaynaklandığı bilinmektedir (Williams, 1992; Yokuş, 2012).

Yaşlanma, kalp hastalıkları ve kanser gibi ilk sıralarda yer alan birçok hastalıkta lipid peroksidasyonunun önemli rol üstlendiği bilinmektedir. Lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan Malondialdehit (MDA), doku reaksiyon zincir hızının bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Ueda, 1985; Ohkawa, 1979). Birçok çalışmada tümörlerde lipid peroksidasyonunun arttığı belirlenmiştir. Lipid hidroperoksitler doğrudan DNA zincirini kırabilir ve lipid peroksil ve alkoksil radikalleri DNA'da oksidasyona yol açabilir (Cochrane,1991). Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar kurabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etkiye sahiptirler. Böylelikle, kanser ve yaşlanma olaylarında işlev gösterirler (Oakley ve ark, 1996) .

Katalaz ve GSH-Px enzimleri tarafından Hidrojen peroksit (H_2O_2), su ve moleküler oksijene çevrilerek metabolize olmaktadır (Portakal ve ark, 2000). Kanser, kalp hastalıkları, yaşlanma ve beslenme yetersizliği gibi birçok hastalık sonucunda oluşan oksidatif strese karşı antioksidan savunma gösteren öncelikli enzimdir. GSH-Px, glutatyonu substrat olarak kullanarak serbest oksijen radikalleri, peroksitler ve

kanserojenlere karşı savunmada önemli bir rol üstlenir. Tümör oluşumlarında hidrojenperoksite karşı savunmada GSH-Px, aktivitesinin artış gösterdiği belirtilmiştir (Kumaraguruparan ve ark, 2002; Serin ve ark, 1998).

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, kanser hastalığının kaynağı ve gelişmesi sırasında serbest oksijen radikallerinin rol oynadığını göstermektedir. Özellikle metal iyonlarının varlığında serbest oksijen radikalleri hücrede protein, lipid ve DNA içeren makromoleküller ile reaksiyon oluşturarak oksidatif hasara sebebiyet vermektedir. DNA hasarının artmasının, kanser oluşum mekanizmalarına katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. İyonlaştırıcı radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'ya etki ederek hücrede mutasyona ve ölüme sebep olurlar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyon oluşturur ve değişikliklere sebep olur. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂ membranlardan kolayca girer ve hücre çekirdeğine ulaşır DNA hasarına, hücre işlevselliğinde anormallik ve bozukluklara, ayrıca hücre ölümüne sebep olabilir. Farklı moleküllerin oksidasyonunu, antioksidan molekülleri bloke etmektedir. Oksidasyon kimyasal bir tepkime olup, maddenin sahip olduğu elektron veya hidrojenleri alarak, okside edici ajana taşımaktadır. Ve bu tepkime sonucunda serbest radikaller meydana gelmektedir. Böylelikle serbest radikaller zincirleme reaksiyon başlatırlar. Canlı hücredeki bu zincirleme reaksiyon, hücre hasarına veya apoptosise neden olmaktadır. Oksidasyon sonucunda hücre mutasyona uğrayarak farklı bir şekle dönüşür. Antioksidanlar, serbest radikalleri yok ederek, oluşacak olan zincirleme tepkimeleri ve farklı okside edici tepkimeleri bloke eder (Andreas, 1999). Canlı vücudunda okside edici olarak, ağır metaller, yağlar, yiyip içtiğimiz ve hatta soluduğumuz birçok kimyasal madde bulunmaktadır. Bu maddelere serbest radikal veya toksinler denilmektedir. Okside edici ajanları hücreleri hedefi altına alan bir faktör olarak düşünürsek ilk faktör yani serbest radikal hücre duvarını hedef alırsa tek çeşit hasar, hedef protoplazmaya gelirse başka bir hasar, DNA'ya kadar ulaşırsa, işte o durumda çok daha önemli bir hasar oluşacaktır. DNA hücre yenilenmesi için gerekli kodları taşıdığından, DNA'da meydana gelebilecek hasarın önemi çok fazladır. DNA'da oluşacak olan hasarlar sonucunda kullanışlı olamayan yeni hücre meydana gelebilmektedir (Friedberg, 2003; Andreas, 1999). DNA onarımındaki hatalar, meme, kolon ve cilt kanseri gibi çok çeşitli kanser hastalığına sebebiyet vermekle birlikte, büyüme ve beyin anomalilerine de neden olmaktadır (Friedberg, 2003; Chu, 2000). Oluşan serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi birlikte fizyolojik denge halindedir. Bu dengenin serbest radikallerin lehine olması durumunda, hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısı hasar

görmekte, enzimler aktivitelerini kaybetmekte ve DNA hasarı meydana gelmektedir. Mitokondrilerdeki oksijenli solunum bozularak, litik enzimler aktif hale gelmekte, hücreden K⁺ kaybı fazlalaşır, damar geçirgenliğinde hasar oluşur, doku oluşumları parçalanır, trombosit agregasyonu ve dokularda fagositlik fazlalaşmaktadır (Berköz ve ark, 2009). Çeşitli kemoterapötik ajanlar serbest radikal oluşturarak hücre ölümüne sebep olmakta, antioksidanlar ise serbest radikalleri ve serbest radikal aracılıklı oksidatif reaksiyonları etkisiz hale getirmektedir (Simone ve ark, 2007; Prasad ve ark, 2002). Kemoterapi uygulanan insanlarda, plazma lipid hidroperoksitleri ve tiyobarbitürik asit (TBA)-reaktif bileşik artışı, kemoterapinin oksidatif strese sebep olduğunu göstermektedir (Sangeetha ve ark, 1990; Clemens ve ark, 1997; Lin, 2002). Serbest radikaller, hücrelerde özellikle yağ asitleri, lipidler ve proteinlere de hücum ederek farklı yapı ve biyomembran hasarlarına sebebiyet vermektedir. Memeli spermatozoonunun lipid kompozisyonu somatik hücrelerden oldukça farklıdır. Sperm hücre zarı fosfolipidler, steroller, doymuş ve doymamış yağ asitlerinden çokça zengin olması nedeniyle ROS hasarlarına karşı oldukça hassastırlar (Aitken, 2008; Tremellen, 2008; Agarwal, 2008; Sanocka, 2004; Kothari, 2010). Kemoterapötik ajanlar lipid, kolesterol ve protein peroksidasyonu ile oksidatif strese sebep olarak spermatogenik hücrelerde DNA hasarı, apoptosis, sperm kalitesinde azalmalara, hatta kısırlık gibi yan etkilerin erkek üreme sisteminde görülmesine sebep olmaktadır (Ateşşahin,2006; Türk, 2010; Donya, 2010 ve Alam, 2011). Birçok yeni ilaç geliştirilirken ilk olarak hayvanlar üzerinde tolere edilebilecek toksik etkileri incelenmekte sonrasında farklı tümörlerdeki etkisi ve buna karşı verilen yanıtlar incelenmektedir. Son aşamada ise kontrollü çalışılmış hastalarda uygulanarak elde edilen verilerin değerlendirilmesi yapılmaktadır (Akyol, 2004). *G. mellonella* gibi Lepidoptera üyesi olan bir böcek önceden virülans ve antimikrobiyal etkinlik çalışmaları için kullanılmıştır (Cook ve ark, 2013). Büyük balmumu güvesi larvalarının çalışmalarda kullanılmasının birçok faydası vardır. Çalışmalarda farmakokinetik ve farmakodinamik sonuçların elde edilmesini kolaylaştıran larvalar kullanılabilir. *G.mellonella*'dan elde edilen farmakokinetik sonuçlar, birçok antibiyotik klirens süresi, ilacın yarılanma süresi ve azami ilaç konsantrasyonu, insan sonuçları ile doğrudan bağlantılı olabilmektedir (Thomas ve ark, 2013). Yapılan birçok çalışma, mikrobiyal patojenite ve virülans belirleyicilerinin insanlar, fareler ve balmumu güvelerinde benzer olduğunu göstermektedir (Brennan ve ark, 2002; Jander ve ark, 2000). Böceklerin immun sistemi, memeli immun sistemine işlevsel ve yapısal olarak benzerdir (Cytrynska ve ark,2007; Browne ve ark, 2013).

1. GENEL BİLGİLER

Öncelikli olarak, 1940'ların başında Conrad Hal Waddington tarafından ortaya çıkarılan epigenetik, DNA dizi değişikliklerinden (genotip) bağımsız olarak, gen ekspresyonundaki (fenotip) kalıtsal değişiklikler olarak açıklanır (Gallipoli ve ark, 2015). Kalıtılabilir olan epigenetik değişimler, DNA dizisinde değişiklik oluşturmamaları ve geri döndürülebilir olmaları nedeniyle genetik değişimlerden ayrılırlar. Memelilerde görülebilen başlıca epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, histonlarda translasyon sonrası değişikliklerin ve kromatin yapı farklılıklarının ve kodlanmayan RNA'ların etkisiyle meydana gelir. Epigenetik modifikasyonların, mayoz ve mitoz bölünme yoluyla kalıtsal olduklarını gösteren çalışmalar vardır (Hamilton, 2011).

1.1. Metilasyon

Biyolojik organizmalarda gerçekleşen metilasyon, genlerin normal şekilde ifadesini ve düzenli gelişmesini gerçekleştiren, protein çalışmasını kontrol eden kimyasal bir reaksiyondur (Mann, 2007). Epigenetik işlevin bilinen öncüsüdür. Biyolojik sistemlerde protein ve DNA metilasyonu olarak iki ayrı işlevde görev almaktadır (Mann, 2007).

- Protein metilasyonu

Protein metilasyonu proteini oluşturan aminoasitlerden arjinin ve lizin aminoasitlerine metil grubunun aktarılması ile oluşmaktadır. Protein metilasyonu, histon proteinleri üzerinde çalışılmış ve bu nedenle histon metilasyonu da denilmektedir. Metil grupları histon metiltransferazlar (HDAC) enzimleri tarafından histonlara eklenmektedir. Metillenen histonlar, genlerin işlevini açık veya kapalı duruma getirerek gen oluşumunu kontrol eder (Grewal, 2004; Nakayama, 2001). HDAC inhibitörlerinin, farklı biyolojik işlevlerde etki etmeleri sebebiyle epigenetik hastalıklar dışında kalan, spinal kaslar atrofi, Huntington hastalığı, diyabet ve paraziter enfeksiyonların araştırılmasında da kullanıldığı görülmektedir (Imamura-Takigawa ve ark, 2003; Colletti ve ark, 2001).

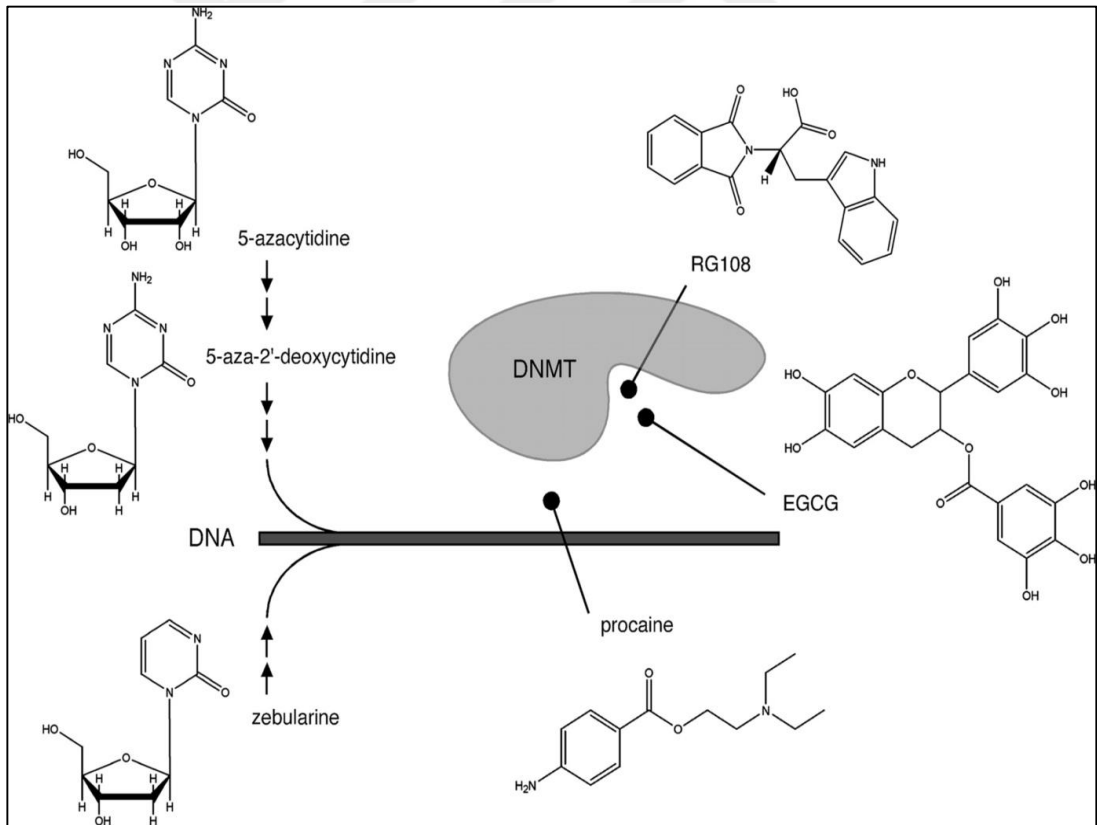
- DNA metilasyonu

Omurgalı organizmalarda, CpG (C;sitozin-P;fosfat-G;Guanin) bölgelerine DNA metiltransferaz enzimi ile bir metil grubunun eklenmesi sonucunda oluşmaktadır. DNA dizisindeki sitozin nükleotidinin 5 numaralı karbonuna metil grubu kovalent olarak bağlanır. Omurgalı genomlardaki CpG adacıkları olarak bilinen alanlar genellikle gen promotör alanlarında yani gen başlangıç bölgelerinde fazlaca yer almaktadır. Ve bu bölgeler CpG adacıkları tarafından belirtilmiş ve bağlanma gerçekleştirecek moleküller için tanınma alanı oluşturmaktadır (Bird, 2003; Baylin ve ark, 1998). Gen regülasyonunda önemli görevleri olan DNA metilasyonunun seviyesindeki azalış (hipometilasyon) veya artış (hipermetilasyon) farklı patolojik olaylarla sonuçlanır (Carrio ve Suelves, 2015; Kim ve ark, 2009). DNA metilasyonu epigenetik düzenlemeyle bağlantılı önemli bir mekanizmadır. İnsan kanser hücrelerindeki genetik bozuklukların epigenetik değişikliklere sebep olabildiği de gösterilmiştir. Örneğin, lösemi-destekleyici PML-RAR füzyon proteini, füzyon proteini için hedef genlere DNA metiltransferazlar ekleyip ve böylece epigenetik susturmayı başlatabilmektedir (Di Croce, 2002). DNA metiltransferaz inhibitörü 5-azasitidin (Vidaza), son zamanlarda, Miyelodisplastik sendromun tedavisi için bir antitümör ajan olarak Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. DNA metiltransferaz aktivitesi, tümör büyümesinde önemli bir işleve sahiptir ve DNA metiltransferaz inhibitörlerinin aktivitesi, doğrudan DNA seviyesinde analiz edilebilir (Egger, 2004).

DNA metiltransferaz inhibitörleri; Nükleozid sitidin basit bir türevidir olan DNA metiltransferaz inhibitörü 5-azasitidin (Şekil 2), ilk olarak tanımlanmıştır (Sorm, 1964). Demetilasyon aktivitesi, daha sonra hücrel farklılaşmayı etkileme yeteneğinin bir sonucu olarak keşfedilmiştir (Jones, 1980). 5-Azasitidin, DNA'ya dahil edilen bir nükleosit inhibitörüdür. DNA metiltransferazlar hem sitozin kalıntıları hem de DNA'daki 5-azasitidin kalıntılarıdır. Bununla birlikte, 5-azasitidin kovalent reaksiyon ara maddesinin çözünürlüğünü önler (Santi, 1984). Sonuç olarak, hücrel DNA metiltransferaz hızla tükenir ve aynı zamanda sürekli DNA replikasyonu sonucu genomik DNA demetilasyona uğrar. 5-Azasitidin, bir riboz nükleosittir ve bu nedenle DNA'ya dahil edilecek bir deoksiribonükleosit trifosfata kimyasal olarak modifiye edilmelidir. Tüm 5-azasitidin, bir deoksiribonükleosit trifosfata dönüştürülmeden önce, bunun bir kısmı, ribozom biyogenezini (Cihak, 1974) dahil olmak üzere çeşitli RNA fonksiyonlarını etkileyen ve bu nedenle, demetilasyondan bağımsız hücrel sonuçlara sahip olan RNA'ya dahil edilir (Mompalao, 1984).

1.2. Zebularin

DNA metiltransferaz inhibitörleri grubuna en son eklenmiş olan, 5-azasitidinin diğer bir türeği olan Zebularin (ZEB)'dir (Zhou, 2002) (Şekil 1. 1). Çeşitli kimyasal değişimlerden sonra, ZEB bir sitozin analogu olarak DNA'ya dahil olur. ZEB, 5-azacytidine veya decitabine'den daha stabildir ve ayrıca daha da az toksik olabilmektedir. Ağız yoluyla alınan ZEB, saptanabilir demetilasyona sebep olmaktadır. Ve çıplak kör farelerde tümör büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Cheng ve ark, 2003). Bununla birlikte, maymunlarda ZEB oral biyoyararlanımı düşük olarak bilinmektedir. Ve ilaç henüz klinik çalışmalarda değerlendirilmemiştir (Holleran, JL). ZEB'in kanser hücrelerine karşı belirli bir özelliği olduğu düşünülse de (Cheng ve ark, 2004), etki mekanizması, aza-nükleosit inhibitörlerinininki ile benzerdir. Bu sebeple, ZEB'in demetilasyon aktivitesinin, kovalent enzim yakalamasından kaynaklanan DNA metiltransferaz tükenmesinin toksik etkilerinden ayrılması da zor olabilir (Cheng ve ark, 2004).



Şekil 1.1. DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörleri ve inhibitör sistemleri (Frank, 2005)

Bir başka DNA metiltransferaz inhibitörü, 5-azasitidin deoksiriboz analogu olan 5-aza-2p-deoksisitidin (**desitabin**)'dir (Şekil 1.1.). Bu bileşiğin bir deoksi formunda modifiye edilmesi gerekmez ve doğrudan DNA'ya dahil edilebilir. Bu nedenle, desitabin 5-azasitidin'den daha spesifik ve daha az toksik olabilir; Desitabin, ilaç deney modellerinde DNA metilasyonu ve antitümör aktivitesinin daha fazla inhibisyonunu göstermektedir (Mompalao, 1984). Decitabine miyeloid malignitelerde tek ajan aktivitesine sahiptir (Santini, 2001; Leone, 2003). Miyelodisplastik sendrom, akut miyelojenöz lösemi ve kronik miyelojenöz lösemi de dahildir. Decitabine ayrıca, toksik etkiler, özellikle nötropenik ateş ile miyelosupresyona sahiptir (Issa, 2005). Bunların sebebi DNA ile yakalanmış DNA metiltransferaz proteinleri arasında kovalent adüktlerin oluşumuyla bağlantılı olabilir (Juttermann, 1994). Bu toksik etkiler, DNA metiltransferaz inhibitörleri için laboratuvar ve klinik verilerin çoğunun yorumlanmasındaki problemlerden birini oluşturmaktadır.

Kronik myelojenöz lösemili hastalarda decitabine ile ilgili yeni bir çalışmada, periferik kan hücrelerinde DNA'nın ilaca bağlı hipometilasyonunun, cevap vermeyenlere göre yanıt verenlerde daha az belirgin olduğu görülmüştür (Issa, 2005).

1.3. *Galleria mellonella* L. 'nın Biyolojisi;

Büyük balmumu güvesi *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larval dönemde zararlı etkileri görülen kelebek türüdür. Yumurtaların açılmasıyla çıkan larvalar peteğin orta ve üst bölümde tüneller bu bölümlerde yıkıntı ve döküntüler oluşturarak peteğe zarar gösterirler. Türün ergin hale gelen bireyleri ise genelde güneşin battığı zaman dilimlerinde dişi bireyler arı kovanlarına girerek bal arılarının erişemeyeceği yarı ve deliklere yumurtalarını bırakmaktadırlar. Ergin bireylerin peteğin üzerinde yumurta bırakması, petek balı ile beslenmesi, peteğe verdiği zararın beraberinde bu canlı türü arı yetiştiriciliğine zarar ve ekonomik açıdan büyük kayıplara sebebiyet vermektedir (Öder, 1983, Altınççek ve ark, 2007). Ergin dişi bireylerin petekler üzerine bıraktıkları yumurtaların 5-10 gün içerisinde açılmasıyla meydana gelen larvalar arıların oluşturduğu bal mumu, bal arısı larval gömlekleri ve atıkları ile beslenmektedirler. Besin ve sıcaklık koşullarına bağlı larval süreç 1- 5 ay içerisinde tamamlanır. Larvalar, pupa evresine geçinceye denk sekiz defa gömlek değiştirirler. Bu değişim gerçekleştiğinde larvalar pupalaşır. İlk zamanlarda açık sarı- turuncu renkte olan pupalar, ergin döneme yaklaştıkça koyu renk alırlar. Nem ve sıcaklık koşullarına bağlı bu dönem yaklaşık 8 - 10 gün içerisinde tamamlanır. Böylece larvalar son evre (ergin) dönemlerine girmiş olur.

Genelde ergin bireyler geceleri daha çok hareketlidir. Ergin dişi ve erkek bireyler pupadan çıktıktan sonra 24 saat içinde çiftleşebilmektedirler. Dişi birey bir defada 100 yumurta bırakabilir ve dişi bireylerin yaşam süresince bıraktıkları yumurta sayısı 300 ila 600 arasında değişir. Ergin evrede besin alımı yapamayan bireyler 3-30 gün yaşayabilirler ve yaşamlarını çalılık alanlarda geçirirler (Özer, 1961). Laboratuvar koşulları altında yetiştirilmesi olanaklı ve kültürü kolay oluşturulan bir tür olması sebebiyle, *G. mellonella* toksikoloji, fizyoloji gibi pek çok çalışma alanı için model organizma haline gelmektedir (Altınççek ve ark, 2007). Bu özelliğinden dolayı çeşitli fiziksel koşullardaki çalışmalar için de uygundur (Cymborowski, 2000). Bu türün larval evreleri, böceklerin hem hücresel hemde humoral savunma sistemlerinde uygun model oluşturur (Altuntaş, 2011).

G. mellonella'nın sistematikteki yeri şu şekildedir;

Alem	: Animalia
Şube	: Arthropoda
Sınıf	: Insecta
Takım	: Lepidoptera
Üstfamilya	: Pyraloidea
Familya	: Pyralidae
Altfamilya	: Galleriinae
Cins	: Galleria Fabricius, 1798
Tür	: <i>Galleria mellonella</i> (Linnaeus, 1758)

1.4. Serbest Radikaller (Oksidanlar)

Oksijenin insan yaşamı için çok önemli olmasına rağmen, metabolizma sırasında üretilen reaktif oksijen türleri insan vücuduna zarar verme eğilimindedir (Diplock, 1998). Serbest radikallerin oluşmasındaki başlıca etkenler arasında, tarım zararlıları ile mücadelede kullanılan pestisitler, UV-radyasyon, canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevresel kirlenmeler, tıbbi tedavi yolları ve kirlenmiş olan sular gösterilmektedir. Yaşamın elzem elemanı oksijenin (O_2); süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikaline ($HO\cdot$) dönüşümü ile toksik etkilere sebep olmaktadır (Fridovich, 1998). Tekli oksijen (1O_2), süperoksit anyonu ($\cdot O_2^-$), hidroksi ($\cdot OH$), peroksi ($ROO\cdot$) ve alkoksi ($RO\cdot$) serbest radikallerin başlıcalarıdır (Kaur ve Kapoor, 2001). Serbest radikaller, yüksek enerjili, sabit olmayan ve orbitallerinde çok fazla sayıda çiftlenmemiş elektron içeren bileşiklerdir. Çiftlenmemiş

olan elektronlar serbest radikallere yüksek reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi mekanizmaların bozulmasına ve zarar görmesine sebep olurlar. Bu bozulmaların yaşlanmayı teşvik ettiği, aynı zamanda kardiovasküler hastalıklar, çeşitli kanser hastalıkları, bağışıklık sistemi ve sinir sistemi bozuklukları gibi pek çok sağlık sorununa neden olduğu belirtilmiştir (Diplock, 1998).

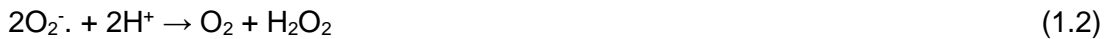
1.4.1. Süperoksit anyon radikali (O_2^-)

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden türeyen serbest oksijen radikalleridir ve sekiz elektron bulundurmaktadır. Hücredeki enerji metabolizmasında, süperoksit radikalleri, oksidazlar ya da oksidasyon sırasında bazı enzimlerin aktivitesi sonucunda oluşurlar. SOD enzimi süperoksit radikallerini inaktive edebilmektedir. Oksijen atomu, orbitalerinde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir ve oksijenin bu nedenle serbest radikallerle hızla reaksiyona geçmesini sağlarken radikal olmayan maddelerde daha yavaş reaksiyon gerçekleştirmesine sebep olmaktadır (Koç, 2007). Moleküler oksijenin (O_2), bir elektron vermesi ile kararsız bir yapıdaki, süperoksit radikali (O_2^-) oluşur Denklem (1.1). Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin etkisiyle oluşabilirler (Becker ve ark, 1999).



1.4.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

O_2^- 'ye bir elektron transferi veya O_2 'ye iki elektronun eklenmesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) radikali oluşur Denklem (1.2) (Flora, 2007).

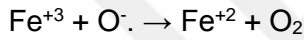


Kendi başına zayıf bir oksidan özelliğe sahip olan Hidrojen peroksit ortaklanmamış bir elektron bulundurmamaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS) kategorisine giren hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, serbest radikal biyokimyasında önemli bir role sahiptir. Geçiş metalleri veya Fe^{2+} varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının (O_2^-) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en önemli ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH) meydana getirir (Gutteridge, 1995).

1.4.3. Hidroksil radikali (OH)

Hidroksil radikali, Haber-Weiss reaksiyonu ve Fenton reaksiyonu sonucunda hidrojen peroksitten oluşmaktadır, fazlaca reaktif olan oksidan radikalidir. Biyolojik moleküller üzerinde etkili olan ve oluştuğu alanda büyük zararlı etkilere neden olan aktif bir oksidandır. Yarılanma ömrü çok kısadır (Koç, 2007). Reaktif oksijen çeşitlerinin en güçlüsüdür ve lipid peroksidasyonunda rol almaktadır. Yağ asitleri ve tiyoller gibi moleküllerden proton kopartarak tiyil radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni radikallerin meydana gelmesine ve sonuçta son derece fazla hasara sebep olmaktadır.

O₂'ye, üç elektronun transferi ile hidroksil (OH.) radikalleri oluşur. H₂O₂ veya O₂⁻, geçiş metalleri ile reaksiyona girerek, (OH.) radikallerinin ortaya çıkmasına neden olabilir Denklem (1.3) (Lloyd ve ark, 1997).



(1.3.)

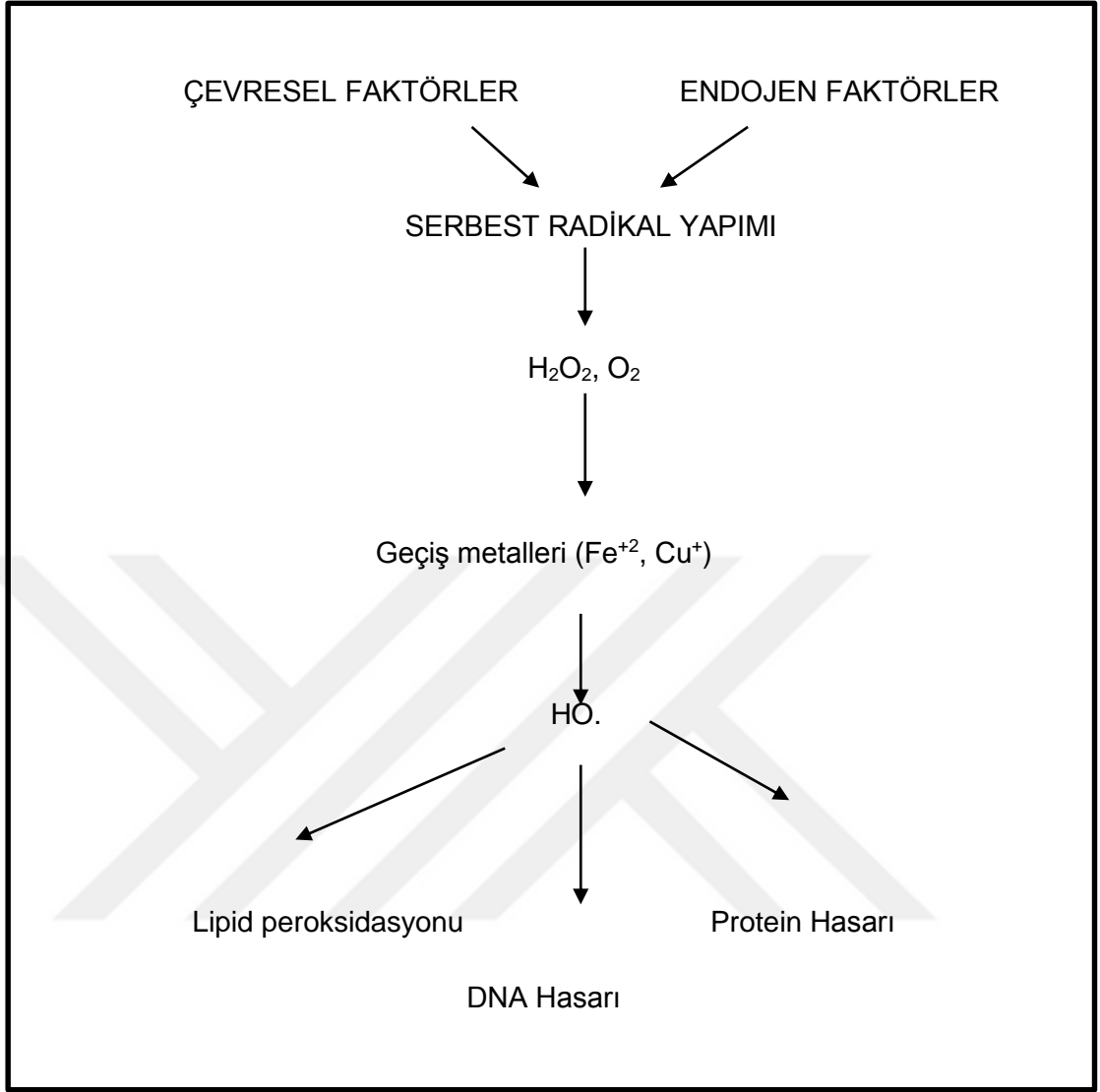


1.4.4. Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO₂)

Nitrik oksit ve nitrojen dioksit de eşleşmemiş elektronları ile birer radikallerdir. NO (nitrik oksit) ile oksijen ile reaksiyon gerçekleştirilmesi ve beraberinde NO₂ (nitrojen dioksit) oluşmaktadır. Çok güçlü ve zehirli bir oksidandır (Gutteridge, 1995).

1.4.5. Singlet oksijen (1O₂)

- Oksijenin eşleşmemiş elektronlardan birinin verilen enerji ile beraberinde bulunduğu orbitalden başka bir orbitale geçişi veya kendi orbitalinin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Bu durumda Oksijenin fazla enerjili ve mutajenik formudur (Yanbeyi, 1999). Serbest radikaller organizmada, endojen ve ekzojen olmak üzere iki şekilde oluşmaktadır.
- Endojen (elektron transport zinciri, endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, redoks döngüleri, otooksidasyon reaksiyonları esnasında ksantinoksidaz ile NADPH oksidaz gibi enzimlerinin etkisiyle oluşanlar)
- Ekzojen (sigara, ilaçlar, endüstriyel kirlenimler, diyet, UV ışık), (Halliwell, 1989).



Şekil 1. 2. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonuçları (Antmen, 2005).

Çalışmalar sonucunda serbest radikallerin, birçok hastalığa neden olduğu bildirilmektedir (Freeman ve ark, 1982; Carrole, 1987). Vücuttaki çeşitli doğal savunma sistemleri, serbest radikalleri kontrol altına alarak reaktif oksijenlerin zararlı etkilerine karşı koyabilmektedir. Bu sistemler birbirlerini tamamlayıcı görevdedir (Tablo 1. 1.) (Diplock, 1998).

Tablo 1.1. Serbest radikallerin oluşturduğu oksidanlar ve antioksidan enzim mekanizmaları

OKSİDAN	ANTIOKSİDAN
Sigara dumanı	Süperoksit dismutaz
Egzersiz	Katalaz
Çevre kirleticileri	Glutatiyon peroksidaz
Ateşli hastalıklar	Glutatiyon, Ubikinon,
Radyasyon	Selenyum, Ürik asit
Çoklu doymamış yağ asitleri ile zengin bir diyet	E vitamini, C vitamin
İskemi, Karsinojenler	β- karoten ve diğer karotenoidler

Serbest radikal reaksiyonları, omurgalılarda immün sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofaj gibi hücrelerin savunma sistemleri için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla oluşumu hücre hasarı ve ölümünü gerçekleştirmektedir. Oksijenli yaşamın normal bir aşaması olan oksidatif reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan ROT'lar DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipidler hücre yapılarına kovalent bağlanarak yapısal hasar oluştururlar. Oluşan reaktif türevler hücre zarının doymamış yağ asitlerine (lipid peroksidasyonu) ve protein bileşimine (protein oksidasyonu) zararlı etki göstermektedir (Halliwell, 1994; Heinle ve Betz, 1994). Serbest radikaller zar ile temas kurduğunda, zar ile işlevsel etkileşim içerisinde olan enzimler, hormonlar ve nörotransmitterler olumsuz yönde zarar görmektedir.

1.5. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkisi

Birçok farklı molekül ve bileşik bulunduran hücre membranı, serbest radikallerden zarar görmektedir. Membranda yer alan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış olan bağları, serbest radikaller ile hızlıca reaksiyon gerçekleştirerek lipid peroksidasyonunu ve ürünlerini meydana getiriler (Delibaş ve Özcankaya, 1995). Lipid peroksidasyonu (LPO), poliansatüre yağ asitlerinin alfa-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla aktifleşmektedir ve poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" da denmektedir (Akpoyraz ve Durak, 1995). LPO reaksiyonu, toplayıcı antioksidan reaksiyonlarıyla engellenir veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile ilerler (Gutteridge, 1995). Lipid peroksidasyonu, hücre zarında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest

oksijen radikallerin kontrolünde lipid peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması olayıdır (Felton ve Summers, 1995). Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı sonucunda oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki yerlerinden yayılmış olup hücrenin diğer kısımlarına hasarı yayarlar. MDA yağ asidi oksidasyonunun kantitatif bir indikatörüdür ve lipid peroksidasyonunun seviyesi iyi uyum içerisinde. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olan bir aldehid olup oksidatif stresin seviyesi ile orantılı miktarda artmaktadır (Suwalsky ve ark, 2001). Oluşan MDA, hücre zarlarındaki iyon alışverişine etki göstererek hücre zarındaki bileşiklerin çapraz bağlanması, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin farklılaşması gibi olumsuz sonuçlar meydana getirir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit miktarının belirlenmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (Düzgüner, 2005). Lipid peroksidasyonuna karşı böceklerin duyarlılıkları oldukça yüksek seviyededir, çünkü lipidler kolesterol ve esansiyel hücre membran bileşenlerinin yapı taşlarını oluşturur ve fizyolojik işlevlere sahiptirler (Downer, 1986). MDA miktarındaki artış bize, böceklerdeki lipid peroksidasyonu düzeyi ile ilgili sonuçları göstermektedir (Krishnan ve ark, 2009).

1.6. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkisi

DNA'yı etkileyen serbest radikaller mutasyon oluşumuna sebebiyet verir. Hidroksil gibi serbest radikal bileşiklerinin DNA bazları üzerindeki etkisi çok fazladır ve geri dönüşümü olmayan değişikliklere sebep olmaktadır (Marnett, 2002). Çalışmalarda vücuttaki lipid peroksidasyonu ve serbest radikallerin mide ülserine ve kanserine neden olduğu bulunmuştur (Kanter ve ark, 2005). DNA hasarı serbest radikallerden dolayı her daim kaçınılmazdır. Oluşan hasarlar doğal DNA onarıcı mekanizma ile onarılmaya çalışılmaktadır. Fakat çevresel faktörler, zararlı alışkanlıklar (sigara, alkol vb), yanlış ve düzensiz beslenme, stresli yaşam koşulları nedeniyle doğal onarım sistemimiz artan hasarları onarmada etkisiz kalabilir. Böylece düzeltilemeyen hasarlar çeşitli hastalıklar, kanser veya apoptosis ile sonuçlanabilmektedir (Dönmez ve ark, 2008)

Serbest oksijen radikalleri, vücutta daimi bir şekilde oluşturulurlar ve buna karşı olarak antioksidan savunma mekanizmaları tarafından yok edilirler. Bu düzenli işlev sisteminin bozulması sonucunda, serbest oksijen radikallerinde artış ve hücre hasarı meydana gelir; bu oluşuma " oksidatif stres " denir (Şekil 1. 3.). Günümüzde birçok

farklı hastalığa, zihnin ve vücudun yaşlanmasına, oksidatif stresin sebep olduğu ifade edilmiştir (Halliwell,1991; Halliwell, 1994).



Şekil 1. 3. Oksidatif stres oluşumu

Oksijenli solunumda daimi olarak oluşabilen ROS; UV-radyasyon, ozon, sigara, ilaçlar, pestisitler gibi kimyasal etkenlere maruz kalınmasından dolayıda hücre ve dokularda oluşur (Davies ve Dean 1997). ROS hücrede oksidatif hasara sebep olup, böylece bozulmalara ve yaşlanmaya neden olmaktadır (Orr ve Sohal 1994; Hermes ve Zenteno, 2002). Düşük seviyelerdeki oksidatif DNA hasarı en düşük hata payı ile etkin bir biçimde onarılabilir. Fakat DNA onarım enzimleri ile DNA polimeraz'ın oksidatif stres sonucunda hasara uğraması, düzgün replikasyon ile transkripsiyon oluşumunu düşürmektedir. DNA'daki oksidatif hasar, canlılık süreci ile uyuşmayan yüksek seviyelere vardığında ise apoptosis ile sonuçlanmaktadır (Burçak ve Andican, 2004).

1.7. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin canlı vücudunda yol açtığı hasarı ortadan kaldırmak ve oluşacak hasarı önlemek için çeşitli mekanizmalar bulunur. Canlı vücudunun en temel ve önemli savunma mekanizması antioksidanlardır. Vücuda zararlı sonuçları olan serbest radikallere ve oksidatif strese karşı savunma gösteren suda veya yağda çözünebilen yaşamsal biyomoleküllerdir. Bu sisteme 'antioksidan savunma sistemleri' sistemin kullandığı moleküllere ise 'antioksidanlar' denmektedir (Nice,1997). Serbest radikallerin saldırısından sonra hücreler, DNA'yı onarabilen, lipid hidroperoksitleri

metabolize eden ve hasarlı proteinleri yıkabilen sistemler içerirler. Bu sistemlerden biri olan antioksidanların genel olarak etkilerine bakıldığında; (Datsenko, 1996)

a)Toplayıcı etki b) Bastırıcı etki c) Zincir kırıcı etki d) Onarıcı etki (Halliwell ve ark, 1992)

1.7.1 Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır (Tablo 1. 2.) (Aydemir,2009; Sen, 2011). Endojen ve eksojen antioksidanlar, oksidan-antioksidan dengesini korumak için, serbest radikallerden vücudu korumak ve radikalleri etkisiz hale getirmek için kullanılırlar.

Tablo 1. 2. Antioksidanların Sınıflandırılması

ENDOJEN ANTIOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR (Birincil)	NONENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR (İkincil)	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	α -lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin
EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR		
VİTAMİN ANTIOKSİDANLAR (İkincil)	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	
α -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)	
β -karoten (Vitamin A)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
Askorbik asit (Vitamin C)	Trolox-C (vitamin E analogu)	
Folik asit (Vitamin B9)	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)	
	Nötrofil adezyon inhibitörleri	
	Sitokinler (TNF ve IL-1), Barbitüratlar, Demir şelatörleri	

Birincil ve ikincil gruptaki antioksidanlar, oluşmuş olan serbest radikallerle reaksiyon oluşturup, bu radikallerin daha zararlı hale dönüşmelerini ve yeni oluşacak radikallerin oluşmasını engelleyen bileşiklerdir (Diplock, 1998). Birincil enzim sistemleri (sod, cat, glutasyon peroksidaz gibi) serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Genel anlamda

serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak şartıyla hücreler arası geçişini de engelleyebilmektedirler (Diplock, 1998). C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi ikincil enzimler ise; Genelde radikal zincir reaksiyonlarını parçalayan ve oksijen radikalini tutan bileşiklerdir (Ou ve ark, 2002).

1.8.Enzimatik Antioksidanlar

1.8.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD), ROT'lara karşı öncül antioksidan enzimdir. SOD, süperoksit molekülünün hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler Denklem (1.4) (Young ve Woodside, 2001).



Bu enzim ile redüktif detoksifikasyon oluştuğunda, her $O_2^{\cdot -}$ radikali için bir H_2O_2 molekülü oluşmakta ve farklı hücresel indirgeyiciler, örneğin NADPH tüketilmektedir (Benov,1998; Fridovich, 1989). Bu dismutasyon tepkimesi süperoksit radikalinin katyon ve anyon formlarının aynı oranda olduğu pH 4,8'de kendiliğinden de oluşabilmektedir. Ancak, fizyolojik şartlarda pH'nın 7,35-7,45 arasında olduğu durumda tepkime daha yavaş olacaktır (Memişoğulları, 2005). SOD, aerobik canlılarda bulunmaktadır ve memelilerde üç tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn içeren Cu-ZnSOD, extraselular etki gösteren ECSOD ve mitokondri de tetramerik Mn içeren Mn-SOD izomerlerdir. SOD'un Fe içeren izomeri Fe-SOD ise yalnızca mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. SOD'un tüm çeşitleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler (Buettner ve ark, 2006).

1.8.2. Katalaz

Katalaz (CAT) molekül ağırlığı yaklaşık olarak 248,000 Dalton olup, çoğu hücre formunda çeşitli konsantrasyonlarda yer alan, dört tane hem grubu bulunduran bir hemoproteindir. Bu enzimin en önemli işlevi hidrojen peroksiti, moleküler oksijen ve suya katalizlemektir Denklem (1.5) (Yanbeyi, 1999; Akkuş, 1995).



Katalaz enzimi daha çok peroksizomlarda sınırlıdır ve macromoleküllü lipid hidroperoksitlerine etki göstermez. CAT'ın gösterdiği indirgeyici aktivite hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. CAT, kan,

mukoz membranlar, karaciğer, kemik iliği ve böbreklerde fazla miktarda yer almaktadır (Scibior ve Czezcot, 2006). H₂O₂ kuvvetli bir oksidandır, bitki dokularında yer alması herbivor canlıların gelişmesinde ve hayatta kalabilmesinde tehlikeli etki göstermektedir (Cadenas, 1989; Fridovich, 1989). H₂O₂ ile aminoasitlerin dekarboksilasyonu tiyollerin oksidasyonuna sebep olarak protein enzim ve glutatyonların işlevleri bozulmaktadır (Slump ve Schreuder, 1973; Berlett ve ark, 1990). Bu radikal DNA, membran lipidleri ve esansiyel hücresel yapıtaşları ile tepkime gerçekleştirir (Halliwell ve Gutteridge, 1984; Fridovich, 1989). Katalaz enzimi hücrelerin savunmasında SOD enzimi ile beraber önemli bir işlev üstlenmektedir (Kota ve Misra, 2005).

1.8.3. Glutasyon S-Tranferaz

Glutasyon S-Tranferaz (GST), çok substratlı bir enzimdir (Anton ve ark, 1990). Memelilerde, böceklerde, balıklarda, kuşlarda, annelid, mollusk ve birçok mikroorganizmada GST enzimi, yer almaktadır (Habig ve ark, 1974). Glutasyon S-transferazlar katalitik ve katalitik olmayan birçok işlevde rol oynar. GST'ler hem detoksifikasyon gerçekleştirirler hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı işleve sahiptirler. GST'ler, karaciğerde sitokrom P450 enzim tarafından reaktif ara ürünlere çevrilen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara çevrilmesini katalizlemektedirler (Özbey, 2009). GST'ler böceklerde toksiklerden korunmada rol oynayan detoksifikasyon enzimlerinin büyük bir ailesidir (Yu, 2004). Böceklerin birçok farklı yabancı bileşiklerle karşılaşması sonucu, bu bileşiklerin zehirliliğinin uzaklaştırılmasında ve böceğin buna karşı direnç geliştirmesinde, ayrıca hücresel membranların oksidatif hasarlara karşı korunmasını sağlamada GST enzimi önemli bir role sahiptir (Yorulmaz ve Ay, 2010). Glutasyon S-transferazların (GST) indirgeme işlevi, hücre bileşenlerini lipid peroksidasyonundan korumaktadır. Lipid peroksidasyonunun aldehit yapıda ürünleri olan 4-hidroksi alkenaller, GSH ile beraber çalışırlar. GST'ler doğal koruyucu oluşumlardan biri olarak ta bilinen herbisid, pestisid, antikanser ilaçlar, kimyasal kanserojenler ve çevresel kirlilikler vs. elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da güçlü bir işlev gerçekleştirirler. GST, *E.coli*'den memelilere kadar pek çok organizmada yer alıp insan, sıçan, fare, sığır, gibi hayvanların karaciğer, eritrosit, akciğer, plasenta ve barsak mukozasından izole edilerek incelemeler yapılmıştır (Gyamfi ve ark, 2004).

2. MATERYAL VE METOD

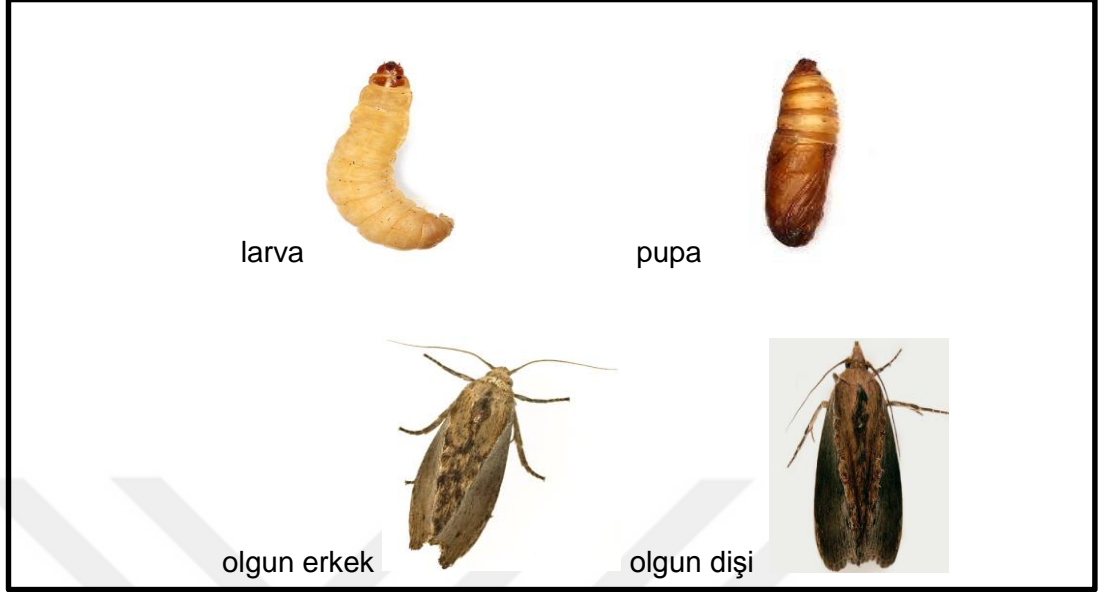
2.1. Laboratuvar

Konak kültürünün oluşturulması için 1,93 x 2,40 x 3,00 m² boyutlarında yapılmış bir oda kullanılırken, doz uygulamaları, gerekli ölçümlerin ve deneylerin yapılması için ayrı bir oda, laboratuvar olarak kullanıldı. Laboratuvardaki bu odalarda böceklerin devamlılığı ideal ortam olan, 25 ± 2°C sıcaklık, %60 ± 5 bağıl nem ve 12: 12 saat A: K (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot koşulları altında sağlandı. Bu koşulların oluşturulması ve takip ettirilmesinde elektrikli ısıtıcı, nem cihazı (içerisindeki su iki günde bir değiştirilerek) kullanıldı. Odaların sıcaklığı ve bağıl nemi düzenli olarak maksimum-minimum termometre ve higrometre ile takip edildi.

2.2. Konak Stok Kültür

Deneyleerde kullanılan konak kültür Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi laboratuvarında bulunan *G. mellonella* ile oluşturdu. (Şekil 2.1.) 25 ± 2°C sıcaklık, %60 ± 5 bağıl nem ve 12: 12 saat A: K (Aydınlık: Karanlık) fotoperiyot koşulları altında en çok 3 dişi ve 3 erkek *G. mellonella* erginlerinin 1 lt'lik kavanozlara konulması ve besin ihtiyaçlarını karşılamaları için kavanoz içerisine 5 g doğal olarak kararmış petek bırakılarak stok kültür oluşturuldu. Bu kavanozların ağızlarına hava devir daimini sağlayacak şekilde bir bez örtü koyuldu ve lastik geçirildi. Larvalar oluştuğunda bez örtüden dışarıya çıkıp kaçmasını önlemek amacıyla üzerinde delikler bulunan kavanoz kapakları ile kapatıldı. Oluşturulan kültür kavanozlarına tarih atıldı. Kültürün oluşturulmasında yaklaşık 10- 15 gün sonra dişi *G. mellonella* tarafından bırakılan yumurtaların açılmasından sonra birey yoğunluğuna bağlı olarak belirli aralıklarla belli bir ölçümde (bal, saf su, gliserin, kepek ve petek karışımı) hazırlanmış olan besin kavanozlara eklendi. Kavanozlardaki bireyler yoğunluklarına göre ayrı ayrı kavanozlara bölünerek, belirlenen günlerde önceden hazırlanmış olan besin karışımı ile beslendi. Bu kavanozlardan belirli boyuta gelmiş larvalar, toplanarak birey sayısı çok fazla olmayacak şekilde kolay pupa haline gelebilmeleri için kavanozlara alınıp içersine merdiven şeklinde katlanmış teksir kağıdı konuldu, delinmiş olan kapaklar ile kapatıldı, kavanozlara tarih atıldı.

Ve böylelikle geçen süre içerisinde ergin hale gelmiş olan kelebekler ile stok kültürün devamı süksesif kültürün oluşturulması sağlandı.



Şekil 2. 1. *Galleria mellonella*'nın larva, pupa, olgun erkek, olgun dişi birey formları

2.3. Konak Süksesif Kültür

3 dişi ve 3 erkek *G. mellonella* ergininin 1 lt'lik kavanozlara konulması ve besin ihtiyaçlarını karşılamaları için kavanoz içerisine 5 g doğal olarak kararmış petek bırakıldı. Bu kavanozların ağızlarına hava devir daimini sağlayacak şekilde bir bez örtü koyuldu ve üzerinde delikler bulunan kavanoz kapakları ile kapatıldı. Konak süksesif kültürü, konak stok kültürü ile aynı koşullar altında ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%60 \pm 5$ bağıl nem ve 12: 12 saat (A: K) fotoperiyot) tutuldu. Beşinci günün sonunda dişi ve erkek *G. mellonella* kavanozdan alındı. Böyle hazırlanmış olan konak süksesif kültür kavanozlarına birey yoğunluğuna bağlı olarak aralıklı günlerde sentetik besin verildi. Sentetik besin için (Bronskill, 1961), tarafından sunulan sentetik besinin, (Sak ve ark, 2006) tarafından kepek miktarı değiştirilmiş ölçüsü kullanıldı (Tablo 2. 1.). Böylece oluşturulan yumurta, larva, pup ve erginler süksesif kültürün sürdürülmesinde ve deneylerin yapılmasında kullanıldı.

Tablo 2.1. Sak ve ark., tarafından besin modifiyesi

	Bronskill Besini	Kullanılan Sentetik Besin
Ufalanmış Petek	200 g	200 g
Kepek	500 g	860 g
Süzme Bal	150 ml	150 ml
Gliserin	300 ml	300 ml
Saf Su	150 ml	150 ml

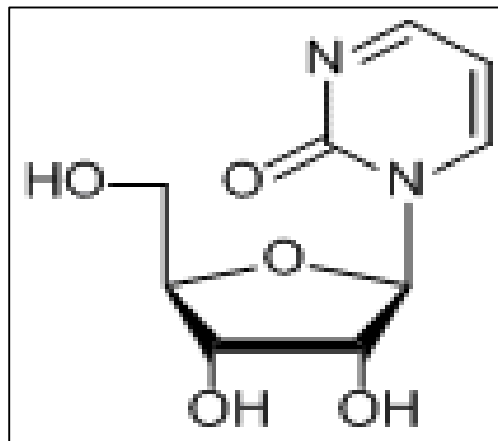
2.4. Deney Gruplarının Hazırlanması

ZEB'in, nükleozid analogları ailesindeki demetilasyon ajanları listesine en son eklenendir. İlk olarak 1961'de sentezlenmiş ve antitümör özelliklere sahip olan bir sitidin deaminaz inhibitörü olarak tanımlanmıştır.

Sonrasında ise DNMT inhibitörü, DNA metilasyonunu inhibe ederek ve susturulmuş genleri yeniden aktive etmektedir (Christine ve ark, 2010) .

ZEB anti-kanser tedavisinde tümör büyümesini engelleyen ve epigenetik çalışmalarda kullanılan bir ilaçtır.

Zebularin'in kimyasal formülü ($C_9H_{12}N_2O_5$) olup, molekül ağırlığı ise 228,20 g'dır (Şekil 2. 2.) (Anica ve ark, 2012).



Şekil 2. 2. Zebularin'in yapısal formülü

2.4.1. Zebularin uygulaması

G.mellonella'da ZEB uygulaması yapılırken, proje bütçesinden yararlanılarak Sigma Aldrich – Merck firmasından alınan ZEB, steril saf su içerisinde çözdürülerek (0,25), 1, 4, 8, 16, 32 mg/ml farklı doz konsantrasyonlarında hazırlandı. Laboratuvar ortamında yetiştirilmiş olan *G. mellonella* larvalarından 0,20 mg ağırlığında seçilerek, larvaların buz kaseti üzerinde hareket etme fonksiyonları yavaşlatıldı. Sonrasında bu larvalara arka (sağ veya sol) herhangi bir bacak bölgesinden hamilton marka şırınga yardımı ile 10 µl ZEB uygulaması yapıldı. ZEB topikal aplikasyon yöntemi uygulanarak verildi (Kaethner, 1992) (Şekil 2. 3.). ZEB uygulaması yapılan bu larvalardan 24 saat sonrasında hemolenf toplaması yapıldı.



Şekil 2. 3. Zebularin'in uygulaması

2.4.2. Hemolenf alma ve saklama

Farklı doz konsantrasyonlarında ZEB uygulanmış olan *G. mellonella* son evre larvalarına doz uygulaması yapıldıktan, 24 saat sonrasında ise hemolenf örneklerinin alımı yapıldı. Alınan larvalar birkaç kez distile suda yıkandıktan sonra hareket yeteneklerinin azalması için kısa bir süre buz kasetler üzerinde bekletildi.

Hemolenf almak için larvalar üçüncü ön bacak bölgesinden ince uçlu iğne ile delindi. Her bir birey için 10 µl hemolenf mikropipet tüp ile çekildi. Hemolenfler içinde çok az bir miktar feniltiyüüre (N-phenylthiourea (Sigma)) bulunan tüplere aktararak, analizler yapılincaya kadar -20°C bekletildi. Tüplerin tarih, doz ve çekilen hemolenf miktarı ile etiketlenmesi yapıldı. Bir deney serisinin her tekrarında 10 birey olacak şekilde hemolenf alındı.

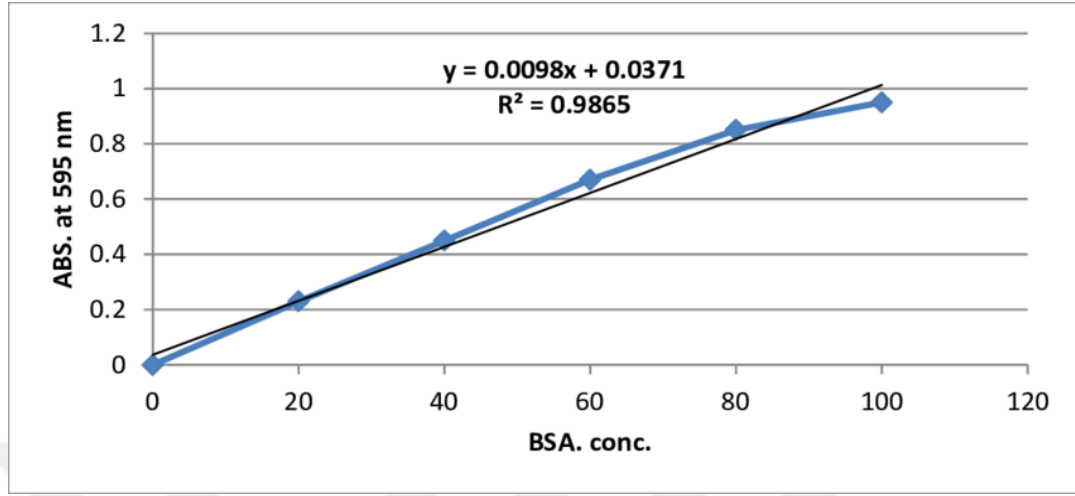
2.4.3. Antioksidan enzim aktivitesi ve MDA miktarı

Tüm antioksidan enzimlerin aktivitesini ölçme ve MDA miktarını belirleme işlemleri laboratuvarında yetiştirilen *G. mellonella* son dönem larvaları ile projenin ayırmış olduğu bütçe ile tedarik edilen ((Cayman Chemical, (SOD, 706002), (GST, 703302), (MDA, (700870)) deney kitlerinin deney prosedürü uygulanarak ELISA cihazında yapıldı.

2.4.3.1. Protein tayini

Deneyler de kullanılan *G. mellonella*'nın larva formlarında ki protein miktarını belirlemek için, Bradford yöntemi (Boya - Bağlama veya Coomassie brilliant blue) kullanıldı (Bradford, 1976). ELISA cihazı ile okuma yapılarak protein miktarı belirlendi. -20°C'de bekletilen hemolenf örnekleri bulunduğu ortamdan alınarak çözdürüldü ve deney için gerekli olan miktarlar alınıp ependorf tüpler içerisine aktarıldı ve önceden hazırlanılan homojenizasyon çözeltisinden 98 µl alınarak, kullanıma hazır PMSF'den 2 µl alınıp birbiri içerisinde çözdürüldü ve bu tampon her zaman deney öncesi taze hazırlandı. Tüpler içerisine alınan örnekler gerekli miktarda homojenizasyon tamponu ((w/v 1.15% KCl, 25 mM (potasyum dibazik) K₂HPO₄, 5 mM etilen-diaminetetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenil metil sülfonilflorid (PMSF)) konularak sulandırma yapıldı. Hazır hale gelen örnekler, 700-1000xg 10 dak. 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj edilmiş örneklerin süpernatantlarından deneylerde kullanılacak olan miktarları, tüplere alınarak +4°C'de bekletildi. Aynı zamanda protein miktarını belirlemek için, santrifüj sonrası deney için ayrılmış süpernatantlardan ayrı olarak, tüpler içerisindeki geriye kalan süpernatantların gerekli kadarı alınarak mikropilaya kuyucuklarına, 1 mcl eklendi ve sadece örnek kuyucuklar için, 4 µl homojenizasyon buffer ile tamamlandı. Körün (Blank) bulunduğu kuyucuğa ise sadece 5 µl homojenizasyon tamponundan eklendi. Daha sonra her bir kuyucuğa ayrı ayrı 200 µl çoklu pipet yardımıyla Bradford solüsyonu, kuyucuklara duvar kısımlarından aktarıldı ve kuyucukların içerisinde kabarcık kalmamasına dikkat edildi. ELISA cihazında 595 nm dalga boyunda bekletilmeden örneklerin absorbanları belirlendi. Belirlenen bu değerler ve sulandırma katsayıları $y = 0,202x + 0,011$ denklemine göre hesaplanarak, proteinlerin miktarları belirlendi. (x absorban değeri) Bu protein değerine bağlı kalınarak deneyler yapıldı.

Protein tayini yapılırken standart eğri hazırlamada bağlı kalınan ve buna göre standart eğri hazırlanan absorbans örneği; Şekil (2. 4.)



Şekil 2. 4. Sığır serum albümin (BSA)

2.4.3.2. Katalaz aktivitesi

G. mellonella'daki CAT aktivitesini ölçmek için, çalışma prensibi (Chance ve Maehly, 1955) tarafından belirlenen yöntem uygulandı. Katalaz aktivitesini ölçümü ELISA cihazında 240 nm dalga boyunca belirlendi. Deney öncesi ön hazırlık aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

- Fosfat çözelti (50 Mm KPO₄): KH₂PO₄ (Potasyum fosfat monobazik) + K₂HPO₄ (Potasyum fosfat dibazik). İlk olarak 0,680gr KH₂PO₄ tartıldı. Ve bir cam şişe içerisinde 100 ml distile su ile çözdürüldü. Aynı şekilde 0,871 gr K₂HPO₄ tartılarak, 100 ml distile su tamamlandı. Başka bir cam şişe içerisinde, hazırlanılan bu çözeltiler ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (RCT basic) üzerinde birleştirilip, ph metre ile okuma yapılarak yapılan fosfat tamponun sıcaklığı 25°C, pH:7,0 oluncaya kadar mono bazik ve dibazik solüsyonlar titre edilerek hazırlandı. Daha sonra fosfat tamponunu hazırlayacağımız cam şişe alüminyum folyo ile ışık almayacak bir şekilde +4°C'de saklandı.
- Hidrojen peroksit (H₂O₂): 30 mM H₂O₂ hazırlamak için, ilk olarak 6,8 µl hidrojen peroksit ve 1993,2 µl daha önce hazırlanan fosfat tamponundan alınıp, falkon bir tüp içerisine koyularak hazırlanır. Hazırladığımız solüsyon ışık almayacak bir şekilde alüminyum folyo ile kapatılan tüpte tutuldu.

- Deney yapılırken falkon tüp buz kaseti üzerinde tutuldu ve sadece 1 saat stabil olduğu için taze hazırlanarak kullanıldı.

Katalaz Deneyi aşağıda belirtildiği gibi yapıldı;

Başlangıçta Bradford yöntemi ile 700-1000xg 10 dak. 4°C'de deney örnekleri santrifüj yapılarak protein değerleri ölçüldü. Ve bu değerler deneyler için standart kabul edilip ona göre bu değerler ile deneye başlandı. Deney; (Chance ve Maehly, 1955) tarafından, katalazın hidrojen peroksiti, su ve moleküler oksijene yıkım hızının hesaplandığı yöntem uygulanarak yapıldı.

- Bradford yöntemi ile santrifüj yapılarak, supernatantları elde edilmiş olan larval hemolizatlar deney yapılana kadar +4°C'de saklandı. Bu deneyde kuvars küvet kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı.
- İçerisinde Kör (blank) ve örnek bulunan iki ayrı kuvars küvet kullanıldı. Kör küvet içerisine 1800 µl fosfat tamponu ve 100 µl hidrojen peroksit (30 mM), örnek yerine ise ne kadar örnek kullanırsak o kadar distile su koyuldu. Hazırlanan kör okutulup, ardından örneğimizin ((900 µl fosfat tamponu + 100 µl H₂O₂ (30 mM) + örnek hacmi (larval homizatlar)) hazırlandığı küvet okutuldu. Her okumada kör yeniden hazırlandı.
- Okuma zamanı 3 dakika olarak tanımlandı. UV absorbans Spektrofotometre de, 240 nm dalga boyunda kinetik okutma yapıldı. Okuma sonrasında 240 nm'de azalan substrat (H₂O₂) parçalanmasını gösteren absorbans ölçüldü Denklem (2.1). Katalaz Aktivitesi ve Spesifik Aktivite;

$$\text{Aktivite} = \frac{\Delta 0\Delta 240}{0,00394} \times DF1 \times DF2 \text{ (toplam hacim)}$$

(2.1)

Spesifik Aktivite: aktivite

1 ml/ dk protein miktarı

2.4.3.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi

G. mellonella'daki Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesini ölçmek için, çalışma prensibi (McCord ve Fridovic, 1969) tarafından belirlenen yöntemle göre belirlenmiş olan ve projenin ayırmış olduğu bütçe ile tedarik edilen Cayman Chemical, (SOD,706002) kit aracılığıyla ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Kit içeriğinde de bahsedilen deney öncesi ön hazırlık aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

- Deney tamponu: Deney kiti içerisinde hazır bulunan deney tamponundan, 3ml çözelti ile 27 ml HPLC suyu ile seyreltildi. Seyreltilmiş deney tamponu radikal belirleyiciyi hazırlamak için tekrar kullanıldı. Deney çözeltisinin seyreltik hali +4°C'de tutulmak koşulu ile en çok 2 ay stabildir. Hazır haldeki çözelti kullanılmadığı sürede -20°C'ye kaldırıldı.
- Örnek tamponu: Hazır halde bulunan örnek tamponunu 2 ml'si ile 18 ml HPLC suyu, 96 örnek kuyucuğu belirlemek için seyreltilerek hazırlandı. Seyreltilmiş olan örnek tamponu +4°C'de en çok 6 ay stabildir. Hazır haldeki çözelti kullanılmadığı sürede -20°C'ye kaldırıldı.
- Radikal belirleyici: 250 µl tetrazolium tuz içeren solusyon kullanılmadan önce 50 µl için 19,95 ml ile daha önce seyreltilmiş olan deney tamponu ile tekrardan seyreltilerek hazırlandı. Seyreltik bu radikal belirleyici sadece 2 saat boyunca stabildir ve ışık almayacak şekilde alüminyum ile folyo sarılarak -20°C'de tutuldu. Her deneyde taze olarak hazırlandı.
- SOD Standart: 100 µl bovin eritrosit SOD (CU/ Zn) içeren enzim sadece her deney öncesi standart eğri hazırlamada kullanıldı. Bu enzimde -20°C'de tutuldu. Deney sırasında enzim mutlaka buz kasedi üzerinde tutuldu. Bu enzim çözüldükten sonra en çok iki kez dondurulabilir.
- Ksantil oksidaz (XOD): Kit içerisinde hazır olarak 150 µl ksantil oksidaz bulunmaktadır. Ksantil oksidazın 50 µl si ile 1,95 ml daha önce seyreltilmiş olarak hazırlanan örnek tamponu ile çözdürülür. Çözdürülen ksantil oksidaz, 1 saat boyunca dayanıklı haldedir.
- Sod standartlarının hazırlanması: 20 µl SOD standartı 1,98 ml örnek tamponu ile saflaştırılarak SOD stok çözeltisi hazırlandı. Steril olmuş test tüpleri alınarak, A'dan G'ye kadar tüplerin üzerine harflendirme yapıldı. Kullanılan miktarlar Tablo 2. 2'de belirtilmiştir.
- SOD standart kuyucuklar: Dilüe olmuş 200 µl radikal dedektör ve 10 µl standart A-G tüplere konuldu.

Tablo 2. 2. SOD standartları

Tüp	SOD STOK µl	ÖRNEK TAMPONU µl	SON SOD AKTİVİTESİ
A	0	1.000	0
B	20	980	0,005
C	40	960	0,010
D	80	920	0,020
E	120	880	0,030
F	160	840	0,040
G	200	800	0,050

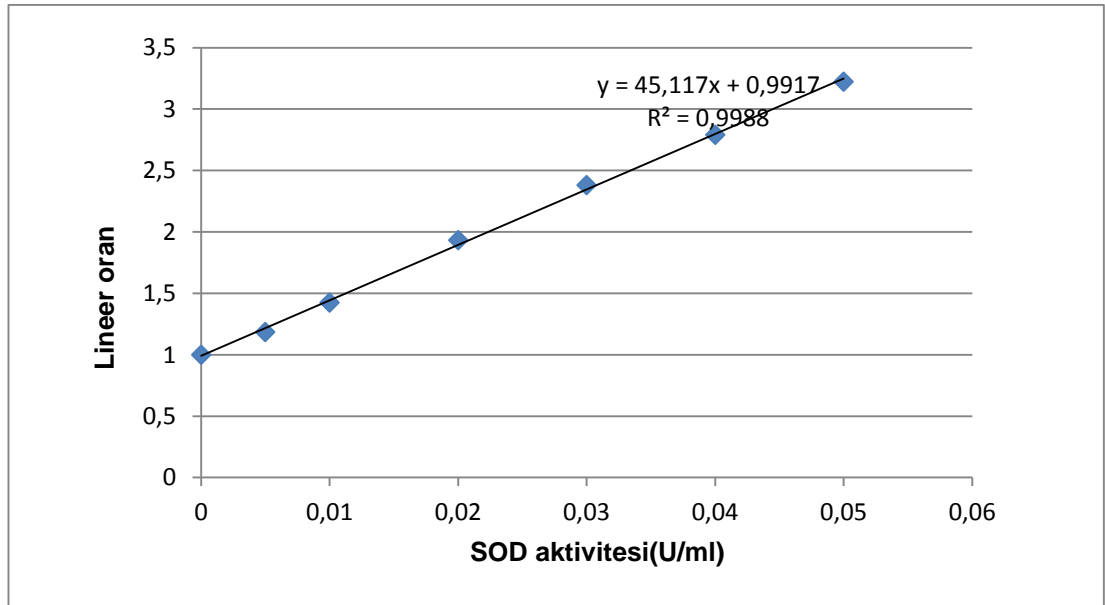
Standart eğri grafiğini oluşturmak için Tablo 2. 2.'deki şekilde stok ve standart SOD çözeltilerindeki miktarlar kullanıldı.

SOD Deneyi aşağıda belirtildiği gibi yapıldı;

Başlangıçta bradford yöntemi ile 700-1000xg 10 dak. 4°C'de deney örnekleri santrifüj yapılarak protein değerleri ölçüldü. Ve bu değerler deneyler için standart kabul edilip ona göre bu değerler ile deneye başlandı. Deneyde analizlerin belirleneceği, ELISA cihazına yerleştirilcek olan mikropılaka kuyucukların içerisine hazırlanmış olan 200 µl seyreltik radikal belirleyici ve örneğimizden 0,5 µg koyuldu. Örneklerimiz, örnek tamponu ile seyreltildi.

- Deney için oluşturulan bu kuyucukların her birine 20 µl ksantil oksidaz koyuldu. Bu işlem hızlı bir şekilde, karanlık ortamda yapıldı.
- Örneklerimizin bulunduğu mikropılaka, kapağı kapatılarak alüminyum folyo ile ışık geçirmeyecek bir şekilde kapatıldı.
- Mikropılaka 30 dakika süresince shaker da, 25°C'de çalkalandı. Daha sonra 440-460 nm dalga boyunda, ELISA cihazında okuma yapılarak absorbans belirlendi.

Hesaplama yapılırken; Kontrol ve deney gruplarının SOD Aktivitelerinin hesaplaması $y=45,117x+0,9917$ $R^2 = 0,9988$ formülü ile belirlendi Şekil (2. 5.).



Şekil 2. 5. SOD standart eğrisi

Denklem (2.2) kurularak örneklere ait enzim aktivite analizleri yapıldı.

(2. 2)

$$\text{SOD(U/ml)} = \left[\frac{\text{örnek LR-y-kesişim noktası}}{\text{eğim}} \times \frac{0,23}{0,01} \right] \times \text{örnek dilüsyonu}$$

2.4.3.4. Glutasyon S-Tranferaz aktivitesi

G. mellonella'daki GST aktivitesini ölçmek için, çalışma prensibi (Habig ve ark, 1974) tarafından belirlenen yöntemle göre belirlenmiş olan ve projenin ayırmış olduğu bütçe ile tedarik edilen Cayman Chemical, (GST,703302) kit aracılığıyla ELISA cihazında 340 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Kit içeriğinde de bahsedilen deney öncesi ön hazırlık aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

- GST deney tamponu: Deney kiti içerisinde hazır bulunan deney tamponundan, 10ml çözelti ile 27 ml HPLC suyu, örnek kuyucuğu belirlemek için seyreltilerek hazırlandı. Deney tamponunun seyreltik hali en çok 2 ay stabildir. Bu yüzden +4°C'de tutulmak koşuluyla kaldırıldı. Hazır haldeki çözelti kullanılmadığı sürede -20°C'ye kaldırıldı.
- GST örnek tamponu: Örnek tamponundan 5 ml si ile 5 ml HPLC suyu, örnek kuyucuğu belirlemek için seyreltilerek hazırlandı. Seyreltilmiş olan örnek tamponu +4°C'de en çok 1 ay stabildir. Hazır haldeki çözelti kullanılmadığı sürede -20°C'ye kaldırıldı.
- GST kontrol enzimi: Solusyon kullanılmadan önce 10 µl için 190 ml ile daha önce seyreltilmiş olan deney tamponu ile tekrardan seyreltilerek hazırlandı. Seyreltik bu enzim sadece 4 saat boyunca stabildir ve -20°C'de tutuldu.
- GST glutasyon: Direk kullanılmaya hazır halde olduğu için deney için gerekli kadarı alındı ve tüp içerisine koyuldu, kalan kısmı -20°C'de saklandı.
- GST CDNB: Direk kullanılmaya hazır halde olduğu için deney için gerekli kadarı alındı ve tüp içerisine koyuldu, kalan kısmı -20°C'de saklandı.

GST Deneyi aşağıda belirtildiği gibi yapıldı;

- Başlangıçta bradford yöntemi ile 700-1000xg 10 dak. 4°C'de deney örnekleri santrifüj yapılarak protein değerleri ölçüldü. Ve bu değerler deneyler için standart kabul edilip ona göre bu değerler ile deneye başlandı.
- Deneyde analizlerin belirleneceği, ELISA cihazına yerleştirilcek olan mikropilaka kuyucukları iki tane negatif kontrol, iki tane pozitif kontrol ve iki tane örnek kuyucukları olarak belirlendi.

- Belirlenmiş olan örnek ve pozitif kuyucuklara ilk olarak 150 µl seyreltik deney çözeltisinden, negatif kuyucuklara ise 170 µl eklendi.
- Sonra her bir kuyucuğa 20 µl glutatyondan koyuldu.
- Sadece örnek kuyucuklarına 20 µl örnek (hemolenf) koyuldu.
- Sadece pozitif kuyucuklara ise 20 µl seyreltilmiş olan GST kontrol enziminde koyuldu.
- Son olarak her bir kuyucuğa çok hızlı bir şekilde 10 µl CDNB eklendi.
- Hazırladığımız örneğimiz 340 nm dalga boyunda 5 dakika süresince ELISA cihazında mikroparka okuması yapılarak, artan absorbansın izlenmesiyle deney tamamlandı.

Analiz Hesaplama ve GST Aktivitesi;

- Reaksiyondaki oran doğrusal olarak $\Delta 340/min$ de tespit edildi.
- Bu doğrusal oran hesapladı ve eğri olarak grafiği oluşturuldu, eğri üzerinde iki nokta belirlendi.
- Aşağıdaki denklem kullanılarak iki nokta arasındaki zamana bağlı absorbans değişimi belirlendi Denklem (2. 3).

$$\frac{\Delta A_{340}}{dak.} = \frac{A_{340}(Zaman 2) - A_{340}(Zaman 1)}{Zaman2(dak.) - Zaman1(dak.)} \quad (2. 3)$$

- Her bir örnek için $\Delta 340/min$ 'den, kör reaksiyonu $\Delta 340/min$ çıkarıldı.
- CDNB'nin molar yok etme kat sayısı = $0.00503 \mu M^{-1}$ olarak hesaplandı Denklem (2.4).

$$GST \text{ Aktivitesi} = \frac{\Delta A_{340} / dak.}{0,00503 \mu M^{-1}} \times \frac{0,2 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} \times \text{örnek dilüsyonu} = \text{nmol/dak/ ml} \quad (2.4)$$

2.4.3.5. Malondialdehit Miktarı Tayini

G. mellonella'daki, lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak meydana gelen Malondialdehit (MDA) miktarını ölçmek için, çalışma prensibi (Yagi, 1988) tarafından belirlenen yöntemle göre belirlenmiş olan ve projenin ayırmış olduğu bütçe ile tedarik edilen Cayman Chemical, (MDA, 700870) kit aracılığıyla ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Kit içeriğinde de bahsedilen deney öncesi ön hazırlık aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

- Tiyobarbitürik Asit Deney Tamponu: 1 gr renk çözeltisi hazırlamada kullanıldı.

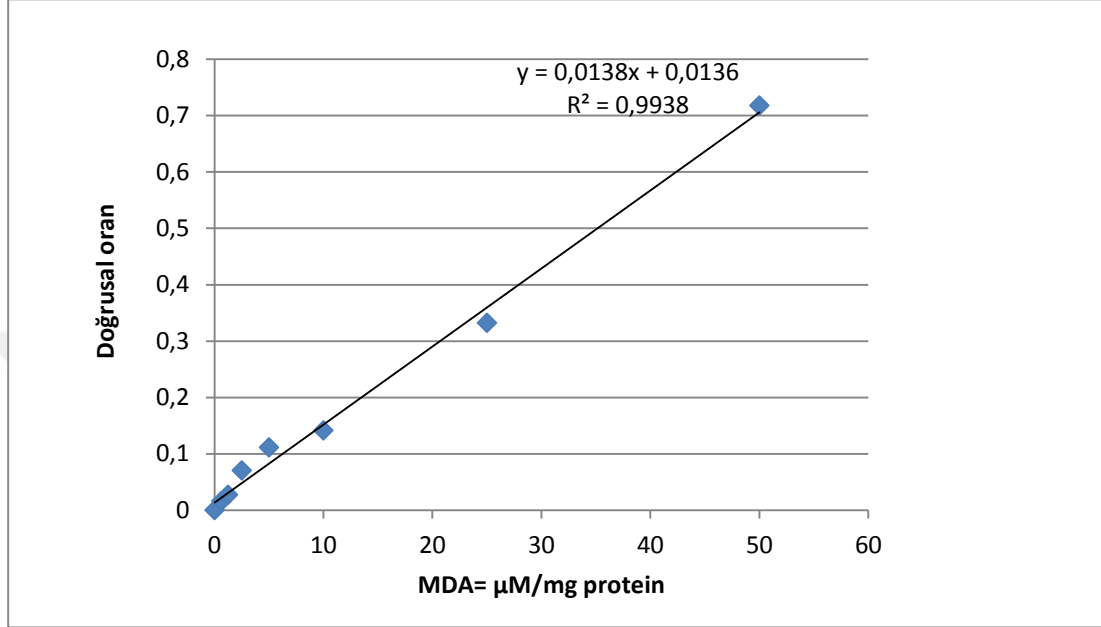
- TBA Asetik Asit: 10 ml TBA Asetik Asit solüsyonu, 40 ml HPLC suyu örnek miktarına göre seyreltilerek renk çözeltisi hazırlamada kullanıldı. Seyreltilmiş hali oda sıcaklığında 3 ay boyunca stabildir.
- Sodyum Hidroksit (NaOH) Deney Tamponu: 10 ml NaOH, 40 ml HPLC suyu ile seyreltilerek renk çözeltisi hazırlamada kullanıldı. Seyreltilmiş hali oda sıcaklığında 3 ay boyunca stabildir. Ve seyreltilmiş hali plastik içerisinde saklandı.
- TBA Malondialdehit Standart: 500 µM (MDA) 1 ml kullanıma hazır. Standart eğri belirlemede kullanıldı.
- TCA Deney Çözeltisi (%10): 10 ml kullanıma hazır. Kullanılacak kadarı alındı.
- Renk Çözeltisi: 24 örnek için; 106 mg (0,106 g) TBA üzerine, 10 ml dilüe TBA asetik asit ve 10 ml dilüe NaOH eklenir ve iyi bir şekilde karıştırılarak çözdürülüp hazırlanır. Hazırlanan bu solüsyon sadece 24 saat için stabil olarak saklanır.

Standart eğri deklemini belirlemek için öncelikle MDA standarttan 250 µl alınarak 750 µl HPLC ile seyreltilmesi yapılacağından, gerekli kadarını kullanabilmek için bu miktar 50 µl te 150 µl HPLC suyu olacak şekilde hazırlandı. Böylece Tablo 2. 3.'deki gibi hazırlanan stok ve standart MDA Solüsyonları (0, 5, 10, 20, 40, 80, 200 ve 400 nmol/ml) kullanıldı.

Tablo 2.3. MDA kolorimetrik standartları

Tüp	MDA	SU (µl)	MDA konsantrasyonu (µM)
A	0	1,000	0
B	5	995	0,625
C	10	990	1,25
D	20	980	2,5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

Bu tablo bağılı kalınarak standart eğri belirlendi. MDA miktarını belirlemek için standart eğri denklemi belirlendi. Standarta ait absorbans değerleri ile $y = 0,0138x + 0,0136$ $R^2 = 0,9938$ formülü hesaplandı. Şekilde gösterilen standart eğriye göre örneklerdeki MDA miktarı belirlendi. Şekil (2. 6.)



Şekil 2. 6. MDA standart eğrisi

MDA Deneyi aşağıda belirtildiği gibi yapıldı;

- Başlangıçta bradford yöntemi ile 700-1000xg 10 dak. 4°C'de deney örnekleri santrifüj yapılarak protein değerleri ölçüldü. Ve bu değerler deneyler için standart kabul edilip ona göre bu değerler ile deneye başlandı.
- Tüm çözeltiler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Deney, oda sıcaklığında yapıldı ve hazırlanan tüm örnekler ve standartlar kullanılmadan önce + 4°C'de saklandı.
- Santrifüj sonrasında deney için 25 µl örnek kullanıldı. Örnekler 5 ml'lik cam viallere eşit miktarda alındı. Her bir vial kullanılan örnek miktarı kadar HPLC suyu eklendi.
- Sonrasında her bir vial 50 µl TCA deney çözeltisi eklenerek vortekslendi. Son olarak 400 µl renk çözeltisi her bir vial eklenerek vortekslendi. Hazırlanan cam vialler, alüminyum folyo ile çok iyi bir şekilde sarılarak, kaynama esnasında düşmeyecek, kapağı açılmayacak şekilde sığa duyarlı tüplük içersine yerleştirilerek 1 saat süre ile kaynatma işlemi yapıldı.
- Kaynatma işlemi bitmiş olan cam vialler içindeki örneklerimiz, buz ortamında 10 dakika inkübe edildi ve başlamış olan reaksiyonun durdurulması sağlandı. Buz

ortamından 2 µl lik tüplere koyulan örnekler 1600xg 10 dak. 4°C'de santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 200 µl gelicek şekilde örnek mikropılaka kuyucuklarına konuldu. ELISA cihazında 540 nm'de tek okuma yapıldı.

2.5. İstatistiksel Analiz

Yapılmış olan deneyler farklı zaman dilimlerinde üç kez tekrar edildi. Deneyler sonucunda zehir dozuna bağlı, etkilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS programı (SPSS, versiyon 18.0, SPSS Science, Chicago, IL) kullanıldı. Yapılan deneysel analizler sonucunda, ZEB uygulanan ve kontrol gruplarından elde edilen ortalamalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı. Bu ortalamalar arası farklar, varyanslar arasındaki homojenlik durumuna göre, Tukey gerçekten anlamlı farklılık (Tukey HSD) veya Tamhane T2 testleri kullanılarak belirlendi. Sonuçlardaki anlamlılık değeri olarak $P < 0,05$ kabul edildi.

3. BULGULAR

Bir DNA demetilasyon ajanı olan ZEB, *G. mellonella* larvalarına farklı doz seviyelerinde ((0,25), 1, 4, 8, 16, 32 mg/ml) uygulandı. ZEB'in MDA (malondialdehit) miktarı ile Katalaz aktivitesi (CAT), Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi ve Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi üzerine etkileri tablo (3. 1.)'de genel olarak gösterilmektedir.

Tablo 3. 1. Zebularinin CAT, SOD ve GST antioksidan enzimleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri

Zebularin Doz ppm	$\bar{x} \pm SH$			
	ZEB. CAT	ZEB. SOD	ZEB. GST	ZEB. MDA
Kontrol	0,032 ± 0,044a	7,635±1,794a	0,372± 0,014 ab	23,834±5,548a
0,25	0,031± 0,003a	4,370±1,071ab	0,266 ±0,052 ab	75,653±7,748a
1,00	0,018 ±0,003a	3,157±0,903b	0,361± 0,016 ab	36,352±1,511a
4,00	0,028 ±0,006a	2,588±0,570b	0,156± 0,032 a	68,253±9,265a
8,00	0,050 ±0,016a	1,161±0,253b	0,391± 0,081b	143,014±19,794a
16,00	0,046 ±0,017a	1,031±0,198b	0,302± 0,036ab	279,124±59,691b
32,00	0,019± 0,006a	0,129± 0,039b	0,313± 0,060ab	452,099±18,170c
Sigma	0,21	0,001	0,048	0,00
F	1,636	8,098	2,876	38,92
df1, df2	6, 14	6, 14	6, 14	6, 14
SPSS	ANOVA-Tukey HSD	ANOVA-Tamhane	ANOVA-Tamhane	ANOVA-Tukey HSD

SH: Standart hata, \bar{x} ifadesi doz uygulaması yapılan *G. mellonella* larvalarındaki 3 tekrarın ortalamasıdır. Dozlar arası farklar a,b,c harfleri ile belirtildi. Aynı sütun ve aynı satırdaki harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemsizdir.

3.1. Katalaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

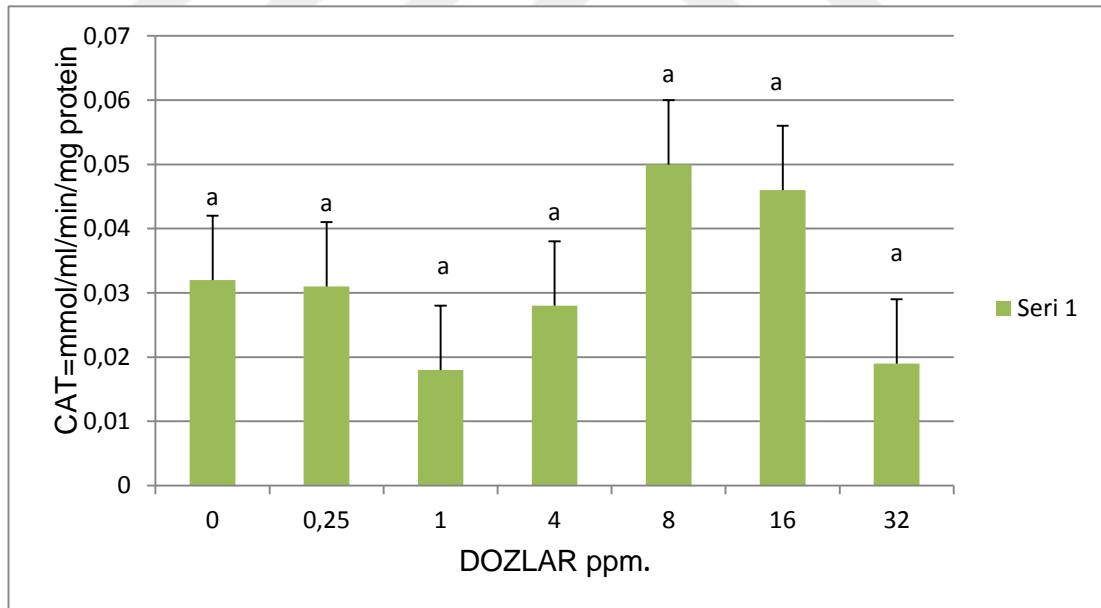
ZEB'in farklı doz 0,25-32,00 ppm konsantrasyonlarındaki uygulama işleminden sonra sonuçlara bakıldığında, kontrol grubu ve en düşük doz 0,25 ppm ZEB'e maruz kalan deney grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 3. 2.).

Tablo 3. 2. Farklı dozlardaki ZEB'in *G. mellonella* larva formları üzerindeki Katalaz aktivitesine etkisi

ZEB Doz ppm	CAT= mmol/ml/min/mg protein ORT±SH
Kontrol	0,032 ± 0,044a
0,25	0,031± 0,003a
1,00	0,018 ±0,003a
4,00	0,028 ±0,006a
8,00	0,050 ±0,016a
16,00	0,046 ±0,017a
32,00	0,019± 0,006a

Deney sonucu, her tekrarda 10 birey kullanılan larva örneklerini ve 3 tekrarın ortalamasını belirtir. Aralarındaki farklar harfler ile belirtilmiştir. Aynı sütun için aynı harfi bulunduran değerler için fark istatistiksel olarak önemsizdir. (p>0,05), SH= Standart Hata

İstatistiksel analiz sonucundaki farklı doz seviyelerine bakıldığında 0,25 ppm'lik dozda belirli bir fark görülmezken, 32,00 ppm'lik en yüksek doz seviyesinde fark edilir bir azalma belirlendi. ZEB'in uygulandığı *G. mellonella* larvalarında giderek artan doz miktarlarına karşı ve doza bağlı olarak katalaz aktivitesini etkilediği belirlendi (Şekil 3. 1.).



Şekil 3. 1. Farklı dozlardaki ZEB'in *G. mellonella* larva formları üzerindeki Katalaz aktivitesine etkilerini göstermektedir.

3.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

ZEB'in farklı doz 0,25-32,00 ppm konsantrasyonlarındaki uygulama işleminden sonra sonuçlara bakıldığında giderek yükselen konsantrasyondaki dozlar SOD aktivitesi için kontrol gruplarına göre doğrusal seviyede azalma göstermiştir (Tablo 3. 3.).

Tablo 3.3. Farklı dozlardaki ZEB'in *G. mellonella* larva formları üzerindeki Süperoksit Dismutaz aktivitesine etkisi

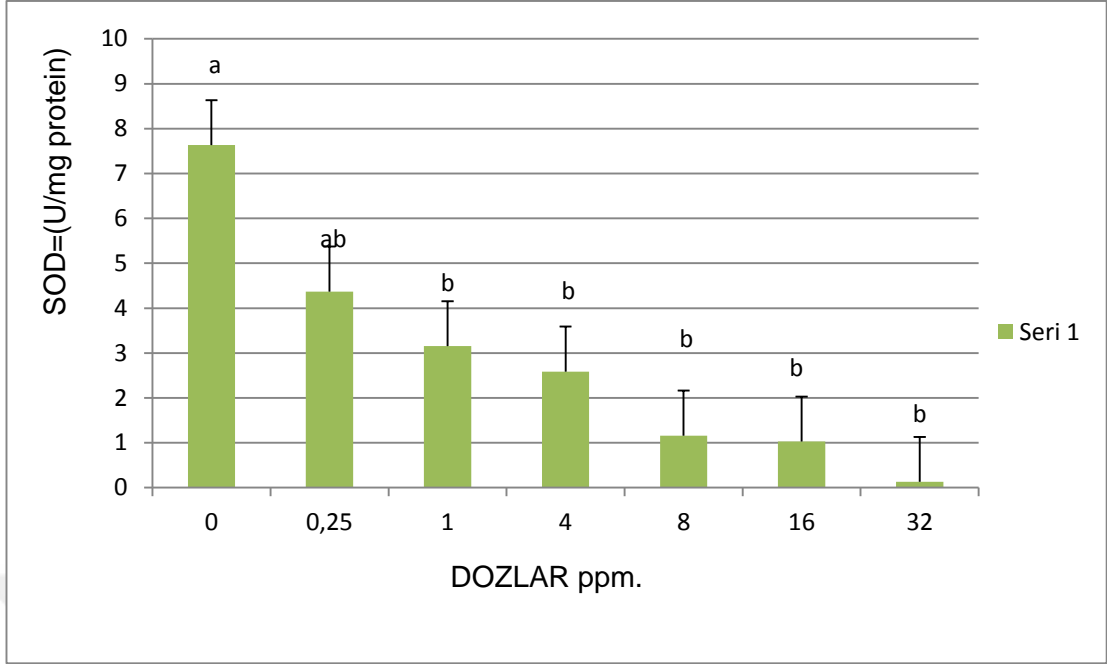
ZEB Doz ppm	SOD= (U/mg protein ORT±SH) *
Kontrol	7,635±1,794a
0,25	4,370±1,071ab
1,00	3,157±0,903b
4,00	2,588±0,570b
8,00	1,161±0,253b
16,00	1,031±0,198b
32,00	0,129± 0,039b

*Deney sonucu, her tekrarda 10 birey kullanılan larva örneklerini ve 3 tekrarın ortalamasını belirtir. *Aralarındaki farklar harfler ile belirtilmiştir. Aynı sütun için aynı harfi bulunduran değerler için fark istatistiksel olarak önemsizdir. (P>0,05), SH: Standart Hata

İstatistiksel analiz sonucundaki farklı doz seviyelerine bakıldığında en yüksek doz miktarında (32,00 ppm), kontrol grubuna göre çok yüksek (yaklaşık 7 kat) miktarda azalan SOD aktivitesi görüldü.

Bu 32,00 ppm'lik doz için azalma diğer doz grupları arasında da en düşük seviyede görüldü. Doz grupları arasından; 8,00 ve 16,00 ppm'lik dozlarda kontrol grubu sonucuna göre yaklaşık 6 kat bir azalma görüldü ama kendi aralarında istatistiksel olarak fazla bir fark görülmedi.

ZEB'in uygulandığı *G. mellonella* larvalarında giderek artan doz miktarlarına karşı doğrusal bir azalma görüldü ve doza bağlı olarak sod aktivitesini önemli bir düzeyde etkilediği belirlendi (Şekil 3. 2).



Şekil 3. 2. Farklı dozlardaki ZEB'in *G. mellonella* larva formları üzerindeki Süperoksit Dismutaz aktivitesine etkilerini göstermektedir.

3.3. Glutasyon S-Tranferaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

ZEB'in farklı doz 0,25-32,00 ppm konsantrasyonlarındaki uygulama işleminden sonra sonuçlarına bakıldığında, dozlarda artma ve azalma belirlendi (Tablo 3. 4.).

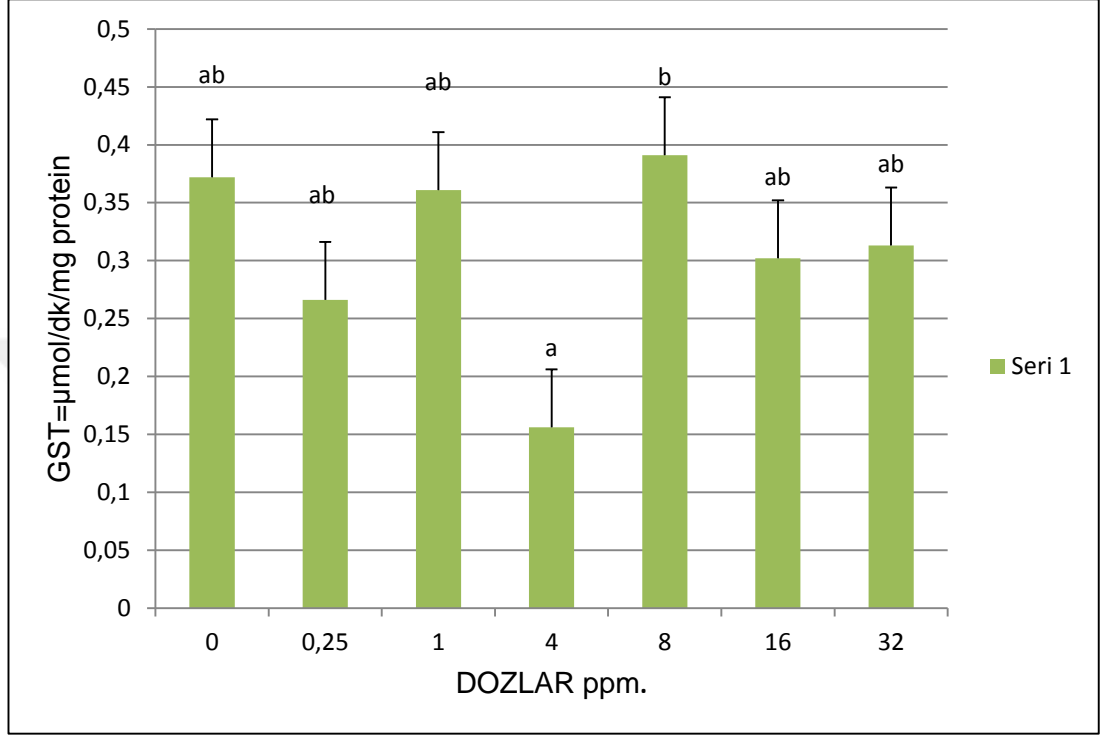
Tablo 3. 4. Farklı dozlardaki ZEB'in *G. mellonella* larva formları üzerindeki Glutasyon S-Tranferaz aktivitesine etkisi.

ZEB Doz ppm	GST= $\mu\text{mol/dk/mg protein ORT} \pm \text{SH}^*$
Kontrol	0,372 \pm 0,014 ab
0,25	0,266 \pm 0,052 ab
1,00	0,361 \pm 0,016 ab
4,00	0,156 \pm 0,032 a
8,00	0,391 \pm 0,081b
16,00	0,302 \pm 0,036ab
32,00	0,313 \pm 0,060ab

*Deney sonucu, her tekrarda 10 birey kullanılan larva örneklerini ve 3 tekrarin ortalamasını belirtir. *Aralarındaki farklar harfler ile belirtilmiştir. Aynı sütun için aynı harfi bulunduran değerler için fark istatistiksel olarak önemsizdir. (p>0,05), SH: Standart Hata

İstatistiksel analiz sonucundaki farklı doz seviyelerine bakıldığında giderek artan dozlarda kontrol grubuna belirli farklılık gözlemlendi. Sonuçlara bakıldığında 0,25 ve 4,00 ppm'lik doz seviyesinde kontrol grubu seviyesine göre yarı seviyede bir azalma

söz konusudur. Dalgalanmalar görülmüş olsa da düşük ve yüksek dozlarda kontrol grubuna yakın ve üstü artış belirlendi. ZEB'in uygulandığı *G. mellonella* larvalarında giderek artan doz miktarlarına karşı ve doza bağlı olarak GST aktivitesini etkilediği fakat istatistiksel anlamda fark belirlenemedi (Şekil 3. 3).



Şekil 3. 3. Farklı dozlardaki ZEB'in *G. mellonella* larva formları üzerindeki Glutasyon S-Tranferaz aktivitesine etkilerini göstermektedir.

3.4. Malondialdehit Miktarı Üzerindeki Etkisi

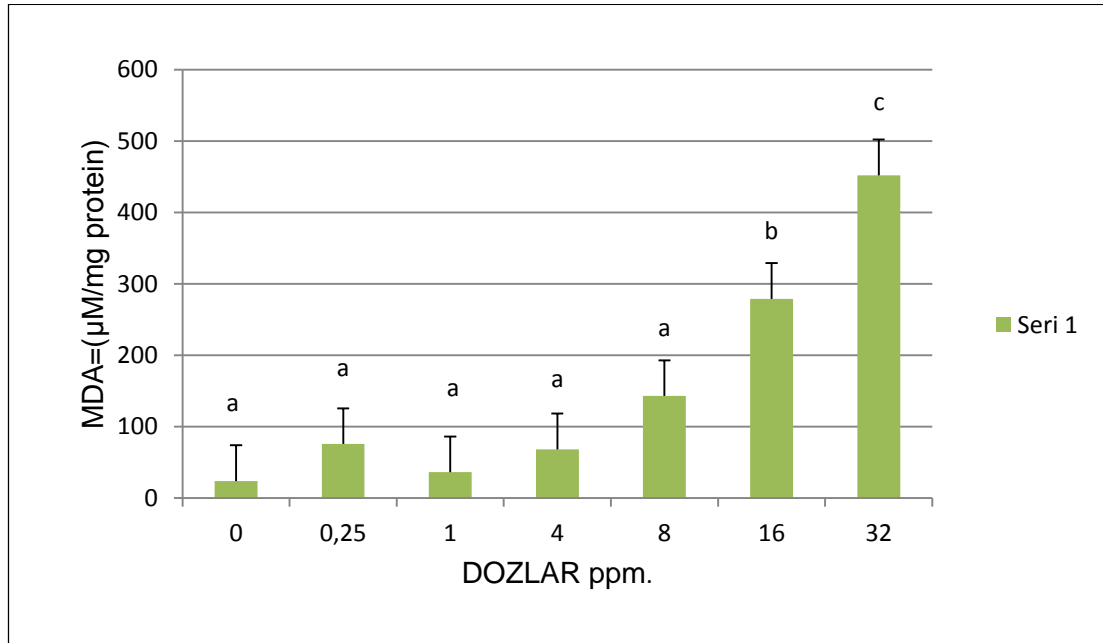
ZEB'in farklı doz konsantrasyonlarındaki uygulama işleminden sonra larval hemolenfteki MDA miktarının, doza bağlı belirgin bir artış gösterdiği belirlendi (Tablo 3. 5.).

Tablo 3.5. Farklı dozlardaki ZEB'in *G. mellonella* larva formları üzerindeki Malondialdehit miktarındaki etkisi

ZEB Doz ppm	MDA=(μ M/mg protein ORT \pm SH)*
Kontrol	23,834 \pm 5,548a
0,25	75,653 \pm 7,748a
1,00	36,352 \pm 1,511a
4,00	68,253 \pm 9,265a
8,00	143,014 \pm 19,794a
16,00	279,124 \pm 59,691b
32,00	452,099 \pm 18,170c

*Deney sonucu, her tekrarda 10 birey kullanılan larva örneklerini ve 3 tekrarin ortalamasını belirtir. *Aralarındaki farklar harfler ile belirtilmiştir. Aynı sütun için aynı harfi bulunduran değerler için fark istatistiksel olarak önemsizdir. ($p>0,05$), SH: Standart Hata

İstatistiksel analize göre en yüksek seviyede olan 32,00 ppm'lik ZEB dozunun, kontrol grubuna göre oldukça fazla seviyede (yaklaşık 18 kat) MDA birikiminin olduğu belirlendi. Diğer doz gruplarında da kontrol grubuna göre 16 ppm'lik doz için (yaklaşık 11 kat), 8 ppm'lik doz için (yaklaşık 6 kat) belirli seviyede artış belirlendi, istatistiksel olarak 0, 25, 1, 4 ppm'lik dozlar kendi aralarında farklı olmasa da kontrol grubuna göre MDA miktarında artma belirlendi. ZEB'in uygulandığı *G. mellonella* larvalarında doza bağlı olarak MDA miktarını önemli bir düzeyde etkilediği belirlendi (Şekil 3. 4.).



Şekil 3. 4. Farklı dozlardaki ZEB'in *G. Mellonella* larva formları üzerindeki Malondialdehit miktarına etkilerini göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Serbest radikaller, metabolik vücut işlevlerinin (solunum, sindirim gibi) sonucunda ortaya çıkan zehirli artık oluşumlardır. İnsan vücudunun her hücresinin yaklaşık olarak günde 10,000 serbest radikal tarafından hücumu uğradığı belirtilmektedir. Söz konusu bu serbest radikaller nötr duruma getirilmez ise; hücre zarındaki proteinleri parçalayarak hücreleri öldürür, hücre zarının lipid ve proteinlerini ortadan kaldırarak hücre zarının işlevini engeller, genetik bilgiyi taşıyan DNA'ya etki ederek DNA hasarı ve mutasyonlara sebep olur. Ayrıca bağışıklık mekanizmalarını bozup, kanser ve yaşlanmaya sebep olabilir (Akkuş, 1995; Dündar ve ark, 2000).

Vücutta daimi bir şekilde oluşturulan bu serbest oksijen radikallerine karşı olarak antioksidan savunma mekanizmaları görev alır. Bu düzenli işlev sisteminin bozulması sonucunda, serbest oksijen radikallerinde artış ve hücre hasarı meydana gelir; bu oluşuma "oksidatif stres" denir. Günümüzde birçok farklı hastalığa, zihnin ve vücudun yaşlanmasına, oksidatif stresin sebep olduğu ifade edilmiştir (Halliwell B, 1991).

Prostat kanseriyle ilişkili oksidatif stres ve DNA metilasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada ortaya çıkan çevresel faktörler, metabolik faaliyet, diyet veya diğer yollarla oksidatif stres, ROS (reaktif oksijen ürünleri) üretiminin artmasına yol açar (Krishna Vanaja Donkena ve ark, 2010).

Serbest radikallerin, canlı vücudunda sürekli olarak oluşmasını sağlayan durumlar arasında UV radyasyon ışınları, ilaçlar, kimyasal ve toksik maddeler, sigara, kanserojen maddeler yer almaktadır (Davies ve Dean, 1997).

Bu çalışmada ise hipometilasyon ajanı olan ZEB maddesinin oksidatif stresi oluşturup bunun antioksidan enzimlerle olan etkileri gözlemlendi.

Oksidatif stres ve kanser ilişkisi ile ilgili bir çalışmada; ROS üretimini arttıracak birçok etken, enzimlerin artan ve azalan işlevleri, kanserli hücrede onkogen işlev, reseptör sinyallerdeki artış olarak ifade edilmiştir. Kanser hücrelerindeki hidrojen peroksit ve nitrik oksit artışına, büyüme hormonlarının ve sitokinlerin sebep olması,

iltihaplanma ve enfeksiyon ile pek çok kanserin meydana geldiği ve gittikçe arttığı ifade edilmiştir (Liou GY, 2010 ve Valko M, 2004).

Bir diğer çalışmada ise; prooksidanların ve reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif strese olan böceklerin yaşamsal faaliyetlerine (üreme, gelişme, büyüme vb.) bakıldığında ve omurgalılarla kıyaslandığında, bu süreçten olumsuz etkilendikleri belirtilmiştir (Ahmad,1992).

Yaşlanma ile ilgili yapılan bir çalışmada ise *Drosophila melanogaster*'in üzerinde çalışılmış ve oksidatif stresin böceklerde yaşlanma ve yaşam döngüleri üzerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Orr ve Sohal, 1994).

Böcekler üzerindeki bu çalışmalardan yola çıkılarak çalışmamız *G. mellonella* larvalarına ZEB uygulaması yapılarak, DNA metilasyon hasarı, ilaçlar, immünojik reaksiyonlar gibi nedenlerle açığa çıkan serbest radikallerin yok edilmesini sağlayan antioksidan enzimlerin (SOD, KATALAZ, GST) aktiviteleri ve oksidatif stres oluşumu ile meydana gelen MDA miktarının belirlenmesi üzerine odaklandı.

Genel olarak *G. mellonella* üzerinde uygulaması yapılan çeşitli maddelerin neden olduğu oksidatif strese karşı SOD aktivitesinin hücrelerin ve dokuların korunmasında kilit rol oynadığı bilinmektedir (Fridovich ve Freeman, 1986; Tsan, 1997).

Daha önce yapılan bir çalışmada bir böcek ilacı olan ve genellikle tarım zararlıları için kullanılan fenthion kimyasalının *G. mellonella* larvalarındaki SOD aktivitesine etki ettiği, düşük doz seviyelerinde SOD'un arttığı, fakat yüksek doz seviyelerinde azaldığı gözlemlenmiştir (Yalçinkaya, 2013). *G. mellonella* larvalarındaki antioksidan enzimler üzerine *Bacillus thuringiensis* uygulanarak yapılmış olan bir çalışmada ise SOD aktivitesinin artmış olduğu ifade edilmiştir (Dubovskiy ve ark, 2008). *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulanan Azadiraktin'in farklı doz seviyelerinde, yirmidört ve yetmişiki saatlik zaman dilimindeki antioksidan enzimleri üzerine yapılan çalışmada ise SOD aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (Dere, 2015). Balmumu güvesi *G. mellonella* larvaları, farklı doz seviyelerinde borik asit ilavesi yapılmış olan bir besin içerisinde yetiştirilmiş ve SOD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Hyrsi ve ark, 2007). Bir giberellik asit (GA₃) çalışmasında ise yüksek dozlardaki uygulamaya maruz kalan larvaların SOD aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Altuntaş, 2015). *G. mellonella* üzerine ZEB uygulaması ile yapılan çalışmamız sonuçlarına göre; AZA, GA₃ ve fenthionun etkisine benzer olarak SOD aktivitesinin artan doza göre belirgin

bir şekilde azaldığı görüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda SOD aktivitesinin azalmasına sebebiyet veren serbest radikal artışına bağlı olarak lipid peroksidasyonun uzun süreliliği sonucunda hücrel antioksidan savunma sisteminin aşılmasıyla antioksidan enzim aktivitelerinde azalma olabileceği bildirilmektedir (Meister ve Anderson, 1983; Akkuş,1995). Bu nedenle *G. mellonella* larvalarının hemolenflerine uygulanan ZEB uygulamasından sonra SOD aktivitesindeki bu azalmanın, larvaların fazla miktardaki MDA içeriği ile ilişkisi olabilir

Stres oluşumuna sebep olan etkenler süperoksit radikallerini oluşturduğunda SOD aktivitesi artmaktadır. Ancak SOD aktivitesi baskılanır ve düşerse oluşan radikaller engellenemez ve hücrelerdeki stres etkenleri altında lipid peroksidasyonu ile beraber MDA miktarı artmaktadır (Ahmad ve Pardini, 1990). Böylece bu sonuçlar bir defa daha, oksidatif stres koşullarında zararlı ajanlara karşı antioksidatif enzim aktivitelerinin artmasının bir kural olmayıp, aktivitenin oldukça azalabildiğini doğrulamıştır (Cheung ve ark, 2001). Analizlerimiz MDA seviyesi ile SOD enzimi arasında negatif bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmıştır. Benzer ilişki farklı toksik etkenlere ve ajanlara maruz kalan böceklerde de belirlenmiş olup, artan toksisiteye bağlı antioksidan enzim aktivitelerinde düşüş ve bu azalmaya sebep olarak ZEB'in, kontrol grubuna kıyasla yüksek dozlarda SOD enzim faaliyetine engel olduğu ya da tamamen yok ettiği sonucunu verir. Yapılan çalışmalar bize uygulanan maddeye göre SOD aktivitesinin artan veya azalan yönde etkilendiğini göstermektedir. CAT ve SOD'un membranın başlıca hidrofilik bölgelerinde etki gösterdiğini ve lipid peroksidasyona karşı birlikte oldukları koşullarda serbest radikal ataklarına karşı hücre bütünlüğünün korunmasında daha etkili olabildikleri belirtilmiştir (Michiels ve ark, 1994).

Katalaz enzimi, hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve moleküler oksijene indirgeyerek hücreleri oksidatif hasarlara karşı koruyan bir enzimdir (Aebi, 1984; Nordberg ve Arner, 2001). Hidrojen peroksit (H_2O_2), membran lipidlerinde lipid peroksidasyona, süperoksit dismutazın inaktivasyonuna, DNA hasarına sebebiyet vermektedir (Akkuş, 1995; Joence, 1989; Lunec, 1990). Savunma sistemleri, serbest radikal üretim hızı karşısında yetersiz kalınca serbest radikalın zararlı etkileri oluşur. SOD, CAT, serbest radikal birikimini engelleyen başlıca enzimlerdir. Bu nedenle SOD ve CAT enzimleri H_2O_2 'i metabolize ederler (Basaga,1987).

Bir çalışmada CAT seviyesindeki azalmanın, süperoksit radikallerin artışına bağlı olabileceği bildirilmiştir (Kono ve Fridovich, 1982). *G. mellonella* larvalarında uygulanan fenthionun maddesinin, CAT aktivitesinde ise tüm doz seviyelerinde artış

gösterdiği belirlenmiştir (Yalçinkaya, 2013). *G. mellonella*'da uygulanan *Bacillus thuringiensis* çalışmasında ise CAT aktivitesinde azalma belirlenmiştir (Dubovskiy ve ark, 2008). AZA uygulanan *G. mellonella* larvaları için CAT aktivitesinde yirmi dört ve yetmiş iki saatlik zaman diliminde ise farklı doz seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Dere, 2015). *G. mellonella* larvaları üzerinde borik asit uygulaması yapılan bir çalışmada CAT aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir (Hyrsi ve ark, 2007). Gibberellik asit ile yapılan çalışmada ise *G. mellonella* larvaların CAT aktivitesinde yüksek dozlarda düzenli artış belirlendi (Altuntaş, 2015). Yaptığımız çalışmada ZEB uygulanan *G. mellonella* larvalarında kontrol grubuna göre, CAT aktivitesinde de 8 ve 16 ppm'lik dozlarda artış olduğu belirlense de 32 ppm'lik en yüksek doz seviyesinde azalma belirlenmiştir. ZEB uygulanan çalışmamızın sonuçları ile borik asit, *Bacillus thuringiensis* gibi çalışmaların sonuçları benzerlik göstermiştir. Çalışmamızdaki bu azalmanın sebebi olarak H₂O₂ detoksifikasyonunun engellenememesi ve dolayısıyla oluşan serbest radikallerin enzim aktivitesine karşı savunma göstermiş olması ile açıklanabilir.

Dokuları oksidatif strese karşı korumada önemli olan GST, birçok ksenobiyotiğin detoksifiye edilmesinde rol oynayan kompleks enzim yapısındadır (Fournier ve ark, 1992; Wessey ve Boyer, 1984).

Toksik maddeye maruz kalmış olan böcekte GST aktivitesinin arttığı görülmüştür (Vontas ve ark, 2001). GA₃ ile yapılan bir çalışmada düşük konsantrasyondaki dozlarda dahi *G. mellonella* larvaların GST seviyelerinde artış belirlenmiştir (Altuntaş, 2015). *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulanan AZA çalışmasında GST aktivitesi için artış belirlenmiştir (Dere, 2015). *Bacillus thuringiensis* ile yapılan çalışmada *G. mellonella* larvaların GST aktivitesinde artış belirlenmiştir (Dubovskiy ve ark, 2008). *G. mellonella* larvalarında borik asit ve maltoz karışımının etkisine bakıldığında GST aktivitesinde artış belirlenmiştir (Arı, 2010). ZEB uygulanan çalışmamızda GST aktivitesinde artış olup, bu sonuç GST aktivitesinin, uyarılmış olan oksidatif stres ile bağlantılı olarak arttığını belirledi. *G. mellonella* üzerinde uygulanan ZEB'in etkisi yapılmış olan bu toksik madde çalışmaları ile GST aktivitesi için benzerlik göstermiştir. Sonuç olarak GST aktivitesinin, uyarılmış olan oksidatif stres ile bağlantılı olarak yüksek ve düşük değerleri belirlenmiştir. Bu durum, GST'nin bu stresör için direnç mekanizmasında bazı dozlarda etkin rol almadığını göstermektedir. Bu durumun nedeninin glutathionun yer değiştirmesiyle oluşan oksidatif stresten veya P-450 monooksijenaz, esteraz ve GST'nin birlikte oluşturduğu bir etkiden dolayı oluşabileceği belirtilmiştir (Lietti ve ark, 2005).

MDA miktarı ile orantılı olarak yükselen GST aktifliği, oluşmuş olan oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı bu enzimin koruyucu etki oluşturduğunu gösterir. Lipid peroksitlerin detoksifikasyonu, reaktif oksijen türlerinin ve oksidatif hasarın ortadan kaldırılmasında GST enzimi, substratı olan indirgenmiş glutatyon (GSH) aracılığı ile önemli bir işleve sahiptir (Singh ve ark, 2001).

Heteropter bir tür olan *O. fasciatus*'un da kadmiyum uygulanmış ve lipid peroksidasyonunun ürünü olan MDA seviyesi yükselmiş, bazı antioksidan enzimlerin ise aktiviteleri azalmıştır (Cervera ve ark, 2003). Önemli bir detoksifikasyon enzimi olan GST *N. lugens* türünde bazı insektisitlere karşı direnç oluşturmuştur (Vontas ve ark, 2001). Endosülfanın *H. armigera*'nın farklı evrelerindeki farklı dokularında GST aktivitesine bakılmış ve dokulara göre yüksek ve düşük sonuçları bulunmuştur (Rajurkar ve ark, 2003).

Yapılan bir çalışmada sodyum tetraboratın larvaların hemolenf ve yağ dokusunda, oksidatif hasara bağlı değişikliklerin antioksidan savunma sistemini bozması ile böceğin yaşama ve gelişimi üzerinde olumsuz etki gösterdiği bulunmuştur. Sodyum tetraboratın denenen en yüksek konsantrasyonlarında GST enziminin aktivitesindeki azalma ve MDA miktarındaki yükselme ile birlikte yaşama oranının düşmesi ve gelişim süresinin uzaması gibi sonuçlara varılmıştır (Durmuş, 2007). Alman hamam böceği *B. germanica*'nın ortabağırsağında yapılan çalışmada borik asit, GST enzim aktivitesini azaltmıştır (Habes ve ark, 2006). *M. domestica* L'da organofosforlu insektisitlere dirençli mutantların yüksek seviyede GST aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Çakır ve Yamanel 2005). Böceklerde toksik etkenlerin dirençliliğini sağlayan GST izoformları detoksifikasyon enzimlerin önemli bir grubudur (Yu ve ark, 2004). Şiddetli toksisiteye maruz kalan böceklerde GST aktivitesinin önemli düzeyde arttığı bulunmuştur (Punzo, 1993;Vontas ve ark, 2001).

Çalışmamız, düşük dozlarda veya yüksek dozlarda artan oksidatif hasara bağlı bahsedilen GST aktivitesinin, aynı ve farklı böcek türündeki çalışmalarını destekler niteliktedir.

ZEB'nin yüksek doz seviyeleri larval hemolenfteki lipid peroksidasyonunu önemli derecede arttırmıştır. Lipid peroksidasyon ürünü MDA ile beraber GST enziminin de aynı oranda arttığı görüldü. GST enziminin bazı dozlarda artış göstermesi larvaların ZEB'nin zararlı etkisine karşı direnç göstermesine ya da oluşan serbest radikalleri yok etmeye karşı savunma sistemlerinden dolayı olabilir. Bu şekilde bir savunma

sonucunda enzimler serbest radikallerin ve lipid hidroperoksitlerin toksik etkilerinden sakınmış olur. ZEB ajanı ve bunun oluşan ürünleri *G. mellonella* da lipid peroksidasyonunu oluşturacak seviyede yüksek olabilir ve bu sebeple ROT'ların ve hidroperoksitlerin toksik etkilerini ortadan kaldırmak için GST aktivitesinin işlevi artmış olabilir.

Genelde oksidatif etki sonucunda proteinlerin modifikasyonu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, lipid peroksidasyonunun ve DNA hasarının artması şeklinde incelenmiştir (Mercan, 2004).

Serbest radikallerin oluşturduğu hasara, doymamış yağ asitleri oldukça hassastır. Doymamış yağlar üzerinde oluşan bu hasara 'lipid peroksidasyonu' denilmektedir. Bu hasarın sonucunda hücre zarının akışkanlığı azalır ve geçirgenlik özelliğinde bozulmalara sebep olur (Kavas, 1989).

Serbest radikaller, hücre savunma mekanizmasının koruyuculuğunu aşacak şekilde çoğaldığında ise zararlı etkilerini en hassas bileşikler olan doymamış lipidler üzerinde gösterirler. Hücre membranının yapısında bulunan doymamış fosfolipidler ve kolesterol, serbest radikallerle hızlıca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu oluşturur (Porter, 1984; Niki, 1987; Moslen, 1994). MDA yağ asidi oksidasyonunun kantitatif bir indikatörüdür ve lipid peroksidasyonunun seviyesiyle iyi uyum gösterir. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olan bir aldehid olup oksidatif stresin seviyesi ile orantılı olarak miktarı artmaktadır (Suwalsky ve ark, 2001).

Yapılan bir çalışmada *Bacillus thuringiensis* için *G. mellonella*'daki etkilerine bakıldığında MDA miktarının arttığını belirtmiştir. Bu çalışma ile maddenin larvada oksidatif stresi arttırdığı ve oksidatif hasarın hücre ölümüne sebep olduğu belirtilmiştir (Dubovskiy ve ark, 2008). AZA'nın farklı doz seviyelerinde zamana göre etki gösterdiğini ve buna bağlı olarak MDA miktarında artış olduğu belirlenmiştir (Dere, 2015). Fenthionun maddesinin, MDA miktarının ise tüm doz seviyelerinde artış gösterdiği belirlenmiştir (Yalçınkaya, 2013). *G. mellonella*'daki borik asit ve maltoz karışımının etkisine bakıldığında MDA miktarında artış belirlenmiştir (Arı, 2010). *G. mellonella*'daki belirlenen bu çalışma ile çevreye ve tarıma zararlı olmayan canlıların daha az etkilenmesine daha az zararlı kimyasalların belirlenmesine olanak sağlanacağı belirtilmiştir (Yalçınkaya, 2013). Borik asit etkisine bakıldığında ise MDA miktarında artış belirlenmiştir (Hyrsl ve ark, 2007). Sodyum tetraboratın, *G. mellonella*'daki MDA miktarındaki artma ile birlikte gelişim süresinin uzaması ve

hayatta kalabilme oranının düştüğü gözlemlenmiştir. Bunun sebebi olarak da larvaların yağ dokularında oluşan oksidatif stres sonucuna bağlı antioksidan savunma mekanizmalarını bozduğu belirlenmiştir (Durmuş, 2007) . MDA miktarının ve SOD, GST ve CAT aktivitesinin belirlendiği çalışmada yüksek dozların larva ölüm oranlarını arttırdığı, düşük dozların ise ölüm oranları azalttığı belirlenmiştir. Lepidoptera familyasından *Spotoptera eridania'* nın dietsel diclonea maruz bırakıldığı çalışmada, düşük doz (%0,01), kontrol grubu ile karşılaş tırıldığında MDA miktarında anlamlı bir artış görülmemiş, fakat yüksek dozda (%0,25), kontrol grubuna göre MDA miktarında belirgin bir yükselme (%29,7) belirlenmiştir (Ahmad ve ark,1995). Çalışmamızın sonucunda MDA miktarında kontrol grubuna göre gittikçe artan dozla birlikte belirgin bir artış gözlemlendi. Ve AZA, Fenthion, Borik asit, Sodyum tetraboratın, *Bacillus thuringiensis'*in MDA miktarı üzerindeki etkilerine benzer sonuç elde edildi. Yapılan bu çalışmalara genel olarak bakıldığında, ZEB'in uygulaması yapılan *G. mellonella* larvaları üzerindeki, antioksidan enzim aktivitelerinin etkisi ve MDA miktarının belirlenmesi, yapılan çalışmaları destekler nitelik de olduğunu ortaya çıkardı. Antioksidan ezimler ve MDA miktarını belirlemedeki etkiler üzerine yapılmış olan çalışmalara bakıldığında ZEB gibi kematerapötik ajan olarak kullanılan prokainamid ratlar üzerindeki bir çalışmada, plazma ve karaciğer MDA miktarında %20 ila %30 oranında bir artış belirlenmiştir (Michal ve ark, 1993). Erkek wistar sıçanlarında sisplatin ile yapılmış olan çalışmada kontrol grubuna göre MDA miktarının %196 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir (Rybak ve ark, 1999). Kemoterapötik ilaç olarak kullanılan 5-Fluorourasil'in tavşanlar üzerindeki çalışmaya bakıldığında MDA seviyelerinde önemli artış belirlenmiştir (Akdoğan ve ark, 2000). Ratların beyinde, hücre hasarı ile ilgili bir çalışmada valproik asitin etkilerine bakılmış ve MDA miktarını arttırdığı belirlenmiştir (Suda ve ark, 2013). Sıçanlar üzerindeki Siklofosamid (CP) yapılan bir çalışmada oksidatif stres sonucu MDA miktarının arttığı belirlenmiştir (Çetik, 2014). Serbest oksijen radikalleri sonucunda oluşan peroksidasyon, sisplatine bağlı toksisitede sorumlu bir mekanizma olarak belirtilmiştir. Ortama salınan serbest oksijen radikaller lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı akışkanlığı ve geçirgenliğinde değişikliklere sebep olmaktadır (Schmidley, 1990). Bunun bir belirtisi olarak lipid peroksidasyon ürünleri artmaktadır. Bu nedenle deneylerde MDA seviyeleri sıklıkla kullanılmıştır. Sisplatin sonrası doku MDA düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalardaki sonuçlara göre; (Draper, 1990; Saad, 2007; Sayed-Ahmed, 2004). Çalışmamızın sonucunda lipid peroksidasyonu ile MDA miktarında doz artıkaça belirgin bir artış belirlendi. Bu artış oksidatif stresin meydana geldiğini ve incelenen

çalışmalar ile benzerlik olduğunu göstermektedir. Ratlar üzerindeki prokainamid etkisi ile yapılan bir çalışmada, SOD aktivitesinde azalma belirlenmiştir (Michal ve ark, 1993). Kemoterapötik ilaç olarak kullanılan 5-Fluorourasil'in tavşanlar üzerindeki çalışmaya bakıldığında SOD aktivitesinde önemli düşüş belirlenmiştir (Akdoğan ve ark, 2000). Erkek Wister sıçanlarında sisplatin ile yapılan bir çalışmada ise SOD aktivitesinde düşüş belirlenmiştir (Rybak ve ark, 1999). Bahsedilen bu çalışmalarda da olduğu gibi çalışmamızda, doz arttıkça doğrusal bir azalma belirlendi ve çalışmalarla benzer sonuçlar elde edildi. Ratlar üzerindeki prokainamid etkisi ile yapılan bir çalışmada, CAT aktivitesinde azalma belirlenmiştir (Michal ve ark, 1993). Erkek Wister sıçanlarında sisplatin ile yapılan bir çalışmada ise CAT aktivitesinde düşüş belirlenmiştir (Rybak ve ark, 1999). Bahsedilen bu çalışmalarda da olduğu gibi çalışmamızda kontrol grubuna göre azalma belirlenmiş olup, benzer sonuçlar bulundu. Kemoterapötik ilaç olarak kullanılan 5-Fluorourasil'in tavşanlar üzerindeki çalışmaya bakıldığında CAT ve GST aktivitesinde düşüş belirlenmiştir (Mehmet Akdoğan ve ark, 2000). Kemoterapötik ajan olarak kullanılan tamoksifenin, hastalardaki MDA düzeyini arttırdığı belirlenmiştir (Wakatsuki ve ark, 2002). Yapılan bu çalışmalara bakıldığında, ZEB'in uygulaması yapılan *G.mellonella* larvaları üzerindeki, antioksidan enzim aktivitelerinin etkisi ve MDA miktarının belirlenmesi, yapılan çalışmaları destekler nitelik de olduğunu ortaya çıkardı. *G.mellonella* larvaları, Bronksill tarafından oluşturulmuş olan besin içerisine fethion maddesi eklenerek toksik maddeye maruz bırakılmış. Bu şekilde beslenen larvalar ile deneyler yapılmıştır (Yalçınkaya, 2013). Aynı besin ortamına bu kez IAA₃ eklenerek larvalar maddeye maruz bırakılmış ve deneyler yapılmıştır (Haftacı, 2010). *G.mellonella* larvaları besin ortamına borik asit ve maltoz karışımı eklenerek yetiştirilmiştir (Dere, 2015). Bal mumu güvesi *G. mellonella* larvalarına farklı doz seviyelerinde borik asit ilavesi yapılmış olan besin içerisinde yetiştirilmiş (Büyükgüzel, 2010). Çalışmamızda *G. mellonella* larvalarını besin ortamında yetiştirmiş olup uyguladığımız ZEB'in maddesini literatür taraması yapılmış olan yöntemlerde olduğu gibi besin ortamına aktarmadan direk olarak larvalara enjeksiyon uygulaması yapıldı. Genel olarak literatür araştırmalarına bakıldığında çoğunlukla *G. mellonella*'nın besin ortamına toksik madde uygulaması yapılarak larvalar bu şekilde maddeye maruz bırakılarak deneyler yapılmıştır. Bu uygulama canlının doğal beslenmesiyle uyumludur. Ancak bizim çalışmamızda zaman kaybının ve maddenin direkt etkisinin belirlenebileceği uygulama tercih edilmiştir. Yapılacak çalışmalarda bu iki yöntem karşılaştırılarak amaca uygun olanın tercihen kullanılabileceği önerilmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzde en sık rastlanan ve çok çeşitli türlere sahip bir hastalık olan kanser, vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşmaktadır. Kanseri anlamak için normal hücrelerin nasıl kansere dönüştüğünü bilmek faydalı olacaktır. Kanser, hücre ve organizmanın genetik bilgisinin saklandığı DNA'nın hasar görmesiyle meydana gelmektedir. DNA, canlılar için zararlı etkisi olan birçok ksenobiyotiklerden dolayı hasar görebilir.

Çeşitli çevresel etkenlerle DNA üzerinde oluşan bu hasarlarla ilgili birçok araştırma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda genellikle *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır. Laboratuvar koşulları altında yetiştirilmesi olanaklı ve kültürü kolay oluşturulan bir tür olması sebebiyle, *G. mellonella* toksikoloji, fizyoloji gibi pek çok çalışma alanı için model organizma haline gelmektedir (Altınçiçek ve ark, 2007). Bu sebeplerle birlikte doğal bağışıklık sisteminin memeliler ile benzer olması sebebiyle çalışmamızda *G. mellonella* öncü bir model organizma olmuştur.

Çesitli amaçlarla kullanılan kimyasal maddelerin böcek üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi için farklı evrelerdeki toplam vücut bileşenlerinin biyokimyasal analizlerinin yapılması ve fizyolojik değişimlerin ortaya konulması önemli kriterlerdir (Ferkovich ve ark, 1999; Wang ve ark, 2002; Zapata ve ark,2005). Böceklerde birçok antioksidan enzim mekanizmaları tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, bakteri ile enfeksiyon oluşturulmuş olan *G. mellonella* üzerinde reaktif oksijen türlerinin ve antioksidan savunma sistemlerinin arttığı belirtilmiştir (Dubovskii ve ark, 2008). Böceklerin serbest radikallerden ve oksidatif stresten etkilendiği bilinmektedir (Timmermann ve ark, 1999).

Bu çalışmada kullanılan ZEB'in miktarları genel olarak larvaların DNA mekanizmasını, hemolenf ve yağ doku lipid peroksidasyonu düzeyi ve enzim aktivitelerini etkilemiştir. Larvaların hemolenf MDA miktarı ve GST, SOD, CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar antikanserojen maddenin canlı vücudunda yan etkilerinin anlaşılmasında önemli bilgiler vermiştir. Böylece, bu çalışma beraberinde bilim ve tıbbi alandaki çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Memelilerde DNA metilasyonu ve kanser arasındaki ilişkiyi, oksidatif stresi inceleyen çalışmalar yapılmıştır (Franco vd., 2008; Donkena vd., 2010).Yapılan çalışmalarda oksidatif DNA hasarı ile birlikte bazı yapıların oluştuğu ve bunların CpG dinükleotitlerinde metillenmeyi engellediği belirlenmiştir (Weitzman vd., 1994; Turk vd., 1995). Ve oksidatif stres, DNA'da hipometilasyona sebep olarak kanserleşmeye destek olmaktadır (Franco vd., 2008) .

Bu çalışmada, immün mekanizması omurgalılarla hücrel ve humoral yönden benzerlik gösteren *G. mellonella* larvalarına bir hipometilasyon ajanı olan ZEB uygulanarak DNA metilasyonunun antioksidan enzim sistemleri üzerindeki etkileri araştırıldı. *G. mellonella* larvalarında görülen yüksek hipometilasyon halinin humoral ve hücrel savunmayı zayıflattığı belirlendi.

Sonuç olarak, DNA metilasyonunun böceklerde gen sessizleşmesi yerine aktivasyonundan sorumlu olabileceği gösterildi. Bu çalışma, bu açıdan literatürde bir ilk olup, bundan sonraki epigenetik, kanser, immunoloji gibi birçok alandaki çalışmalara fayda sağlama olasılığı vardır. Aynı zamanda, antioksidan enzimler üzerinde nasıl bir etki gerçekleştirdiğinin bilinmesi ile beraber, antioksidanların toksik maddeleri, ilaçları detoksifiye edici özelliğinden dolayı yeni oluşturulacak ilaçlar için etkisinin araştırılması yapılırken çok yardım sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Agarwal A., Cocuzza M., Abdelrazik H., Sharma R. K., Oxidative Stress Measurement in Patients with Male or Female Factor Infertility, *Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress, Assessment, Transworld Research, Network Kerala, India, 2008*, 195-218.

Ahmad S., Pardini R. S., Mechanisms for Regulating Oxygen Toxicity in Phytophagous Insects, *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, **8**(4), 401-413.

Ahmad S., Biochemical Defense of Pro-Oxidant Plant Allelochemicals by Herbivorous Insects, *Biochemical Systematics and Ecology*, 1992, **20**, (4), 269-296.

Ahmad S., Zaman K., MacGill R. S., Batcabe J. P., Pardini R. S., Dichloro-Induced Oxidative Stress in a Model Insect Species, *Spodoptera eridania*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1995, **29**(4), 442-448.

Aitken R. J., Roman S. D., Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2008, **1**(1), 15-24.

Akdoğan M., Kaleli S., Gültekin F., Vatansev H., Kızılay H. Investigation of the Effects of 5-Fluorouracil Onantioxidant Enzyme Activity in Rabbits, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2000, **20**(4), 203-208

Akkuş İ., *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, 1. Baskı, Mimoza Yayıncılık, Konya, 1995.

Akpoyraz M., Durak İ., Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri, *Ankara Tıp Mecmuası*, 1995, **48**, 253- 262.

Akyol H., Kemoterapinin Temel İlkeleri. Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı, *XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, İzmir, 2004.

Alam G., Jones B. C., Toxicogenetics: in Search of Host Susceptibility to Environmental Toxicants, *Frontiers in Genetics*, 2014,**5**, 1-5.

Alam S. S., Hafiz N. A., El-Rahim AHA., Protective Role of Taurine Against Genotoxic Damage in Mice Treated with Methotrexate and Tamoxfine, *Environ Toxicol Pharmacol*, 2011, **31**(1), 143-152.

Altınççek B., Lindner M., Linder D., Preissner K., Vilcinskas A., Microbial Metalloproteinases Mediate Sensing of Invading Pathogens and Activate Innate Immune Responses in the Lepidopteran Model Host *Galleria mellonella*, *Infection and Immunity*, 2007,**75**(1), 175-183.

Altuntaş H., Determination of Gibberellic Acid (GA3)- Induced Oxidative Stress in a Model Organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *Environmental Entomology*, 2015, **44**(1),100–105.

Andreas M., *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, 1st Edition, CRC Press, USA,1999.

Antmen E., Beta Talasemide Oksidatif Stres, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2005, 164732.

Anton E. P., Johannes B., Arne Vander G., Gerard J.M., The Glutathione-Binding Site in Glutathione S-transferases, *Biochemical Journal*, 1990, **269**(1), 47-54.

Arı B., Borik Asit ve Maltozun Besinsel Karışımının *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nin bazı Biyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, 2010, 258867.

Ateşşahin A., Karahan İ., Türk G., Gür S., Yılmaz S., Çeribaşı A. O., Protective role of Lycopene on Cisplatin-Induced Changes in Sperm Characteristics, Testicular Damage and Oxidative Stress in Rats, *Reproductive Toxicology*, 2006, **21**(1), 42-47.

Aydemir B., Karadağ Sarı E., Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi, *Kocatepe Veteriner dergisi*, 2009, **2**(2), 56-60.

Barbehenn R. V., Kochmanski J., Menachem B., Allocation of Cysteine for Glutathione Production in Caterpillars with Different Antioxidant Defense Strategies: a Comparison of *Lymantria Dispar* and *Malacosoma disstria*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2013, **84**(2), 90-103.

Basaga H., Proteinlerin Radikaller Tarafından İnaktivasyonu, Antioksidan Maddelerin Rolü, *Biyokimya dergisi*, 1987,**12**(3), 25-33.

Basaga H. S., Biochemical Aspects of Free Radicals, *Biochemistry and Cell Biology*, 1990, **68**(7-8), 989-998.

Baylin S. B., Herman J. G., Graff J. R., Vertino P. M., Issa J. P., Alterations in DNA Methylation: a Fundamental Aspect of Neoplasia. *Advances in Cancer Research*, 1998, **72**, 141-196.

Becker L. B., Vanden Hoek T. L., Shao Z. H., Li C. Q., Schumacker, P.T. Generation of Superoxide in Cardiomyocytes during Ischemia before Reperfusion, *American Journal of Physiology*, 1999, **277**(6), 2240-2246.

Benov L., Fridovich I., Growth in Iron-Enriched Medium Partially Compensates Escherichia coli for the Lack of Manganese and Iron Superoxide Dismutase, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(17), 10313-10316.

Berköz M., Yalın S., Güler G. V., Yalçın A., Akut Lösemilerde Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitesi. *Erciyes Tıp Dergisi*, 2008, **30**(3),157-162.

Berlett B. S., Chock P. B., Yim M. B., and Stadtman E. R., Manganese (II) Catalyzes the Bicarbonate-Dependent Oxidation of Amino Acids by Hydrogen Peroxide and the Amino Acid-dismutation of Hydrogen Peroxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, **87**(1), 389-393.

Bird A., I λ 2 Transcription Unleashed by Active DNA Demethylation, *Nature Immunology*, 2003, **4**, 208-209.

Boyer T. D., Vessey D.A., Holcomb C., Ve Saley N., Katalitik Aktivite ile Substrat Olmayan Ligandların Glutation S-Transferazlar ile Bağlanması Arasındaki İlişkinin İncelenmesi, *Biochemical Journal*, 1984, **217**(1), 179-185.

Bradford M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1-2), 248-254.

Brea-Calvo G., Rodríguez-Hernández A., Fernández-Ayala D. J., Navas P., SánchezAlcázar J. A., Chemotherapy Induces an Increase in Coenzyme Q10 Levels in Cancer Cell Lines, *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, **40**(8), 1293-1302.

Brennan M., Thomas D. Y., Whiteway M., Kavanagh K., Correlation Between Virulence of *Candida Albicans* Mutants in Mice and *Galleria mellonella* Larvae, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2002, **34**(2), 153-157.

Bronskill J. F., A Cage to Simplify the Rearing of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae), *Journal of Lepidopterists Society*, 1961, **15**(2), 102-104.

Browne N., Heelan M., Kavanagh K., An Analysis of the Structural and Functional Similarities of Insect Hemocytes and Mammalian Phagocytes, *Virulence*, 2013, **4**(7), 597-603.

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.

Burçak G., Andican G., Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma, *Cerrahpaşa Journal of Medical*, 2004, **35**(4), 159-169.

Büyükgüzel E., Hyrsi P., Büyükgüzel K., Eicosanoids Mediate Hemolymph Oxidative and Antioxidative Response in Larvae of *Galleria mellonella* L., *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2010, **156**(2), 176-183.

Cadenas E., Biochemistry of Oxygen Toxicity, *Annual Review of Biochemistry*, 1989, **58**(1), 79-110.

Carrió, E., Suelves M., DNA Methylation Dynamics in Muscle Development and Disease, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2015, **7**(19).

Carroll E. C., Oxygen Radicals and Human Disease, *Annals of Internal Medicine*, 1987, **107**, 526-545.

Cervera A., Maymó A.C., Martínez-Pardo R., Garcerá M.D., Antioxidantenzymes in *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae) Exposed to Cadmium, *Environmental Entomology*, 2003, **32**, 705-710.

Cheng J. C., Matsen C. B., Gonzales F. A., Ye W., Greer S., Marquez V. E., Inhibition of DNA Methylation and Reactivation of Silenced Genes by Zebularine, *Journal of the National Cancer*, 2003, **95**, 399 -409.

Cheng J. C., Yoo C. B., Weisenberger D. J., Chuang J., Wozniak C., Liang G., Preferential Response of Cancer Cells to Zebularine, *Cancer Cell*, 2004, **6**(2), 151-158.

Cheung C. C. C., Zheng G.J., Li A.M., Richardson B.J., Lam P.K.S., Relationships Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna viridis*, *Aquatic toxicology*, 2001, **52**(3-4), 189-203.

Choi J. D., Lee J. S., Interplay Between Epigenetics and Genetics in Cancer, *Genomics Informatics*, 2013,**11**(4),164-173.

ChuG.,Biochemistry201:DNArepair,<http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf>, (7 Aralık 2018).

Cihak A., Biological Effects of 5-azacytidine in Eukaryotes, *Oncology*, 1974, **30**(5), 405-422.

Clemens M. R., Waladkhani A. R., Bublitz K., Ehninger G., Gey K. F., Supplementation with Antioxidants Prior to Bone Marrow Transplantation, *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1997, **109**(19), 771-776.

Cochrane C. G., Cellular Injury by Oxidants, *The American Journal of Medicine*, 1991, **91**(3), 23-29.

Colletti L. S., Myers W. R., Darkin-Rattray J. S., et al. Broad Spectrum Antiprotozoal Agents that Inhibit Histone Deacetylase Structure-Activity Relationships of Apicidine, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2001, **11**(2), 107-111.

Cook S. M., McArthur J. D., Developing *Galleria mellonella* As a Model Host for Human Pathogens, *Virulence*, 2013, **4**(5), 350-353.

Cymborowski B., Temperature Dependent Regulatory Mechanism of Larval Development of the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*), *Acta Biochimica Polonica*, 2000, **47**(1), 215-221.

Cytrynska M, Zdybicka-Barabas A, Jakubowicz T. The Involvement of Protein Kinase A in the Immune Response of *Galleria mellonella* Larvae to Bacteria, *Acta Biochimica Polonica*, 2007, **54**(1),167–174.

Çakır, Ş., Yamanel Ş., Böceklerde İnektisidlere Direnç, *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 2005, **6**(1), 21-29.

Çetik S., Siçanlarda Siklofosamid Nedenli Kardiyotoksistede Oksidatif Stres ve Kalp Hasarına Karşı Karvakrol'ün Koruyucu Etkisi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2014, 343638.

Datsenko Z. M., Donchenko G. V., Shakhman O. V., Hubchenko K. M., Khmel T. O., Role of Phospholipids in Functionally Different Cell Membranes under Conditions of Antioxidant System Disturbance, *Ukrainian Biochemical Journal*, 1996, **68**(1), 49-54.

Davies M. J., and Dean R. T., *Radical-Mediated Protein Oxidation*. From Chemistry to Medicine, Oxford University Press, Oxford, 1997, 443.

Delibaş N., ve Özçankaya R., Serbest Radikaller, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1995, **2**(3), 11-17.

Dere B., Azadiraktin'in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Hemolenfinde Bulunan Bazı Antioksidan Enzimlerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2015, 394345.

Di Croce L., Raker V. A., Corsaro M., Fazi F., Fanelli M., Faretta M., Methyltransferase Recruitment and DNA Hypermethylation of Target Promoters by an Oncogenic Transcription Factor, *Science*, 2002, **295**(5557), 1079-1082.

Diplock A., *Healthy Lifestyles Nutrition and Physical Activity*. Antioxidant Nutrients. ILSI Europe Concise Monograph Series, Belgium, 1998, 59.

Donya S. M., Aly F. A., Abo-Zeid M. A. M., Antigenotoxicitefi-Cacy of some Vitamins Against the Mutagenicity Induced by Ifosfamide in Mice, *Nature Science*, 2010, **8**(2), 55-66.

Downer R. G. H., Lipid Metabolism, In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon Press, Oxford, 1986, 77-113, 8536.

Dönmez N., Yıldırım M., Arslan P., *Obezite ve Kanser*, 1. Basım, Klasmat Yayın Evi, Ankara, 2008.

Draper H. H., Hadley M., Malondialdehyde Determination As Index of Lipid Peroxidation, *Methods Enzymology*, 1990, **186**, 421-431.

Dubovskiy I. M., Martemyanov V. V., Vorontsova Y. L., Rantala M. J., Gryzanova E. V., and Glupov V. V., 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*, 2008, **148**(1), 1-5.

Durmuş Y., 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, 2007, 199795.

Dündar Y., Aslan R., *Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar*, 1. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Afyonkarahisar, 2000.

Düzgüner V., Deneysel Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda Çinkonun Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa K. Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay, 2005, 171694.

- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P. A., Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy, *Doğa*, 2004, **429**, 457- 463.
- Felton, G. W. and Summers, C. B. Antioxidant Systems in Insects, *Archives of Insect Biochemistry*, 1995, **29**(2), 187-197.
- Ferkovich S. M., Morales-Ramos J. A., Rojas M. G., Oberlander H., Carpenter J. E., and Greany P., Rearing of Ectoparasitoid *Diapetimorpha Introita* on An Artificial Diet: Supplementation with Insect Cell Line-Derived Factors, *Biocontrol*, 1999, **44**(1), 29-45.
- Flora S. J., Role of Free Radicals and Antioxidants in Health and Disease, *Cellular and Molecular Biology*, 2007, **53**(1), 1-2.
- Fournier D., Bride J. M., Poirie M., Berge J. B., Plapp F. W., Insect Glutathione S-Transferases. In: Biochemical Characteristics of the Major Forms from Houseflies Susceptible and Resistant to Insecticides, *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**(3), 1840-1845.
- Franko R., Schoneveld O., Georgakilas A. G., Panayiotidis M., Oxidative Stress, DNA Methylation and Carcinogenesis, *Cancer Letters*, 2008, **266**(1), 6-11.
- Freeman B. A., Crapo J. D., Biology of Disease: Free Radicals and Tissue Injury, *Lab Investigation*, 1982, **47**(5), 412-426.
- Fridovich I., Superoxide Dismutases- An Adaptation to A Paramagnetic Gas, *Journal Biological Chemistry*, 1989, **264**(2), 7761-7764.
- Fridovich I., and Freeman B.. Antioxidant Defenses in the Lung, *Annual Review of Physiology*, 1986, **48**, 693-702.
- Friedberg E. C., DNA Damage and Repair, *Nature*, 2003, **421**(6921), 436-440.
- Gallipoli P., Giotopoulos G., Huntly B. J., Epigenetic Regulators As Promising the Rapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia, *Therapeutic Advances in Hematology*, 2015, **6**(3), 103-119.
- Goffin J., Eisenhauer E., DNA Methyltransferase Inhibitors-State of the Art, *Annals of Oncology*, 2002, **13**(11), 1699-1716.
- Grewal S. I., Rice J. C., Regulation of Heterochromatin by Histone Methylation and Small RNAs, *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, **16**(3), 230-238.
- Gutteridge, J. M., Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clinical Chemistry*, 1995, **41**(12), 1819-1828.
- Gyamfi M. A., Ohtani I. I., Shinno E., Aniya Y., Inhibition of Glutathione Stransferases by Thonningianin A, Isolated from the African Medicinal Herb, *Thonningia Sanguinea*, in Vitro, *Food Chemical Toxicology*, 2004, **42**(9), 1401-1408.
- Habes D., Morakchi S., Aribi N., Farine J. P. and Soltani N., Boric Acid Toxicity to the German Cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in Midgut Structure, and

Acetylcholinestrase and Glutathione-S-Transferase Activity, *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2006, **84**(1), 17-24.

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B., Glutathione S- transferases, The First Enzymmatic Step in Mercapturic Acid Formation, *Journal of Biological Chemistry*, 1974, **246**(22), 7130-7139.

Haftacı İ., Farklı Dozlarda Konağa Verilen IAA₃ (İndol-3Asetik Asit)'In Parazitoit Apanteles Galleriae Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae) Gelişim Biyolojisine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010, 253462.

Halliwell B., Gutteridge J. M., Role of Iron in Oxygen Radical Reactions, Editor: Packer L., *Methods In Enzymology*, 1st edition, Academic Press, USA, 47-56, 1984.

Halliwell B., Gutteridge J. M., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3. Baskı, Clarendon Press, Oxford, 1989.

Halliwell B. *Free Radicals, Antioxidant, and Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence* Lancet, 1994, **344**, 721-724.

Halliwell B., Gutteridge, J. M. C, Cross, C. E., Free Radicals Antioxidants, and Human Disease, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1992, **119**(6), 598-620.

Halliwell B., Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease, *The American Journal of Medicine*, 1991, **91**(3), 14-22.

Hamilton J. P., Epigenetics: Principles and Practice, *Digestive, Diseases*, 2011, **29**(2), 130-135.

Hattori N., Ushijima T., Compendium of Aberrant DNA Methylation and Histone Modifications in Cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **455**(1-2), 3-9.

Heinle H., and Betz, E., Effects of Dietary Garlic Supplementation in Rat Model of Atherosclerosis, *Arznei-formen*, 1994, **44**(5), 614-617,

Hermes L., ve Zenteno S., Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress, *Comparative Biochemistry Physiology C Toxicology Pharmacology*, 2002, **133**(4), 537-556.

Holleran J. L., Parise R. A., Joseph E., Eiseman J. L., Covey J. M., Glaze E. R., Plasma Pharmacokinetics, Oral Bioavailability and Interspecies Scaling of the DNA Methyltransferase Inhibitor, *Zebularine*, 2005, **11**, 3862 -3868.

Hyršl P., Büyükgüzel E., Büyükgüzel K., The Effects of Boric Acid-Induced Oxidative Stress on Antioxidant Enzymes and Survivorship in *Galleria mellonella*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2007, **66**(1), 23-31.

Imamura-Takigawa H., Sekine T., Murata M., Takayama K., Nakazawa K., Nakagawa J., Stimulation of Glucose Uptake in Muscle Cells by Prolonged Treatment

with Scriptide, a Histone Deacetylase Inhibitor, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2003, **67**(7), 1499-1509.

Jander G., Rahme L. G., Ausubel F. M., Positive Correlation Between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects, *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(13), 3843-3845.

Joence H., Genetic Toxicology of Oxygen, *Mutation Research*, 1989, **219**, 193-208.

Jones P. A., Taylor SM. Cellular Differentiation, Cytidine Analogs and DNA Methylation, *Cell*, 1980, **20**(1), 85 -93.

Juttermann R., Li E., Jaenisch R., Toxicity of 5-Aza-2'-Deoxycytidine to Mammalian Cells is Mediated Primarily by Covalent Trapping of DNA Methyltransferase Rather than DNA Demethylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, **91**, 11797-11801.

Kanter M., Demir H., Karakaya C., Özbek H., Gastroprotective Activity of Nigella Sativa I oil and its Constituent, Thymoquinone Against Acute Alcoholinduced Gastric Mucosal Injury in Rats, *World Journal of Gastroenterology*, 2005,**11**(42), 6662-6666.

Kanwal R., ve Gupta S., Epigenetic Modifications in Cancer, *Clinical Genetics*, 2012, **81**(4), 303-311.

Kaur C., Kapoor H. C., Antioxidants in Fruits and Vegetables, *Food Science and Technology*, 2001, **36**(7), 703-725.

Kavas G., "Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri", *Türkiye Klinikleri Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1989, **9**.

Kim J. K., Samaranayake M., Pradhan S., Epigenetic Mechanisms in Mammals, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, **66**(4), 596-612.

Koç M., Ratlarda İndometazin ile Oluşturulan Gastrik Hasar Üzerine Askorbik Asitin Gastroprotektif Etkileri ve Bu Etkilerin Antioksidan Sistem ile İlişkisi, Yüksek, Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi, Erzurum, Türkiye, 2007, 196267.

Kono, Y., and Fridovich I., Superoxide Inhibits Catalase, *Journal of Biological Chemistry*, 1982, **257**(10), 5751-5754.

Kothari S., Thompson A., Agarwal A., du Plessis S. S., Free Radicals: Their Beneficial and Detrimental Effects on Sperm Function, *Indian Journal of Experimental Biology*, 2010, **48**(5), 425-435.

Krishnan N., Kodrik D., Kludkiewicz B., Sehnal F., Glutathione–Ascorbic Acid Redox Cycle and Thioredoxin Reductase Activity in the Digestive Tract of *Leptinotarsa cemlineata* (Say), *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, **39**(3), 180-188.

Kumaraguruparan R., Subapriya R., Viswanathan N. S.. Antioxidant Profile in the Circulation of Patients with Fibroadenoma and Adenocarcinoma of the Breast, *Clinical Biochemistry*, 2002, **35**(4), 275-279.

Leone G., Voso M. T., Teofili L., Lubbert M., Hematolojik Maligniteler ve MDS Tedavisinde DNA Metilasyon İnhibitörleri, *Journal of Clinical Immunology*, 2003, **109**, 89 -102.

Lietti M.M.M., Botto E., Alzogaray R.A., Insecticide Resistance in Argentine Populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera : Gelechiidae), *Neotropical Entomology*, 2005, **34**, 113-119.

Lin J. Q., Effect of Nutrition İntervention on Antioxidant Capacity and Lipid Peroxide in Patients with Bone Marrow Transplantation, *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, **22**(6), 530-532.

Lunec J., Free Radicals: Their Involvement in Disease Processes, *Annals of Clinical Biochemistry*, 1990, **27**(3), 173-182.

Mann M. R. W., Bartolomei M S. Epigenetic Reprogramming by Maternal Behaviour and Pharmacological Intervention Nature Versus Nurture; Let's the Whole Thing Off, *Epigenetics*, 2007, **2**(1), 22-28.

Marnett L. J., Oxygen Radicals, Lipid Peroxidation and DNA Damage, *Toxicology*, 2002, Cit no:**181**, 219-222.

Masella R., Benedetto R. D., Vari R., Filesi C., Giovannini C., Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005, **16**(10), 577-586.

Matsusaka K., Funata S., Fukayama M., Kaneda A., DNA Methylation in Gastric Cancer, Related to Helicobacter Pylori and Epstein-Barr Virüs, *World Journal Gastroenterology*, 2014, **20**(14), 3916-3926.

Mccord, J. M., and Fridovich, I., Superoxide Dismutase. An Enzymatic Function Forery Throcuprein (hemocuprin), *Journal of Biological Chemistry*, 1969, **224**, 6049-6055.

Meister A., Anderson M. E., Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 1983, **52**, 711-760.

Memişoğulları R., Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi, *Dicle Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, **3**, 30-39.

Mercan U., Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 2004, **15** (1-2), 91-96.

Michal T., Krystyna M. W., Marian D., Alojzy D., and Ewa K. G., Modulation of Procainamide Toxicity by Selenium-Enriched Yeast in Rats, *Archives of Toxicology*, 1993, **67**(10), 691-695.

Michiels C., Raes M., Toussaint O., Rémacle J., Importance of Se- Glutathione Peroxidase, Catalase and Cu/ Zn-SOD for Cell Survival Aganst Oxidative Stres, *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, **17**(3), 235-248.

Mikeska T., Craig J. M., DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond, *Genes (Basel)*, 2014, **5**(3), 821-864.

Momparler R. L., Momparler L. F., Samson J., Comparison of the Antileukemic Activity of 5-AZA-2'-Deoxycytidine, 1-Beta-D-Arabinofuranosylcytosine and 5-Azacytidine Against L1210 Leukemia, *Leukemia Research*, 1984, **8**(6), 1043-1049.

Moslen M. T., *Reactive Oxygen Species in Normal Physiology, Cell Injury and Phagocytosis*, Free Radicals Diagnostic Medicine, Plenum Press, New York, 1994.

Nakayama J., Rice J. C., Strahl B. D., Allis C. D., Grewal S. I., Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly, *Science*, 2001, **292**(5514), 110-113.

Nice D., *Antioxidant Based Nutraceuticals, New Technologies for Healthy Foods and Nutraceuticals*, Science Publishers, Shrewsbury, 1997, 105-123.

Niki E., Antioxidant in Relation to Lipid Peroxidation, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1987, **44**(2-4), 227-253.

Nordberg J., Arner E. S., Reactive Oxygen Species Antioxidants and the Mammalian Thioredoxin System, *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 2001, **31**(11), 1287-1312.

Oakley G. G., Devanaboyina U., Robertson L. W., Gupta R. C., Oxidative DNA Damage Induced by Activation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Implications for PCB-Induced Oxidative Stress in Breast Cancer, *Chemical Research Toxicology*, 1996, **9**(8), 1285-1292.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Analytical Biochemistry*, 1979, **95**(2), 351-358.

Onat R., Emerk K., *Temel Biyokimya*, Baskı 2, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 1997, 661-662.

Orr W. C., and Sohal R. S., Extension of Life-Span by Over Expression of Superoxide Dismutase and Catalase in *Drosophila melanogaster*, *Science*, 1994, **263**(5150), 1128-1130.

Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., and Deemer E. K., Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**(11), 3122-3128.

Öder E., *Bal Arısı Hastalıkları*, 2. Baskı, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, 1983.

Özbey E. Radyasyona Dirençli *Deinococcus radiodurans* ile *Escherichia coli*'de Radyasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2009, 246640.

Özer M., Arı Kovanlarında Önemli Zarar Yapan Balmumu Güvesi (*Galleria mellonella* L.) nin Morfolojisi, Biyolojisi ve Yayılışı Üzerinde Araştırmalar, *Bitki Koruma Bülteni*, 1962, **2**(12), 26-35.

Portakal O., Ozkaya O., Inal M. E., Bozan M., Sayek I., Coenzyme Q10 Concentrations and Antioxidant Status in Tissues of Breast Cancer Patients. *Clinical Biochemistry*, 2000, **33**(4), 279-284.

Porter N. A., Chemistry of Lipid Peroxidation, *Methods in Enzymology*, 1984, **105**, 273-282.

Prasad K. N., Cole W. C., Kumar B., Che Prasad, K. Pros and Cons of Antioxidant Use During Radiation Therapy, *Cancer Treatment Reviews*, 2002, **28**(2), 79-91.

Punzo F., Detoxification Enzymes and the Effects of Temperature on the Toxicity of Pyrethroids to the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1993, **105**(2), 155-158.

Rajurkar R. B., Khan Z. H., Gujar G. T., Studies on Levels of Glutathione-S-Transferase, its Isolation and Purification from *Helicoverpa Armigera*, *Current Science*, 2003, **85**(9), 1355-1360.

Rybak L. P., Husain K., Whitworth C., Somani S. M., Dose Dependent Protection by Lipoic Acid Against Cisplatin-Induced Ototoxicity in Rats: Antioxidant Defense System, *Toxicological Sciences*, 1999, **47**(2), 195-202.

Saad S. Y., Arafah M. M., Najjar T. A., Effects of Mycophenolate Mofetil on Cisplatininduced Renal Dysfunction in Rats, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2007, **59**(4), 455-460.

Sak O., Uçkan F., Ergin E., Effects of Cypermethrin on Total Body Weight, Glycogen, Protein, and Lipid Contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), *The Belgian Journal of Zoology*, 2006, **136**(1), 53-58.

Sangeetha, P., Das, U. N., Koratkar, R., Suryaprabha, P. Increase in Free Radical Generation and Lipid Peroxidation Following Chemotherapy in Patients with Cancer, *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, **8**(1), 15-19.

Sanocka D, Kurpisz M. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells, *Journal of Reproductive Biology Endocrinology*, 2004, **12**(2), 1-7.

Santi D. V., Norment A., Garrett C. E., Covalent Bond Formation Between a DNA-Cytosine Methyltransferase and DNA Containing 5-Azacytosine, *Proceedings of the National Academy Sciences*, 1984,**81**(22), 6993-6997.

Santini V., Kantarjian H. M., Issa J. P., Neoplazi DNA Metilasyonundaki Değişiklikler: Patofizyoloji ve Terapötik Çıkarımlar, *Annals of Internal Medicine*, 2001, **13**(8), 573-586.

Sayed-Ahmed M. M., Eissa M. A., Kenawy S. A., Mostafa N., Calvani M., Osman A.M., Progression of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in a Carnitine-Depleted Rat Model, *Journal of Chemotherapy*, 2004, **50**(4), 162-170.

Schmidley J. W., Free Radicals in Central Nervous System Ischemia, *Stroke*, 1990, **21**(7), 1086-1090.

Scibior D., Czeczot H., Catalase: Structure, Properties, Functions, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2006, **60**, 170-180.

Serin E., Yılmaz E., Yılmaz S., Ünsaldı E., Durmuş A. S., İskemi-Reperfizyon Hasarında Serbest Oksijen Radikalleri, *Artroplastik Artroskopik Cerrahi Dergisi*, 1998, **9**(1), 36-39.

Simone N. L., Simone V., Simone C. B., Antioxidants and Other Nutrients do not Interfere with Chemotherapy or Radiation Therapy and Can Increasekill and Increase Survival, *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 2007, **13**(1), 22-28.

Singh S. P., Coronella J. A., Benes H., Cochrane B. J., Zimniak P., Catalytic Function of Drosophila Melanogaster Glutathione S-transferase DmGSTS1-1(GST-2) in Conjugation of Lipid Peroxidation and Products, *European Journal Biochemistry*, 2001, **268**(10), 2912-2923.

Slump P., and Schreuder H. A. W., Oxidation of Methionine and Cysteine in Foods Treated with Hydrogen Peroxide, *Journal of the Science of Food Agriculture*, 1973, **24**(6), 657-661.

Sorm F., Piskala A., Cihak A., Vesely J., 5-Azacytidine, a New, Highly Effective Cancerostatic, *Experientia*, 1964, **20**(4), 202-203.

Suda S., Katsura K., Kanamaru T., Saito M., Katayama Y., Valproic Acid Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Brain Through Inhibition of Oxidative Stress and Inflammation, *European Journal of Pharmacology*, 2013, **707**(1-3), 26-31.

Suwalsky M., Ramos P., Villena, F., Cardenas H., Norris B., Cuevas F., And Sotomayer, C. P. The Organophosphorus Insecticide Parathion Changes Properties of Natural and Model Membranes, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2001, **70**(2), 74-85.

Thomas R. J., Hamblin K. A., Armstrong S. J., Muller C. M., Bokori-Brown M., Goldman S., Atkins H. S., Titball R. W., *Galleria mellonella* As a Model System to Test the Pharmacokinetics and Efficacy of Antibiotics Against *Burkholderia pseudomallei*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2013, **41**(4), 330-336.

Timmermann S. E., Zangerl A. R., and Berenbaum M. R., Ascorbic and Uric Acid Responses to Xanthotoxin Ingestion in a Generalist and a Specialist Caterpillar, *Archives of Insect Biochemistry*, 1999, **42**(1), 26-36.

Tremellen K., Oxidative Stress and Male Infertility-A Clinical Perspective, *Hum Reprod Update*, 2008, **14**(3), 243-258.

Troudi A., Soudani N., Amara I. B., Bouaziz H., Ayadi F. M., Zeghal N., Oxidative Damage in Erythrocytes of Adult Rats and Their Suckling Pups Exposed to Gibberellic Acid, *Toxicology and Industrial Health*, 2011, **28**(9), 820-830.

Tsan M. F., Superoxide Dismutase and Pulmonary Oxygen Toxicity, *Experimental Biology and Medicine*, 1997, **214**(2), 107-113.

Turk P. W., Laayoun A., Smith SS., Weitzman SA., DNA Adduct 8-Hydroxyl-2'-Deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) Affects Function of Human DNA Methyltransferase, *Carcinogenesis*, 1995, **16**(5), 1253-1255.

Tülüce Y., "Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Subakut ve Subkronik Uygulamalarının Ratların Eritrosit ve Çeşitli Dokularındaki Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Glutasyon ve Lipid Peroksidasyon Seviyeleri Üzerine Etkileri", Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 2005, 197581.

Türk G., Çeribaşı A. O., Sakin F., Sönmez M., Ateşşahin A., Antiperoxidative and Anti-Apoptotic Effects of Lycopene and Ellagic Acid on Cyclophosphamide Induced Testicular Lipid Peroxidation and Apoptosis, *Reproduction, Fertility and Development*, 2010, **22**(4), 587-596.

Ueda K., Kobayashi S., Morita J., Komano T., Site-Specific DNA Damage Caused by Lipid Peroxidation Products, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, **824**(4), 341-348.

Vontas J. G., Small G. J., Hemingway J., Glutathione-S-Transferases As Antioxidant Defence Agents Confer Pyrethroid Resistance in Nilaparvata Lugens, *Biochemical Journal*, 2001, **357**(1), 65-72.

Wakatsuki A., Ogawa Y., Saibara T., Okatani Y., Fukaya T., Size and Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoprotein Particles in Breast Cancer Patients with Tamoxifen-Induced Fatty Liver, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002, **87**(8), 3676-3681.

Wang Q., Shi G., Song D., Rogers D. J., Davis L. K., and Chen X., Development, Survival, Body Weight, Longevity, and Reproductive Potential of *Oemena hirta* (Coleoptera: Cerambycidae) under Different Rearing Condition, *Journal of Economic Entomology*, 2002, **95**(3), 563-569.

Weitzman S. A., Turk P. W., Milkowski D. H., Kozlowski K., Free Radical Adducts Induce Alterations in DNA Cytosine Methylation, *Proceedings of the National Academy of Science*, 1994, **91**(4), 1261-1264.

Williams G. M., DNA Reactive and Epigenetic Carcinogens, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 1992, **44**(8), 457-464.

Yagi K., Simple Assay for the Level of Total Lipid Peroxides in Serum or Plasma, *Methods in Molecular Biology*, 1998, **108**(1), 101-106.

Yalçinkaya E., Organofosforlu İnektisit Fenthion'un *Galleria mellonella* L.'nin Antioksidan Savunma Sistemi ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman, 2013, 334704.

Yanbeyi S., Aspirin ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 1999, 84437.

Yelkovan İ., Göze İ., Bakır S., An Investigation on the Effect of N-Nitrosopyrrolidine on the Rabbit Liver and Kidney Glutathione-S-Transferase Activity in Vitro, *Journal of Faculty Pharmacy*, 2001, **30** (3),13-20.

Yokuş B., Çakır D. Ü., Kanser Biyokimyası, *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 2012, **1**(2), 718.

Yorulmaz S., Ay R., Akar ve Böceklerde Pestisitlerin Detoksifikasyonunda Rol Oynayan Ezimler, *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 2010, **24**(2),137-148.

Young I. S., Woodside J. V., Antioxidants in Health and Disease, *Journal of Clinical pathology*, 2001, **54**(3), 176-186.

Yu S. J., Induction of Detoxification Enzymes by Triazine Herbicides in the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2004, **80**(2), 113-122.

Zapata R., Specty O., Grenier S., Febvay G., Pageaux J. F., Delobel B and Castane C Carcass Analysis to Improve a Meat, Based Diet for the Artificial Rearing of the Predatory Mirid Bug *Dicyphus tamaninii*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2005, **60**, 84-92.

Zhou L., Cheng X., Connolly B. A., Dickman M. J., Hurd P. J., Hornby D.P., Zebularine: DNA Metiltransferazları ile Kovalent Bir Kompleks Oluşturan Yeni Bir DNA Metilasyon İnhibitörü, *Journal of Molecular Biology*, 2002, **321**, 591-599.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Çakır E., Özbek R., Uçkan F., Ergin E., Zebularine Induced Alterations in Antioxidant Enzyme Activity and Lipid Peroxidation in Model Host *Galleria mellonella*, *XI. European Congress of Entomology*, Napoli, ITALY, 2018.



ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladıktan sonra 2011 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2015 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2016 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda ise yüksek lisans eğitimine başladı.

