

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FLUPYRADIFURONE KAYNAKLI OKSİDATİF STRESİN BÜYÜK
BAL MUMU GÜVESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YASİN ALATAŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA COŞKUN

ADİYAMAN, 2024

ÖZET

FLUPYRADIFURONE KAYNAKLI OKSİDATİF STRESİN BÜYÜK BAL MUMU GÜVESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Yasin ALATAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Adıyaman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şubat 2024

Danışman: Prof. Dr. Mustafa COŞKUN

Sunulan çalışmada, *Galleria mellonella* larvalarında kullanılan yeni bir butenoid insektisit olan Flupyradifurone'un (FLU), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) enzimleri ile malondialdehit (MDA), protein, karbonhidrat, lipid miktarı üzerindeki etkileri incelenerek, zararlılarla mücadelede hedeflenen organizmadaki kimyasal ve fizyolojik süreçlerin nasıl etkilendiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Flupyradifurone'un farklı konsantrasyonları (10, 25, 50, 75 ve 100 µg/ml), son larva evresindeki böcekler enjekte edilmiştir. Böcekler, belirli periyotlarda (4 ve 24 saat) alınıp tartılarak, -80 °C'de biyokimyasal analizler yapılana kadar bekletilmiştir. Dört saatlik veriler incelendiğinde uygulanan tüm dozlarda SOD aktivitesi kontrol grubuna göre azalmıştır. 24 saatlik veriler incelendiğinde 10, 25, 50, 75 µg/ml flupyradifurone uygulanan gruplarda SOD aktivitesi artış göstermiştir. Dört saatlik ve yirmi dört saatlik CAT verileri incelendiğinde uygulanan bütün dozların aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. 4 saatlik veriler incelendiğinde uygulanan tüm dozlarda MDA miktarı artış göstermiştir. Yapılan analizler, *G. mellonella* larvalarının antioksidan savunma mekanizmalarının etkinliğini, ROT homeostazisinin bozulduğunu ve lipid peroksidasyonuna yol açtığını göstermektedir. Bulgular, larvaların FLU'ya karşı gösterdiği antioksidan stres tepkisi ve detoksifikasyon mekanizmaları hakkındaki bilgimizi derinleştirirken, gelecekteki hedef dışı toksikoloji araştırmalarının önemini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Flupyradifurone; Malondialdehit; *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

EFFECTS OF FLUPYRADIFURONE INDUCED OXIDATIVE STRESS IN GREATER WAX MOTH

Yasin ALATAŞ

Department of Biology

Adiyaman University, Graduate Education Institute, February, 2024

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa COŞKUN

In the presented study, the effects of Flupyradifurone (FLU), a novel butenoid insecticide used in *Galleria mellonella* larvae, on the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and the amount of malondialdehyde (MDA), protein, carbohydrate, lipid were investigated. The aim was to determine how chemical and physiological processes in the targeted organism for pest control were affected. Different concentrations of Flupyradifurone (10, 25, 50, 75, and 100 µg/ml) were injected into insects in the final larval stage. The insects were weighed at specific intervals (4 and 24 hours) and stored at -80°C until biochemical analyses were performed. Upon examining the data from four hours, SOD activity decreased in all applied doses compared to the control group. In the 24-hour data, SOD activity increased in groups treated with 10, 25, 50, and 75 µg/ml of flupyradifurone. When the four hour and twenty-four hour CAT data were examined, no significant difference was found among the administered doses. MDA levels increased in all applied doses when examining the four hour data. The analyses conducted show that the antioxidant defense mechanisms of *G. mellonella* larvae are activated, ROS homeostasis is disrupted, and it leads to lipid peroxidation. The findings deepen our understanding of the antioxidant stress response and detoxification mechanisms exhibited by larvae against FLU, emphasizing the importance of future non-target toxicity research.

Keywords: Flupyradifurone; Malondialdehyde; *Galleria mellonella*.

TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum çalışmada danışmanlığımı yapan, akademik kariyerimde benimle birlikte ilerleyen, her konuda bana rehberlik eden, insani ve ahlaki değerleriyle örnek aldığım kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa COŞKUN'a çok teşekkür ederim. Edindiğim bilgi ve deneyimlerle görev yaptığım milli eğitim okullarında öğrencilerime daha etkili bir şekilde katkı sağlayabileceğime olan inancım tamdır.

Zorlu pandemi döneminde ve sonrasında meydana gelen deprem sürecinde yüksek lisans eğitimime devam etme konusunda her zaman yanımda olan sevgili eşim, hayat arkadaşım Feride ALATAŞ'a teşekkür ederim.



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Adıyaman Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İmza
Yasin ALATAŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
GÖRSELLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Neonikotenoit İnsektisitler	2
1.2. Flupyradifurone'un Özellikleri	3
1.3. Antioksidan Enzimler	4
1.3.1. Süperoksit dismutaz	5
1.3.2. Katalaz.....	5
1.4. Malondialdehit	6
1.5. <i>Galleria mellonella</i>	6
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. <i>Galleria mellonella</i> 'nın geliştirilmesi	14
3.1.2. Böceklerin homejenizasyonu	14
3.1.3. Protein miktarı tayini.....	15
3.1.4. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi.....	16
3.1.5. Malondialdehit aktivitesinin belirlenmesi.....	16
3.1.6. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi.....	17
3.1.7. Karbonhidrat miktarı tayini	17
3.1.8. Lipit miktarı tayini.....	18
4. BULGULAR	20

	Sayfa
5. TARTIŞMA.....	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
KAYNAKÇA.....	37
ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında süperoksit dismutaz, katalaz aktiviteleri ve malondialdehit miktarına 4 saat sonundaki etkisi	20
Tablo 4.2. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında süperoksit dismutaz, katalaz aktiviteleri ve malondialdehit miktarına 24 saat sonundaki etkisi	22
Tablo 4.3. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında protein, karbohidrat ve lipit miktarına 4 saat sonundaki etkisi	24
Tablo 4.4. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında protein, karbohidrat ve lipit miktarına 24 saat sonundaki etkisi	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Pestisitlerin dünyadaki dağılım yüzdesi.....	2
Şekil 1.2. Flupyradifurone kimyasal yapısı.....	4
Şekil 4.1. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine 4 saat sonundaki etkisi.....	20
Şekil 4.1. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında Katalaz aktivitesi üzerine 4 saat sonundaki etkisi	21
Şekil 4.2. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında Malondialdehit miktarı üzerine 4 saat sonundaki etkisi.....	22
Şekil 4.3. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine 24 saat sonundaki etkisi.....	23
Şekil 4.4. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında Katalaz aktivitesi üzerine 24 saat sonundaki etkisi	23
Şekil 4.6. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında Malondialdehit miktarı üzerine 24 saat sonundaki etkisi.....	24
Şekil 4.5. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında protein miktarı üzerine 4 saat sonundaki etkisi	25
Şekil 4.6. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında karbonhidrat miktarı üzerine 4 saat sonundaki etkisi.....	25
Şekil 4.7. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında lipit miktarı üzerine 4 saat sonundaki etkisi.....	26
Şekil 4.8. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında protein miktarı üzerine 24 saat sonundaki etkisi	27
Şekil 4.9. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında karbonhidrat miktarı üzerine 24 saat sonundaki etkisi.....	28

Şekil 4.10. Flupyradifurone'un <i>G. mellonella</i> larvalarında lipit miktarı üzerine 24	
saat sonundaki etkisi	29



GÖRSELLER DİZİNİ

	Sayfa
Görsel 1.1. <i>Galleria mellonella</i>	8
Görsel 3.1. Böcek homojenizasyonu	15
Görsel 3.2. Protein miktarının spektrofotometrede ölçülmesi.....	16



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	: Amonyum sülfat
μg	: Mikrogram
ACP	: Asit fosfataz
AChE	: Asetilkolin esteraz
ALB	: Albümin
AMZ	: Amitraz
APX	: Askorbat peroksidaz
AZA	: Azadiraktin
BSA	: Bovine serum albumin
CAT	: Katalaz
Cu	: Bakır
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Bakır klorür
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FLU	: Flupyradifurone
g	: Gram
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
GOT	: Aspartat aminotransferaz
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
H_2SO_4	: Sülfürik asit
IMI	: İmidacloprid
L	: Litre
MDA	: Malondialdehid
Mg	: Miligram
μl	: Mikrolitre
Mn	: Mangenez
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
Na_2SO_4	: Sodyum sülfat
NACHR	: Nikotinik asetilkolin reseptörü
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit

NBT	: Nitrotetrazoliumbluechloride
NP	: Nano partikül
O_2^-	: Süperoksit anyonu
OH	: Hidroksil radikali
OS	: Oksidatif stres
PBO	: Piperonil bütoksit
PO	: Peroksidaz
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbiturik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
THC	: Toplam hemosit sayısı
Ti	: Titanyum
TiO_2	: Titanyum dioksit
WHO	: Dünya sağlık örgütü
ZEB	: Zebularin
Zn	: Çinko
ZnO-NPs	: Çinko oksit nano parçacıkları

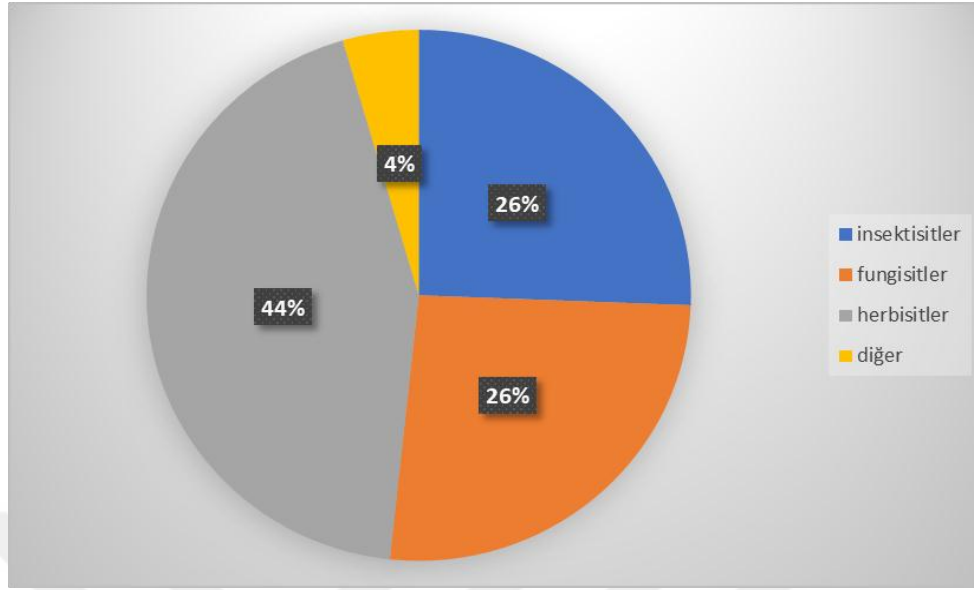
1. GİRİŞ

Dünya sağlık örgütü (WHO) gıda, tarımsal ürünler, hayvan yemleri ve orman ürünlerinde bulunan insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilecek zararlı organizmaları ortamdan uzaklaştırmak, kontrol etmek ve öldürmek amacıyla kullanılan kimyasalları pestisit olarak isimlendirmiştir [1,2]. Bu kimyasallar doğru doz ve zamanda kullanıldıklarında olumlu anlamda etki gösterirken yanlış dozlarda kullanıldıklarında hem çevreye hemde hedef organizma dışında kalan canlılara zarar verebilmektedir [3].

Pestisitler doğayı kirleterek insan ve insan dışında kalan diğer canlıları olumsuz etkilemekte akut ve kronik rahatsızlıklara neden olabilmektedir [4,5]. Böceği kontrol etmek için kullanılan bir pestisit, insektisit olarak adlandırılır. Akarisitler, akarları, afisitler, yaprak bitlerini ve algisitler ise algleri ortadan kaldırmak amacıyla kullanılan insektisitlerdir [1].

Öncüer 1995 yılında yaptığı araştırmada pestisitleri aşağıda belirtildiği gibi sınıflandırmıştır [6].

- Afisit (yaprak bitlerini öldüren)
- Bakterisit (bakterileri öldüren)
- Akarisit (akarları öldüren)
- Herbisit (otları öldüren)
- İnsektisit (böcek öldüren)
- Rodentisit (kemirgenleri öldüren)
- Algisit (algleri öldüren)
- Fungusit (fungusları öldüren)
- Mollussitit (yumuşakçaları öldüren)
- Avisit (kuşları öldüren)
- Nematosit (nematodları öldüren)



Şekil 1.1. *Pestisitlerin dünyadaki dağılım yüzdesi [7]*

İnsektisitler, zararlı böcekleri öldürmek veya kontrol etmek amacıyla çeşitli etki mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar genellikle sinir sistemini, kas fonksiyonlarını veya metabolizmayı hedef alır. İnsektisitler, tarım ve hayvancılık sektörlerinde zararlı böceklerin kontrolü, hastalık taşıyan vektörlerin azaltılması ve depolama koşullarının iyileştirilmesi gibi çeşitli alanlarda kullanılır. İnsektisitler, dünya genelinde tarım ve halk sağlığı alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sentetik yapılı organik insektisitler; Organokloridler, Organofosfatlar, Karbamatlar, Piretroidler, Neonikotinoidler olmak üzere çeşitlere ayrılır [8].

1.1. Neonikotenoit İnsektisitler

Neonikotenoit pestisitler, Shell Biyolojik Araştırma Merkezi'nde 1970'lerin başlarında Kaliforniya Modesto'da tesadüfen yapılan bir çalışmada, kurşun bileşikleri üzerinde keşfedilmiştir [9]. Bu insektisitler 1980'lerde üretildi ve ticari olarak kullanılmaya 1990'ların başlarında başladı [10]. Klotiyanid, nitiazin, tiametoksam, tiyakloprid, asetamiprid, nitenpiram ve imidakloprid (en yaygın kullanılan) kullanılan neonikotenoitlerdendir [11,12]. Neonikotinoidler, insektisit etki gösteren ve nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR'ler) üzerine nörotoksisite ile etkileşen kimyasallardır. Bu maddeler, insektisitlerin merkezi sinir sisteminde sinyal iletimini bloke eden çok spesifik bir etki mekanizmasına sahiptirler [13].

Neonikotinoidlerin en etkili olduğu durum zararlı canlıların merkezi sinir sistemidir. Nikotinik asetilkolin reseptörlerinin agonistleri şeklinde işlev gören kimyasallardır. Bu maddeler, asetilkolin ile benzer özelliklere sahiptir; miktarı az olan yoğunluklarda sinir uyarımını arttırırken, miktarı fazla olan yoğunluklarda kasılmalara, reseptör inhibisyonuna ve nihayetinde yaşamsal faaliyetleri tehlikeye düşürebilecek durumlara neden olabilirler. Neonikotinoidler, omurgalı canlılarda (memeliler, sürüngenler vb.) düşük düzeyde zararlı olma eğilimine sahiptir. Bu, neonikotinoidlerin omurgalı canlılardaki ilgili reseptörlere karşı düşük hassasiyeti sağlayan böcek ve omurgalı hayvanların nikotinik asetilkolin reseptörlerinin yapı ve işleyişindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır [14,15].

Neonikotinoidlerin arılar, omurgalılar ve insanlarda olumsuz etkilerine dair artan endişeler bulunmaktadır. Bu endişelerin yanı sıra, bu insektisitlerin ana bileşikleri ve bunların metabolitlerinin çevreye ve besin zincirine aktarılabilir olması, neonikotinoidlerin kullanımıyla ilgili şüpheleri de beraberinde getirmektedir [16,17]. Kanada'da 2015 yılında, çevreye ve bal arılarına verdiği tahribat sebebiyle bütün neonikotinoidlerin kullanımı yasaklanmıştır. 2018'de, Avrupa Birliği'nde klotianidin ve tiametoksamın kullanımı yasaklanmış, imidakloprid ise yasaklanma sürecine alınmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde bazı eyaletlerde neonikotinoid kullanımına sınırlamalar getirilmiş olmasına rağmen, halen bazı bölgelerde neonikotinoidlerin kullanımı devam etmektedir. Türkiye'de İmidakloprid, tiakloprid ve tiametoksam çeşitli sınırlamalar getirilmiştir. Asetamiprid kullanımına izin verilmiş, ancak klotianidin kullanımı yasaklanmıştır [18,19].

1.2. Flupyradifurone'un Özellikleri

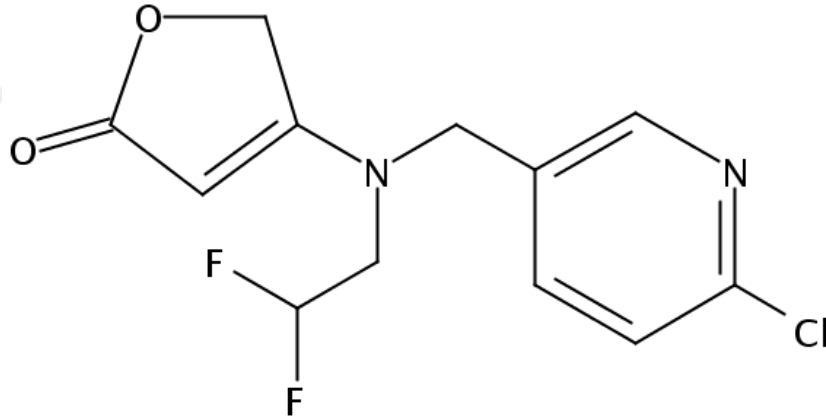
Flupyradifurone(FLU), butenolid insektisit sınıfının ilk üyesidir[20]. Bu reseptörlere geri dönüşümlü olarak bağlanır ve iyon kanallarının devamlı açık kalmasını sağlayarak aksonun kontrolsüz olarak uyarılmasını sağlar[20,21]. Flupyradifurone etkisini gösterirken yapı ve işlevsel olarak diğer neonikotinoidlerden farklılık gösterir [22]. Flupyradifurone, neonikotinoidlerinde dahil olduğu diğer kimyasal sınıflara dirençli birçok emici zararlı üzerinde kontrol sağladığı bildirilmiştir [23]. Bu nedenden dolayı Flupyradifurone günümüzde birçok bitki ve böceklere karşı kullanımı gün geçtikçe artmaktadır.

Yapılan son çalışmalar Flupyradifurone'un bal arılarında larva ömrünü azalttığı, görme ve koku yeteneklerinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir [27]. Arılar Flupyradifurone'a polen, nektar veya doğrudan temas yolu ile maruz kalabilirler [24]. Flupyradifurone'un fungusitlerle birleştirilerek kullanılması bal arılarında (*Apis mellifera*)

letal ve subletal etkilere neden olduğu, arıların hayatta kalma yeteneklerinin azaltığı bildirilmiştir [25].

Flupyradifurone'un uygulanmasından sonra kovan içi ve dışındaki arılar Flupyradifurone ile temas etmiş nektarı 2 hafta boyunca tüketebilir ve üretilen balın Flupyradifurone bulundurma süresi 5 aya kadar çıkmaktadır [26]. Flupyradifurone özellikle beyaz sinekler ve yaprak bitleri olmak üzere emici böceklerle karşı oldukça etkilidir [28]. Flupyradifurone'un bal arıları için güvenli olduğu [29] diğer neonikotenoitlere oranla bazı emici zararlılarla mücadelede etkili olduğu gösterilmiştir [30].

Flupyradifurone'un arıların davranışsal özelliklerine etkisi vardır. Flupyradifurone'a maruz kalan arılar kovanın dışında intihar davranışı sergilediği [31] arıların erken yiyecek arama davranışı gösterdiği [32] arıların uçuş yeteneklerini bozduğu [33] ayrıca Flupyradifurone'un yüksek konsantrasyonlarında arıların tat alma duyarlılığı ve koku alma duyusuna zarar vermiştir [34].



Şekil 1.2. Flupyradifurone kimyasal yapısı

1.3. Antioksidan Enzimler

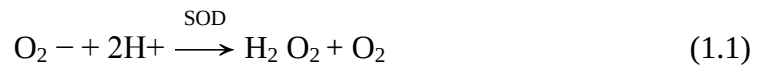
Antioksidanlar, hücrede sürekli olarak üretilen serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi azaltabilen ve böylece hücre hasarını önleyebilen kritik maddelerdir [35,36,37]. Antioksidanlar, hücre metabolizmasının normal süreçlerinde oluşan oldukça zararlı birtakım serbest radikalleri ortadan kaldırarak hücreyi koruyucu bir etki gösterirler [38].

Bu maddeler, zararlı radikalleri temizleyip hücrede oluşan hasarı önleyebilirler. İnsanlarda var olan bu maddeler, vücutta kendiliğinden üretilebildiği gibi dışarıdan da

takviye şeklinde alınabilirler. Endojen ve eksojen antioksidanlar, süpürücü olarak çalışırlar ve zararlı radikallerin temizlenmesinde görev alarak savunma sistemini güçlendirir ve bu şekilde hastalık riskini azaltırlar [39]. Antioksidan enzimler, etkilerini ya reaktif oksijen türlerini (ROT) doğrudan ortadan kaldırarak ya da enzimatik olmayan bir antioksidan üreterek iki ayrı şekilde gösterebilirler [40]. Endojen antioksidanlar; enzimatik antioksidanlar ve nonenzimatik antioksidanlar olarak sınıflandırılır. Enzimatik antioksidan olarak, glutatyon peroksidaz(GPx), glutatyon redüktaz(GR), süperoksit dismutaz(SOD) ve katalaz(CAT) ; nonenzimatik antioksidan olarak, albumin, koenzim Q10, ürik asit, selenyum, melatonin, glutatyon, transferrin bulunur [41,42].

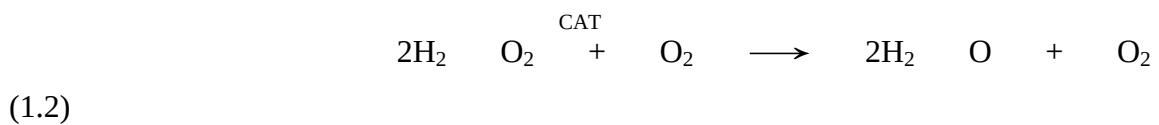
1.3.1. Süperoksit dismutaz

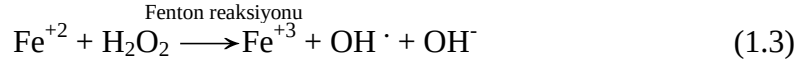
Hücreye zararlı etkileri olan reaktif oksijen türlerine karşı ilk engellemeyi Süperoksit dismutaz gerçekleştirir [43,44]. Süperoksit dismutaz enzimi antioksidan olarak görev yapar ve süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizler. Daha sonra hidrojen peroksit , katalaz yada GPx gibi enzimler aracılığıyla H_2O ve O_2 ye dönüştürülür [46]. İnsanlarda süperoksit dismutaz'ın farklı formları bulunmaktadır. Sitozolda bulunan form çinko (Zn) ve bakır (Cu) içerir. Mitokondride bulunan form mangenez (Mn) bulundurur. Son olarak Hücre dışı ortamlarda bulunan SOD formu bulunur [44,45].



1.3.2. Katalaz

Katalaz dört protein alt birimden oluşur ve her bir alt birim bir hem grubu ve bir NADPH molekülü içerir [45,46]. Katalaz enzimi SOD faaliyeti sonucu oluşan H_2O_2 ' yi H_2O ve O_2 'ye dönüştürür [47]. H_2O_2 radikal özellik göstermemesine rağmen Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşturması en reaktif oksijen türü haline gelmesine neden olabilir [48,49].





1.4. Malondialdehit

Dokuları oluşturan sağlıklı hücrelerde optimum oranda gerçekleşen lipid peroksidasyonu düzeyinin serbest oksijen radikallerinin etkisi ile yükselmesi ksenobiyotiklerin meydana getirdiği doku deformasyonun kanıtı olarak kullanılabilir. Lipid peroksidasyonu hücrel membranlarda bulunan lipid moleküllerinin, ROT veya serbest radikaller tarafından oksitlenmesi sürecidir. Bu sürecin sonucu ise malondialdehidtir [50]. Bu madde hücrede protein ve DNA gibi yapısal moleküllere zarar vererek hücrenin görevini yapmasını engelleyen sitotoksit bir maddedir [51].

Malondialdehit'in lipid peroksidasyon arasındaki oldukça güçlü bir korelasyon ilişkisi bulunmaktadır. Bu durum çapraz bağlanma ve polimerlerin oluşumunu artmasına sebep olur. Bununla birlikte hücre zarı geçirgenliği, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerinde değişikliklere neden olabilir. Serbest radikal reaksiyonları, immün sistem hücreleri arasında yer alan nötrofil, makrofaj gibi savunma mekanizmaları için önemlidir. Ancak serbest radikallerin aşırı üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanabilir [52,53].

1.5. *Galleria mellonella*

Galleria mellonella, Lepidoptera takımına ait bir türdür ve aynı zamanda holometabol bir böcek olarak bilinir. Bu tür yumurta evresi , larva evresi , pupa evresi ve ergin evre olmak üzere dört farklı evreyi içeren bir yaşam döngüsüne sahiptir [54].

G. mellonella, hızlı büyüme, yüksek doğurganlık, küçük boyutu ve kısa yaşam döngüsü gibi özelliklere sahip olması nedeniyle uygun bir deney model organizması olarak kabul edilir. Ayrıca, larvaların güçlü bağışıklık savunması, bu organizmayı memeli bağışıklık modellerine benzer kılar. Bu özellikleri sayesinde, zararlıların larvaları üzerine yapılan çalışmaların arttığı bir model organizma olarak önem kazanmaktadır [55,56].

G. mellonella'nın taksonomik durumu aşağıda gösterilmiştir:

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

Zararlı organizmanın olgun evresi, kovanın çatlaklarına ve yarıklarına yumurtalarını küme halinde bırakır. Yumurtalar; gözle görülemeyecek kadar minik boyutta, krem-beyaz tonlarında, 0,45 mm boyutunda ve 0,028 mg ağırlığındadır. Yumurtaların yaşamını sürdürebilmesi için ortam sıcaklığının 9 °C' nin altına düşmemesi gerekmektedir. Larvalar, krem renkte olup bal peteklerinde tüneller açarak beslenirler. Larva evresinin gelişimi, 15 °C'nin altında durur ve en uygun sıcaklık aralığı 29-35 °C'dir. Larvalar ilerledikçe kozalar örür ve prepupa evresine geçer. Prepupa evresinden sonra pupa evresine geçiş yaparlar. Pupa evresinden sonra ergin bireyler meydana gelir. Oluşan ergin bireyler, kahverengi-gri renkte olup dişiler 1-3 hafta, erkekler ise 2-4 hafta arasında yaşarlar. Ergin dişiler, pupa evresinin sona ermesinden sonra 4-10 gün içinde yumurtlamaya başlarlar. *G. mellonella*, ergin evresinde beslenmez ve bu nedenle arıların oluşturduğu balmumlarına zarar vermez [57,58].



Görsel 1.1. *Galleria mellonella*

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Huang vd. (2022), Sucul eklem bacaklılar türler için Flupyradifurone akut ve kronik toksisik etkileri değerlendirilmiş ve bu sonuçlar imidacloprid ile karşılaştırılmıştır. Flupyradifurone toksisite mekanizmalarını anlamak için *Cloeon dipterum*, *Gammarus pulex* ve *Asellus aquaticus* sucul artropod türleri kullanılmıştır. Çalışmada Flupyradifurone'un model organizmalar tarafından daha yavaş aldığını ve hızlıca metabolize edildiği belirtilmiştir. Bununla birlikte LC50 değerinin ise imidacloprid'e göre 37 kat yüksek olduğu ortaya konmuştur [59].

Dere vd. (2015), Azadiraktin(AZA) etkisi altındaki Bal mumu güvesi üzerindeki bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 1.5, 2 ve 3 µg/larva) yapılan dozlama sonucunda, 3 µg/larva dozu dışındaki denenen dozlarda, uygulamadan bir ve 3 gün sonunda süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde bir azalma tespit edilmiştir [60].

Dere vd. (2015), *G. mellonella* larvalarının beslenme işleminden 24 saat sonra, Azadiraktin ile beslenen larvaların 1- 2 µg/larva dozlarında katalaz enzim aktivitesinde belirgin bir düşüş tespit edilmiştir. Fakat, üç günlük bir süre sonrasında, Azadiraktin içermeyen besinle beslenen grupla karşılaştırıldığında, 0.5 µg/larva dozu haricindeki tüm dozlarda katalaz enzim aktivitesinde artma gözlemlenmiştir [61].

Sugeçti, S. (2021), *Escherichia coli* bakterilerinin oksidatif etkilerinin model organizma *G. mellonella* üzerinde gösterilmesi amaçlanmış olup, aspartat transferaz, alanin transferaz ve laktat dehidrogenaz'ın hücre hasar göstergesi olarak *E.coli* enfeksiyonundan 8 saat sonra arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada *E. coli* enfeksiyonu sonrasında enzimatik olmayan antioksidanlar olan ürik asit, bilirubin ve albumin miktarları artarken, toplam protein miktarı etkilenmediği ortaya konmuştur. Ortaya çıkan oksidatif stresin kaynağının *E.coli* olduğu belirtilmiştir [62].

Wang vd. (2020), Flupyradifurone direncinin incelendiği çalışmada, *Bemisia tabaci*'nin laboratuvar koşullarında 24 jenerasyon boyunca Flupyradifurone ile beslenmiş ve bu türde dirençli bireyler elde edilmiştir. Yapılan çalışmada, dirençli bireylerin LC50 değeri, direnç geliştirmemiş bireylere göre 105.56 kat daha yüksek çıkmıştır. Metabolik enzim testleri, Flupyradifurone'a karşı gelişen direncin, glutatyon S-transferaz (GST) ve P450 monooksijenaz aracılığıyla detoksifikasyon sürecinde artış göstermiş olabileceğini öne sürmüştür. Bahsedilen enzim aktivitelerinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir [63].

Wu vd. (2021), Flupyradifurone etkisi altındaki arıların hareket ve davranış özellikleri incelenmiştir. Sonuç olarak 4 ppm Flupyradifurone ve sükroz ile beslenen

arılardan besin alma istekleri azalmıştır. Bundan dolayı %16 daha az nektar tüketmiştir. Bununla birlikte, arıların davranış özelliklerinde önemli bir değişim olmamıştır. Yapılan çalışmada ayrıca, insektisitlerin gen ekspresyonunu da önemli ölçüde değiştirdiği ve bu değişikliklerin bazılarının koku alma öğrenme eksiklikleriyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [64].

Harwood vd. (2022), Flupyradifurone ve klotianidin bal arılarındaki viral enfeksiyona karşı mücadele yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmada, Flupyradifurone'un yüksek ölümlere neden olduğu ancak virüs kaynaklı ölümleri artırmadığı tespit edilmiştir [65].

Scheibli vd. (2023), Yararlı eklem bacaklı *Chrysoperla carnea* larvaları üzerinde Flupyradifurone'un lethal ve subletal etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından ağız yoluyla alınan farklı dozlardaki Flupyradifurone'un bireylerin hareket ve uçuş performansı üzerine olan etkileri ile ölüm oranına bakılmıştır. Sonuç olarak, Flupyradifurone larvaların yaşam süresini etkilemiş olup söz konusu pestisit böcek faunası ve çevre için büyük bir tehdit oluşturabileceği belirtilmiştir [66].

Ahmed vd. (2020), Flupyradifurone'un sivrisinekler üzerine *Culex quinquefasciatus* kontrol stratejileri araştırılmıştır. Çalışmada birçok insektisit kullanılmış olup aynı zamanda insektisitlerin sinerjik etkilerine de bakılmıştır. Flupyradifurone, test edilen pestisitler arasında en yüksek etkinliği göstermiş olup Piperonyl butoxide, chlordimeform ve amitrazin ile birlikte verildiğinde toksik etkileri artmıştır. Flupyradifurone'un gelecekteki sivrisinek kontrol programlarında umut verici bir bileşen olduğu belirtilmiştir [67].

Hesselbach vd. (2018), Flupyradifurone'un polen ve nektar toplayan bal arılarının tat ve öğrenme performansını azaltabileceği belirtilmiştir. Bu durumun sadece en yüksek konsantrasyonda gerçekleştiği vurgulanmıştır. Doğal ortamlarda büyük olasılıkla bal arılarının bu yüksek konsantrasyonlara maruz kalmayacakları belirtilmiş olup pestisit uygun kullanımın incelenen davranışlar açısından bal arıları için kabul edilebilir seviyede olduğu belirtilmiştir [68].

Çakır vd. (2023), *G. mellonella* son evre larvalarına değişik konsantrasyonlarda (0.25-32 mg ml⁻¹) verilen Zebularin(ZEB)'in antioksidan enzim aktivitesine ve lipid peroksidasyonuna etkileri analiz edilmiştir. ZEB enjeksiyonu, sonrasında *G. mellonella* larvalarında katalaz ve glutatyon S-transferaz aktivitelerinde kontrol grubuna oranla bir değişiklik belirlenmediği bununla birlikte süperoksit dismutaz aktivitesinde 1 ppm ve üstü

dozlarda enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit miktarında 16 ppm ve üstü dozda artış belirlenmiştir [69].

Kazek vd. (2020), *Conidiobolus coronatus* enfeksiyonu'nun büyük bal mumu güvesi *G. mellonella*'da bağışıklık sistemi, oksidatif stres süreçleri ve otofaji üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar, Mantar enfeksiyonunun, larvanın bağışıklık hücrelerindeki hücre iskeletinin bozulmasına ve oksidatif savunma süreçlerinin artmasına neden olduğu bulunmuştur. Hemositlerde lipid peroksidasyonu ve otofajinin de indüklendiği gözlenmiştir. Bulgularımız *G. mellonella*'nın bağışıklık mekanizmalarını araştırmak için ideal bir model olduğunu göstermiştir [70].

Fekry vd. (2023), Endofit mantarların *G. mellonella*'nın fizyolojik tepkileri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla olup, Bazı parametrelerin analizlerinde *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger* filtratından etkilendiği kaydedilmiştir. Mantar suşları ile muamele edilen *G. mellonella* larvalarının aspartat amino transferaz(GOT) aktivitesinde gözle görülür bir azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. *A. nidulans*'ın sublethal konsantrasyonları 3. günde Asit fosfataz(ACP) enzim aktivitesinde en yüksek artışı meydana getirdiği tespit edilmiş. *A. niger*, Alkelen fosfataz(ALP) aktivitelerinin kademeli olarak artmasına neden olduğu bildirilmiştir [71].

Doğan vd. (2023), *Agrimonia eupatoria* L.'nin toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriğinin antioksidan özellikleriyle ilişkilendirilmesi ve bazı mineral elementlerin (Na, K, Ca, Mg, P) belirlenmesi amaçlanmıştır Ekstraktın antioksidan kapasitesi test edilmiştir ve sonuçlara göre; *A. eupatoria*'nın antioksidan içeriği yüksek bulunduğu belirtilmiştir.. Aynı zamanda *A. eupatoria*'nın toksik etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla, *G. mellonella*'nın larva evresi model organizması olarak seçilmiştir. Toksik etkileri araştırmak amacıyla oksidatif stres parametreleri (SOD, CAT, GST, GPx, MDA) ve asetilkolin esteraz(AChE) aktivitesi ölçülmüş ve 24, 48 ve 72. saatte uygulanan dozlarda ise herhangi bir zararlı etki gözlemlenmediği bildirilmiştir [72].

Erbaş vd. (2021), Önemli bir fitokimyasal bileşik olan juglonun neden olduğu oksidatif stres değişiklikleri *G. mellonella* larvalarında araştırılmıştır. Juglona maruz bırakılan son evre *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT ve GST) ve Malondialdehit düzeyi, kontrol larvalarıyla karşılaştırıldığında doza bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir. Ancak juglon uygulanan ve uygulanmayan larvalarda, glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde herhangi bir değişiklik

tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, juglonun model ve zararlı böcek *G. mellonella* için toksik olduğu sonucu bildirilmiştir [73].

Rehab vd. (2021), Bahçe tuzu (*Lepidium sativum*) tohumlarının metanol ekstraktının Büyük bal mum güvesine toksisitesi ve biyokimyasal etkisi laboratuvar koşullarında değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar, bahçe tuzu özütünün *G. mellonella*'nın 5. evre larvaları üzerindeki toksik etkisinin 24 saat sonra %1.15 (LC50) olduğunu ortaya çıkardığı bildirilmiştir. Bu durumun kutikula tabakalarında, yağ dokularında ve kaslarda daha fazla histopatolojik değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir [74].

Xu vd. (2021), Çinko oksit nanoparçacıklarının (ZnO-NPs) in vivo antifungal aktivitesi konusunda değerlendirmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın bir diğer amacı da, *G. mellonella* omurgasızında *Candida albicans*'ı kontrol etme etkinliğini ve mekanizmasını incelenmesidir. Sonuç olarak ZnO-NP araştırması hemosit yoğunluğunun artışı göstermediği, Hemosit agregasyonunu teşvik ettiğini, hemosit fagositosisini güçlendirdiğini ve larvalarda peroksidaz(PO) aktivitesini aktive ettiği bildirilmiştir [75].

Eskin vd. (2022), Çinko Oksit Nanoparçacıklarının farklı dozları (100, 500, 1000, 3000 ve 5000 ppm), Büyük Mum Güvesi *G. mellonella*'nın (Lepidoptera: Pyralidae) toplam hemosit sayısı ve hemosit bağışıklık tepkileri üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. NP'lerin 1000, 3000 ve 5000 ppm dozlarında hemosit sayısında bir azalmaya neden olduğunu belirtilmiştir [76].

Tuncsoy vd. (2021), Model organizma *G. mellonella* larvalarında Titanyum dioksit nanopatiküllerinin (TiO₂ NPs) antioksidan savunma sistemi üzerindeki toksik etkilerini belirlemek için katalaz, süperoksit dismutaz , glutatyon peroksidaz ve glutatyon-s-transferaz T enzim aktivitelerine, nörotoksik etkilerini belirlemek için AChE aktivitesine ve bağışıklık sistemine olan etkilerini belirlemek için toplam hemosit sayısına (THC) odaklanıldığı belirtilmiştir. Çalışmalar sonucunda Titanyumun (Ti) büyük miktarlarının Malpighian tüpler aracılığıyla elimine edildiği belirlenmiştir. Ayrıca, *G. mellonella*'da farklı konsantrasyonlardaki TiO₂ NPs, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olduğu ve antioksidan enzimlerde bir artışa yol açtığı bulunmuştur [77].

Liao vd. (2021), Entomopatojen bakterilerin *G. mellonella* larvalarında Süperoksit dismutaz, Peroksidaz ve katalaz aktiviteleri ile orta bağırsak dokularının morfolojisi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak, entomopatojen bakteri *Enterobacter cloacae*'den alınan böcek öldürücü proteinler enjekte edildiğinde, üç enzimin aktivitelerinin başlangıçta bir şekilde arttığı ve ardından azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca,

mikroskopi analizi, konak orta bağırsak dokusunun böcek öldürücü proteinleri alındıktan sonra dokuların, hücrelerin ve organellerin tümünün yapısının bozulduğu belirtilmiştir [78].

Ercan vd. (2022), *Ecballium. elaterium* (L.) A. Rich. (Cucurbitaceae) meyve özütü, iyi bir model organizma olarak bilinen *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları üzerindeki toksik etkisi belirlenmiş ve antioksidan enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisi ortaya konulmuştur. Meyve özütü konsantrasyonunun artmasıyla SOD, CAT, GST, GPx, GR ve AChE aktivitelerinde azalmaya ve MDA seviyelerinde artışa neden olduğu belirtilmiştir [79].



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *Galleria mellonella*'nın geliştirilmesi

Yapılan araştırmada *G. mellonella* böcek kültürünün yetiştirilmesinde karanlık ortamda 30 ± 2 °C ve % 60 $\pm$ 5 bağıl nem şartlarında Bronskill [80] tarafından geliştirilen yapay besin kullanıldı.

Son evredeki larvalar, 15 dakika süresince buz üzerine tutuldu. Süre sonunda hareket kabiliyeti azalan son evre larvalara Flupyradifurone'un farklı konsantrasyonları (10, 25, 50, 75 ve 100 µg/ml) hamilton enjektörü yardımı ile 10 µl enjekte edildi. Enjeksiyon larvaların son bölümündeki bacağın kaidesine yapıldı. Her bir doz için beş tekrar yapıldı. Böcekler, belirli periyotlarda (4 ve 24 saat) alınıp ağırlık ölçümleri yapılarak -80 °C'de biyokimyasal analizleri yapılana kadar bekletildi.

Flupyradifurone'un farklı konsantrasyonlarının uygulandığı larvalar karbonhidrat, lipit, protein miktarı tayini, enzim ve malondialdehit analizleri çalışılmak üzere hazırlandı.

3.1.2. Böceklerin homejenizasyonu

Analiz işlemleri için *G. mellonella* -80 °C'de depolanan bireyleri kullanıldı. Üzerlerine melanizasyonu önlemek için birkaç fenil tioüre kristali eklendikten sonra 1'e 5 oranında homojenize edildi. İşlem sırasında ultra turrax ile 24,000 devir/dak hızında 2 dakika boyunca parçalama işlemi gerçekleştirildi. Her 5 parçalamada ultra turrax bistle su ile temizlendi. Homojenizasyon tamamlandıktan sonra tüpler 10,000 devir/dak hızında 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Tüplerde oluşan süpernatantlar analiz işlemleri için kullanıldı.



Görsel 3.1. *Böcek homojenizasyonu*

3.1.3. Protein miktarı tayini

Protein miktarının belirlenmesinde, Lowry ve arkadaşlarının [81] geliştirdiği yöntem kullanılmıştır. Protein miktarını saptamak için, standart olarak Sığır Serum Albumin çözeltisi kullanıldı.

Protein düzeyi tayini için standart eğrisi oluşturuldu. Standart eğrisi için %1'lik bovine serum albumin çözeltisinden seyreltme yöntemi ile 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 μ /ml bovine serum albumin içeren çözeltiler hazırlandı. Protein miktarlarının tespiti için örnek sayısı kadar tüp alındı ve her biri numaralandırıldı.

Örnekler protein miktarını belirlemek amacıyla alınmıştır. Bu örnekler, homojenizatör kullanılarak bire beş oranında fosfat tamponu (pH 7.4) ile karıştırılıp homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi sonrasında tüpler, 10000 devir/dakika hızında 30 dakika boyunca santrifüjde bekletildi.

Tüplerde meydana gelen süpernatanttan 0.3 ml örnek alındı. Bu örneğe çözelti C eklenerek karışım, 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve sonrasında 0.3 ml Folin-ciocalteu ayırıcı eklenmiştir. Bu aşamadan sonra, 750 nm dalga boyunda absorban değerleri ölçülmüştür.

Serum albümin (Sigma; A2153) kullanılarak standart değerler belirlenmiştir. Toplam protein miktarı, Lowry ve ark. tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak tespit edilmiştir [81].



Görsel 3.2. *Protein miktarının spektrofotometrede ölçülmesi*

3.1.4. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde Aebi tarafından geliştirilen metod [82] kullanıldı.

CAT tayini için biri örnek diğeri kör olmak üzere iki küvet alındı. Örnek küvetine 2.8 ml 30 mM H_2O_2 ve 0.2 ml örnek eklendi. Kör küvetine 2.8 ml H_2O_2 ve 0.2 ml 50 mM fosfat tamponu eklendi. Küvetler sırası ile 2 sn karıştırılıp spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda okundu. Sıfırıncı saniye, otuzuncu saniye ve altmışıncı saniyedeki absorbans değerleri kayıt edildi.

Kör : 2.8 ml H_2O_2 + 0.2 ml fosfat tamponu

Örnek: 2.8 ml H_2O_2 + 0.2 ml örnek

3.1.5. Malondialdehit aktivitesinin belirlenmesi

MDA aktivitesinin belirlenmesinde Barr-Or vd. [83] metodu kullanılmıştır.

Beş gram trikloroasetik asit(TCA) tartıldı ve üzerine bidistile su eklenerek hacmi 25 ml olacak şekilde tamamlandı. Böylece %20'lik TCA çözeltisi hazırlanmış oldu benzer bir şekilde %0.8' lik tiyobarbitürik asit çözeltisi hazırlandı bunun için 8 gram tiyobarbitürik asit (TBA) tartıldı, üzerine bidistile su eklenerek son hacmi 1000 ml olacak şekilde tamamlandı. Böylece deneyde kullanılacak çözeltiler hazırlanmış oldu.

Homojenizasyon sonucu oluşturulan çözeltilerden 0.25 ml örnek alındı ve üzerine 0.125 ml TCA eklenerek vortex ile homojen bir şekilde karıştırılarak malondialdehit tayini için hazırlandı. Elde edilen örnek, +4°C sıcaklıkta 15000 devir/dakika hızında 10 dakika

boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp tüplere aktarıldı, sonrasında üzerlerine 0.2 ml TBA eklenip ağızları tıpa ile kapatıldı. Bu karışım iyice homojenleştirildi ve 90°C'de bir saat boyunca benmari içinde bekletildi. Daha sonra spektrofotometrede 535 nanometre dalga boyunda absorban değerleri kayıt edildi.

3.1.6. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

SOD aktivitesinin belirlenmesinde Sun vd. tarafından geliştirilen yöntem [84] kullanılmıştır

Çözeltiler bir dizi titiz hazırlık adımından sonra oluşturuldu. İlk olarak, 0.6mM Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA) çözeltisi hazırlandı. EDTA'nın 11.15 ml'si tartıldı ve son hacmi 50 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. Ardından, Reaktif Çözelti oluşturuldu. Bu çözelti için, 9 ml albümin çözeltisi, 30 ml Nitroblue Tetrazolium(NBT) çözeltisi, 30 ml EDTA çözeltisi, 18 ml sodyum karbonat çözeltisi ve 60 ml ksantin çözeltisi karıştırılarak hazırlandı. Diğer çözeltiler ise şu şekilde hazırlandı: 150 µg/l NBT, 0.3 mM Ksantin, 1g/l Bovine Serum Albumin (BSA), 2M (NH₄)₂SO₄ Çözeltisi, 1N Sodium Hydroxide (NaOH), 0.8 mM CuCl₂.2H₂O Çözeltisi, 400mM Na₂CO₃ (Sodyum Karbonat) Çözeltisi ve Xanthine Oxidase (5U/l). Her bir çözelti, belirtilen miktarlarda tartılarak ve belirtilen son hacimlere tamamlanarak hazırlandı. Bu adımlar, analizlerin doğruluğunu sağlamak için özenle gerçekleştirildi.

Kullanılacak çözeltiler oluşturulduktan sonra SOD tayini için her bir örnekte kullanılacak şekilde biri kör diğeri numune olmak üzere 2 tüp alındı. Hazırlanan 1.425 ml reaktif karışımı iki tüpede eklendi. Daha sonra numune için hazırlanan tüpe tayini yapılacak enzim çözeltisinden 0.05 ml eklendi. Sonrasında kör ve numune tüpüne 0.025 ml ksantin oksitaz çözeltisi eklendi. 1-2 sn karıştırılıp 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Her iki tüpe 0.05 ml bakır klorür eklenerek reaksiyon durduruldu. Son olarak kör tüpüne tayini yapılacak enzim çözeltisinden 0.05 ml eklenerek tepkime durduruldu. Bütün örneklerin absorban değerleri 560 nm dalga boyunda okundu.

3.1.7. Karbonhidrat miktarı tayini

Karbohidrat miktarının analizi için Van Handel'in (1985a) yöntemi kullanıldı [85].

Karbonhidrat miktarının analizine yönelik başlangıçta stok çözeltisi hazırlandı ve daha sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300 ve 350

$\mu\text{g/ml}$) glikoz standart çözeltileri elde edildi. Numunelerin absorbens değerleri spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda ölçülerek standart regresyon doğrusu çizildi.

Homojenizasyon işlemi için -80°C 'de saklanan *G.mellonella* larvaları kullanıldı. Larvaların buzlu çözüldükten sonra birkaç fenilthioure kristali eklendi ve üzerine 2ml sodyum sülfat eklenerek 24000 devir/dk olacak şekilde 10 dakika homojenizasyon gerçekleştirildi. Karbohidrat miktarının belirlenmesi için elde edilen süpernatantlardan 200 μl örnek alındı ve örnekler, kloroform/metanol çözeltisinin tamamen buharlaşması için 90°C 'deki su banyosunda bekletildi. Ardından, içlerine 1 ml antron çözeltisi ilave edilerek tekrar ısıtıldı ve buzdolabında soğutuldu. Son olarak, tüplerdeki örneklerin absorbens değerleri spektrofotometrede ölçüldü.

Elde edilen veriler, regresyon denkleminde kullanılarak örneklerin içindeki toplam karbohidrat miktarı mg cinsinden belirlendi. Daha sonra yapılan hesaplamalar ile 100 mg larvadaki miktar mg cinsinden hesaplandı. Deneyler en az 5 kez tekrar edilmiştir.

3.1.8. Lipit miktarı tayini

Lipit miktarının belirlenmesi için Van Handel'in (1985b) yöntemini kullanarak stoklanmış örnekler alındı [86]. Bu yöntem üzerinde bazı modifikasyonlar yapılmıştır.

Çözeltiler laboratuvar ortamında titizlikle hazırlandı. İlk olarak, %2 sodyum sülfat çözeltisi oluşturuldu. Bu çözelti için 2 gram Na_2SO_4 tartıldı ve daha sonra saf su eklenerek toplam hacim 100 ml hacme tamamlandı. Ardından, vanilin-fosforik asit çözeltisi hazırlandı. Bunun için ise, 600 mg vanilin sıcak suda çözüldü ve bu çözeltiye 400 ml %85'lik fosforik asit ilave edildi. Elde edilen karışım, karanlık bir ortamda saklandı. Üçüncü olarak, konsantre sülfürik asit (%95-97) kullanıldı.

Son olarak, bir birim kloroform ve iki birim metanol içeren çözelti hazırlandı. Bir erlen içerisinde homojen olacak şekilde toplam hacim 600 ml olacak şekilde çözelti elde edildi ve deney için kullanıma hazır hale getirildi. Bu dikkatlice hazırlanan çözeltiler, deneylerin başarılı bir şekilde yürütülmesini sağlamak amacıyla titizlikle oluşturuldu.

Lipit miktarının analizi için lipit standart grafiği oluşturuldu. Bunun için, %0.1'lik mısır yağından standart çözelti hazırlandı ve konsantrasyonu 1 mg/ml olarak ayarlandı. Kloroform/metanol (1/2) çözeltisi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70 mg/ml) seri seyreltmeler yapıldı. Hazırlanan çözeltilerden elde edilen absorbens değerleri kullanılarak regresyon eğrisi çizildi.

Örneklerin lipit miktarlarının analizi için santrifüj sonucu oluşan süpernatantlardan 200 μl örnek alındı ve cam tüplere eklenerek sıvı kısmın buharlaşması sağlandı üzerine

sırasıyla 40 µl konsantre sülfürik asit ve 960 µl vanilin-fosforik asit reaktifi eklendi, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

Süre sonunda renk oluşumu gözlemlendi ve tüplerin absorbanans değerleri spektrofotometrede 525 nm dalga boyunda ölçüldü. Yapılan hesaplamalar sonrasında lipit miktarı tayin edildi. Lipit miktarı 100 mg larvadaki miktar mg cinsinden hesaplandı. Deneyler en az 5 kez tekrar edilmiştir.



4. BULGULAR

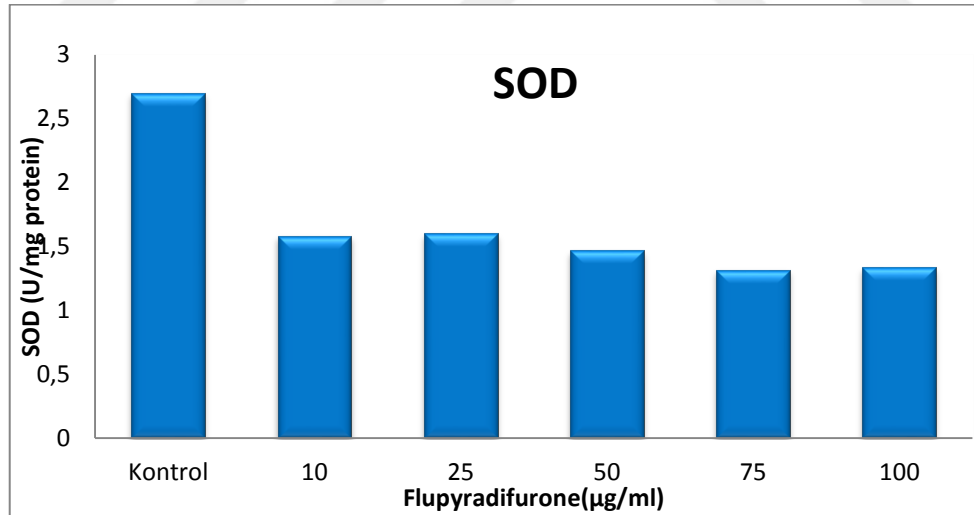
Flupyradifurone'un farklı konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarında süperoksit dismutaz, katalaz aktiviteleri ve malondialdehit miktarına 4 saat sonundaki etkisi tablo 4.1, 24 saat sonundaki etkisi tablo 4.2 de gösterilmiştir. Flupyradifurone'un farklı konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarında karbonhidrat, lipit ve protein miktarlarına 4 saat sonundaki etkisi tablo 4.3, 24 saat sonundaki etkisi tablo 4.4 de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında süperoksit dismutaz, katalaz aktiviteleri ve malondialdehit miktarına 4 saat sonundaki etkisi

Flupyradifurone (µg/ml)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
0.00*	2.70±0.10 a	6.47±0.28 a	23.19±0.55 a
10.00	1.58±0.09 b	6.04±0.16 a	32.64±0.81 b
25.00	1.60±0.14 b	6.42±0.14 a	78.27±2.90 c
50.00	1.47±0.10 b	6.49±0.40 a	77.85±2.34 c
75.00	1.31±0.22 b	6.22±0.29 a	79.24±1.09 c
100.00	1.33±0.12 b	6.83±0.18 a	159.25±3.23 d

* : Kontrol

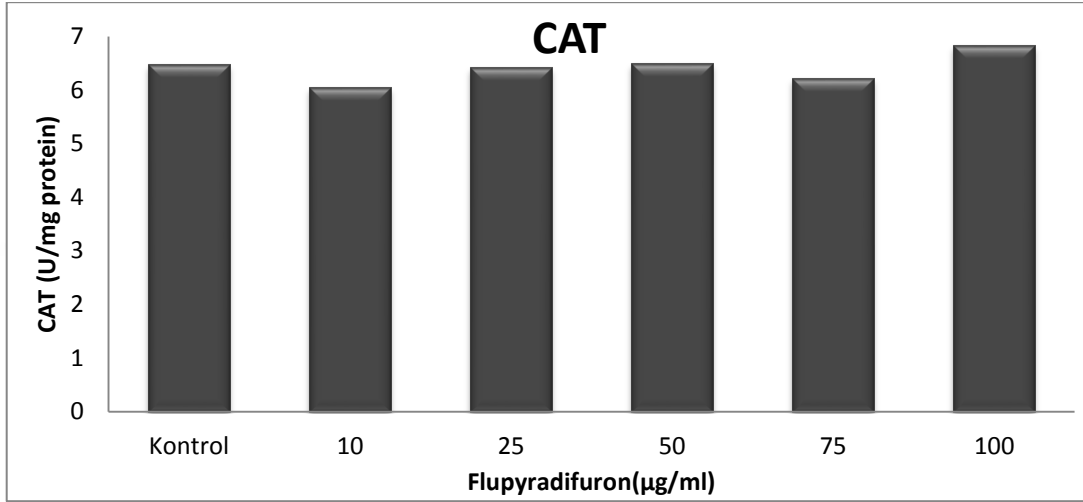
SNK: a, b, c, d harfleri konsantrasyonlar arasındaki farkı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Aynı harfi içeren veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayırım vardır.



Şekil 4.1. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine 4 saat sonundaki etkisi

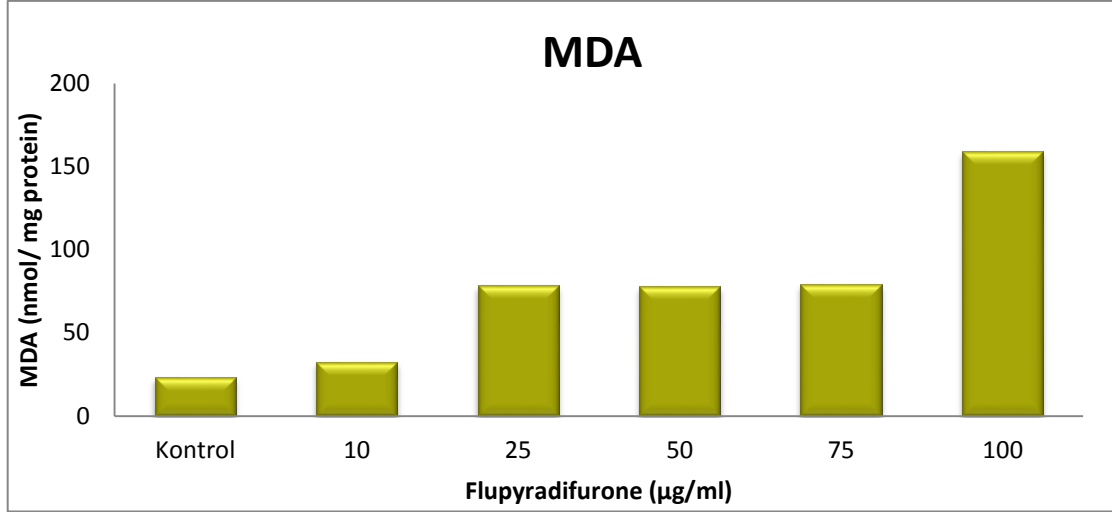
SOD aktivitesi için Flupyradifurone uygulanan tüm dozlarında, aralarında istatistiki olarak fark yoktur. Kontrol grubunda 2.70, 10 µg/ml 'de 1.58, 25 µg/ml 'de 1.60, 50 µg/ml 'de 1.47, 75 µg/ml 'de 1.31 ve 100 µg/ml 'de 1.33 olarak hesaplanmıştır.

Uygulanan tüm dozlar(10, 25, 50, 75, 100 µg/ml) kontrol grubuna göre SOD aktivitesini azaltmıştır. SOD aktivitesinin en ciddi azalış gösterdiği değerler 75 ve 100 µg/ml flupyradifurone değerlerinde olmuştur. 75 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda SOD aktivitesi 1.31, 100 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda SOD aktivitesi 1.33 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında Katalaz aktivitesi üzerine 4 saat sonundaki etkisi

CAT aktivitesi için Flupyradifurone uygulanan tüm dozlarında ve kontrol grubu ile aralarında istatistiki olarak fark yoktur. 10 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda CAT aktivitesi 6.04, 25 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda CAT aktivitesi 6.42, 50 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda CAT aktivitesi 6.49, 75 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda CAT aktivitesi 6.22, 100 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda CAT aktivitesi 6.83 bulunmuştur.



Şekil 4.2. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında Malondialdehit miktarı üzerine 4 saat sonundaki etkisi

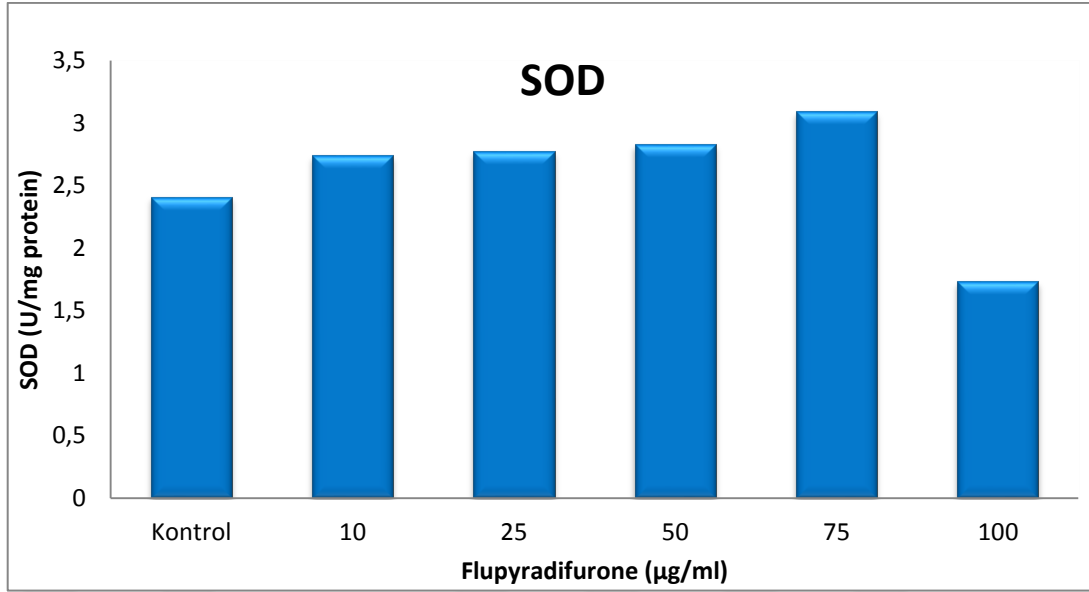
MDA miktarı 4 saatin sonunda uygulanan tüm dozlarda kontrol grubuna göre artış göstermiştir. MDA miktarının en çok arttığı değer 100 µg/ml flupyradifuron uygulanan grupta ortaya çıkmıştır. 25, 50 ve 75 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda MDA miktarı sırasıyla 78.27, 77.85, 79.24 olarak birbirine yakın sonuçlar bulunmuştur. 100 µg/ml flupyradifuron uygulanan dozda MDA miktarı ise 159.25 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.2. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında süperoksit dismutaz, katalaz aktiviteleri ve malondialdehit miktarına 24 saat sonundaki etkisi

Flupyradifurone (µg/ml)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
0.00*	2.41±0.07 c	5.71±0.06 a	25.71±0.90 a
10.00	2.74±0.15 b	6.10±0.15 a	179.96±3.83 b
25.00	2.77±0.05 b	6.28±0.14 a	187.06±3.18 b
50.00	2.82±0.09 b	5.47±0.23 a	193.15±2.39 b
75.00	3.09±0.48 a	6.25±0.29 a	190.78±2.85 b
100.00	1.73±0.03 d	5.69±0.32 a	337.47±9.75 c

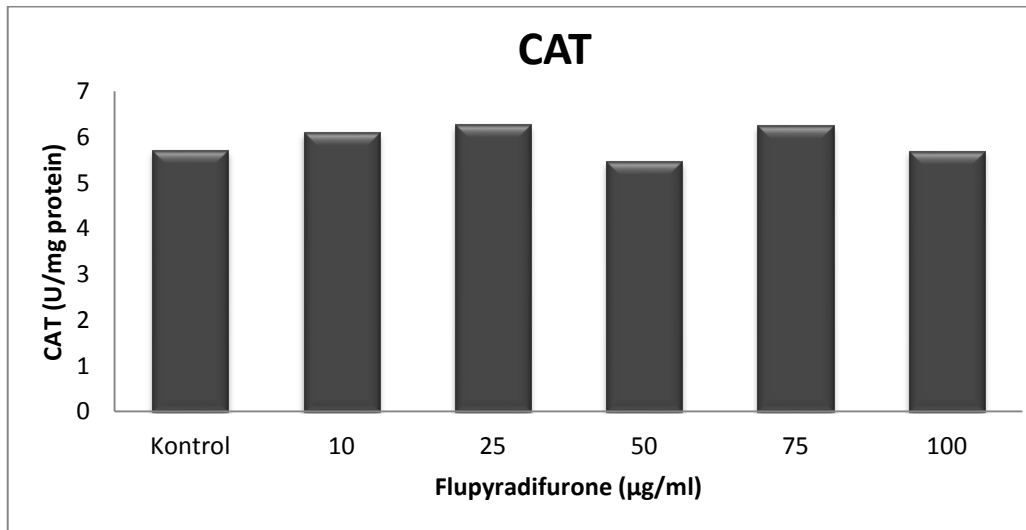
* : Kontrol

SNK: a, b, c, d harfleri konsantrasyonlar arasındaki farkı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Aynı harfi içeren veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayırım vardır.



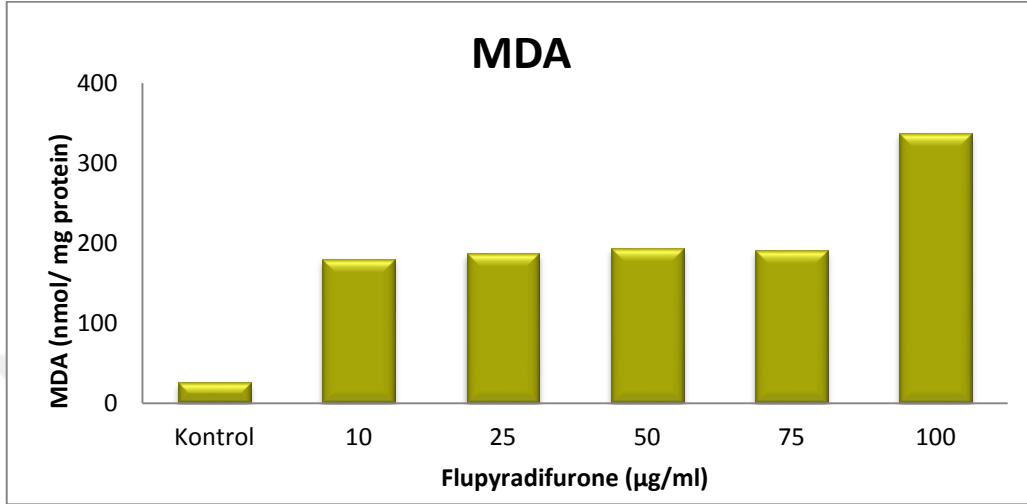
Şekil 4.3. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine 24 saat sonundaki etkisi

SOD aktivitesi için Flupyradifurone uygulanan 10, 25, 50, 75 µg/ml gruplarında SOD aktivitesi kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Sadece 100 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda SOD aktivitesi kontrol grubuna göre azalış göstermiştir. Uygulanan 10, 25 ve 50 µg/ml dozlarının aralarında istatistiki olarak bir fark bulunmamaktadır. 75 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda SOD aktivitesi en yüksek değer olan 3.09 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında Katalaz aktivitesi üzerine 24 saat sonundaki etkisi

CAT aktivitesi için Flupyradifurone uygulanan tüm dozlarında ve kontrol grubu ile aralarında istatistiki olarak fark yoktur. 10µg/ml uygulanan dozda 6.10, 25µg/ml’de 6.28 50µg/ml’de 5.47, 75µg/ml’de 6.25, 100µg/ml’de ise 5.69 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.6. Flupyradifurone’un *G. mellonella* larvalarında Malondialdehit miktarı üzerine 24 saat sonundaki etkisi

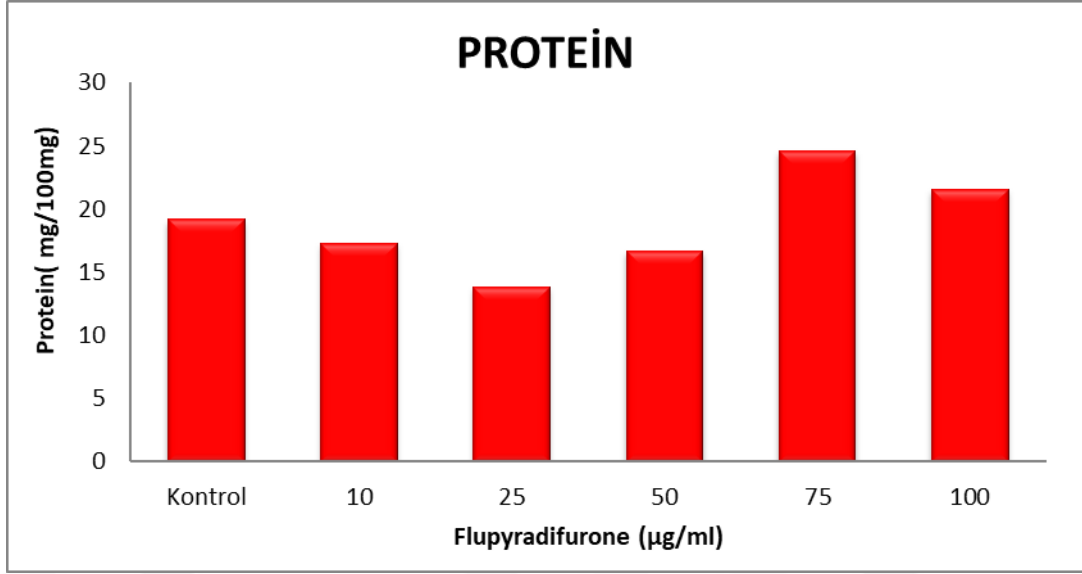
MDA miktarı 24 saatin sonunda uygulanan tüm dozlarda kontrol grubuna göre artış göstermiştir. MDA miktarının en çok arttığı değer 100 µg/ml flupyradifurone uygulanan grupta ortaya çıkmıştır. flupyradifurone uygulanan 10, 25, 50, 75 µg/ml dozlarının aralarında istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır. 100 µg/ml flupyradifurone uygulanan grupta ise MDA mikrarı 337.47 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.3. Flupyradifurone’un *G. mellonella* larvalarında protein, karbohidrat ve lipit miktarına 4 saat sonundaki etkisi

Flupyradifurone (µg/ml)	Protein mg	Karbohidrat mg	Lipit Mg
0.00*	19.14±0.44 b	6.59±0.19 a	4.39±0.08 a
10.00	17.30±0.40 c	6.54±0.13 a	1.89±0.06 c
25.00	13.83±0.48 d	5.84±0.21 b	3.11±0.19 b
50.00	16.66±0.49 c	5.88±0.12 b	3.17±0.14 b
75.00	24.61±0.53 a	5.01±0.24 c	2.89±0.07 b
100.00	21.55±0.37 a	4.86±0.16 c	2.87±0.29 b

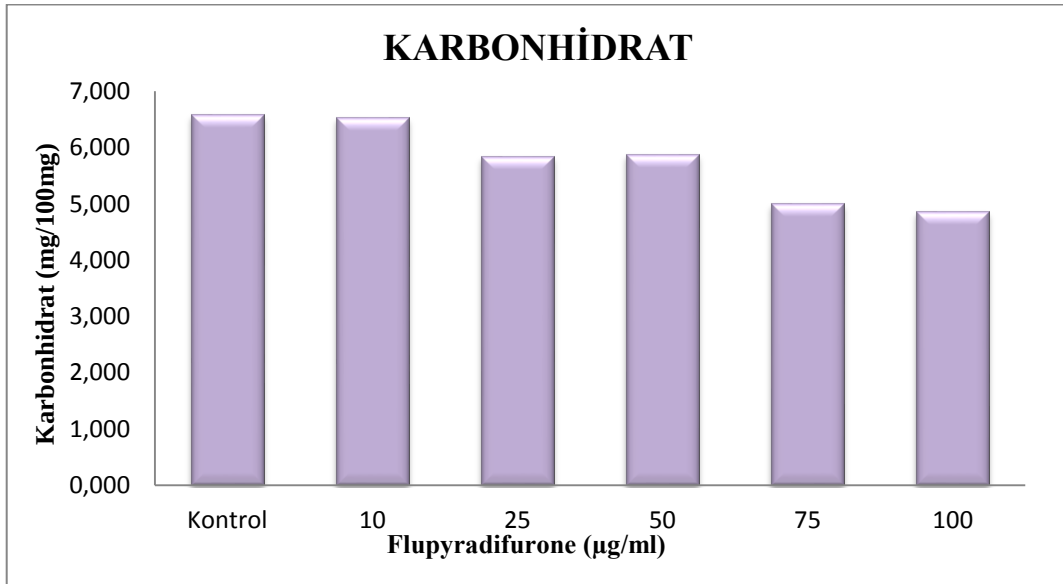
* : Kontrol

SNK: a, b, c, d harfleri konsantrasyonlar arasındaki farkı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Aynı harfi içeren veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayırım vardır.



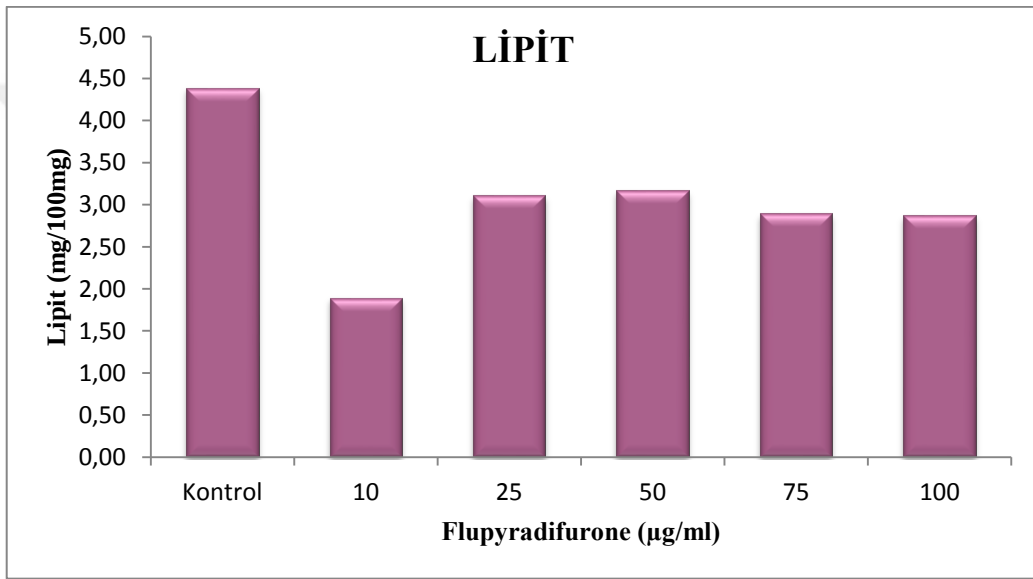
Şekil 4.5. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında protein miktarı üzerine 4 saat sonundaki etkisi

Flupyradifurone uygulanan larvaların protein miktarları incelendiğinde kontrol grubunda protein miktarı 19.14 olarak tespit edilmiştir. 4. saatte 25 µg/ml flupyradifurone uygulanan *G. mellonella* larvalarında protein miktarları 13.83 olarak hesaplanmış ve kontrol grubuna göre ciddi azalış göstermiştir. Uygulanan 75 ve 100 µg/ml flupyradifurone değerlerinde ise aralarında istatistiksel anlamda bir fark bulunmamakla beraber kontrol grubuna göre protein miktarında artış yaşanmıştır.



Şekil 4.6. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında karbonhidrat miktarı üzerine 4 saat sonundaki etkisi

Flupyradifurone uygulanan larvaların karbohidrat miktarları incelendiğinde, 4. saatte 10 µg flupyradifurone *G. mellonella* larvalarının karbohidrat miktarlarında kontrol grubuna göre (6.59 mg) istatistiksel olarak herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmektedir. Diğer flupyradifurone dozlarının ise larvaların karbohidrat miktarlarında gerek kontrol gerekse de 10 µg flupyradifurone uygulanan larvalara göre önemli ölçüde azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. 75 ve 100 µg flupyradifurone uygulanan larvaların karbohidrat miktarları denenen diğer dozlara ve kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalarak sırasıyla 5.01 ve 4.86 mg olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında lipit miktarı üzerine 4 saat sonundaki etkisi

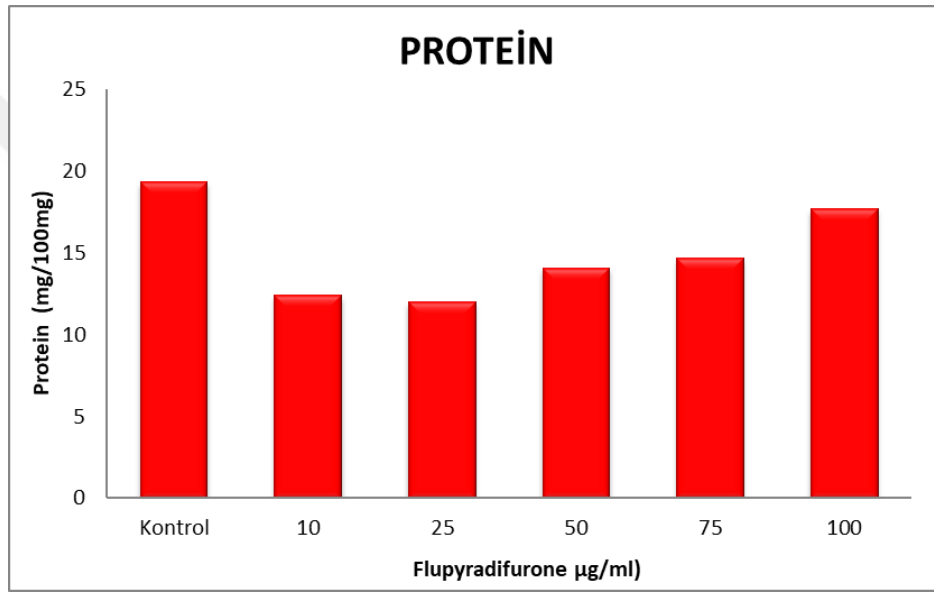
Flupyradifurone uygulanan larvaların 4. saatteki lipid miktarı kontrol grubunda 4.39 mg olarak belirlenmiştir. Flupyradifurone uygulanan larvalarda ise tüm dozlarda lipid miktarlarını önemli ölçüde azalmıştır. Flupyradifurone uygulanan 25, 50, 75 ve 100 µg/ml grupların arasında istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır. 10 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozda ise lipit miktarı ciddi şekilde azalmıştır.

Tablo 4.4. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında protein, karbohidrat ve lipit miktarına 24 saat sonundaki etkisi

Flupyradifurone (µg/ml)	Protein mg	Karbohidrat mg	Lipit mg
0.00*	19.31±0.31 a	6.90±0.11 a	3.47±0.12 a
10.00	12.40±0.37 d	5.66±0.19 b	1.92±0.06 bc
25.00	11.99±0.26 d	5.55±0.18 b	2.16±0.10 b
50.00	14.09±0.31 c	5.86±0.17 b	1.51±0.06 d
75.00	14.66±0.68 c	4.87±0.010 c	1.66±0.12 cd
100.00	17.67±0.55 b	3.76±0.12 d	1.09±0.07 e

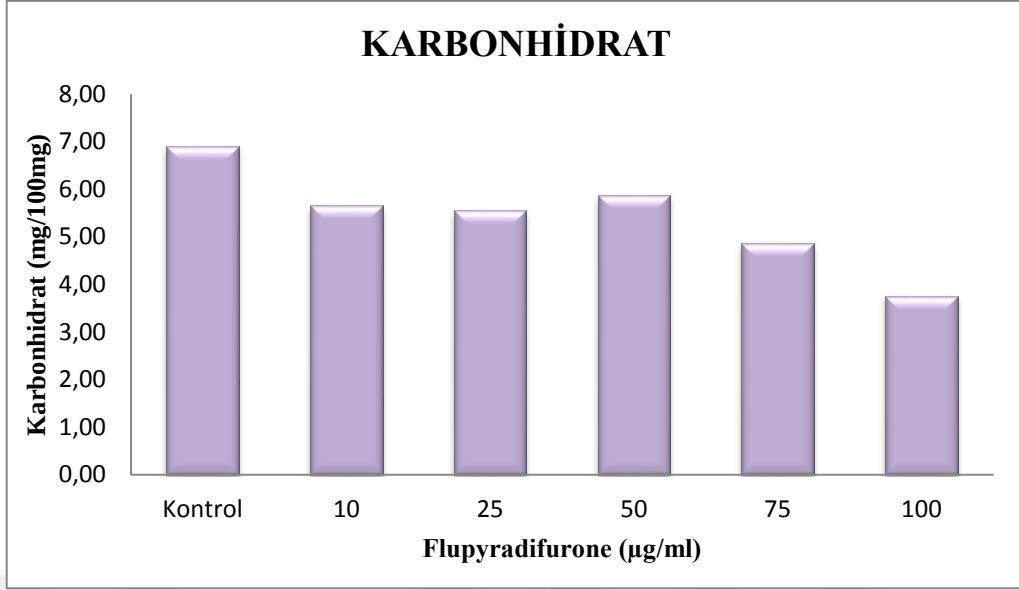
* : Kontrol

SNK: a, b, c, d,e harfleri konsantrasyonlar arasındaki farkı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Aynı harfi içeren veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistiksel ayırım vardır.



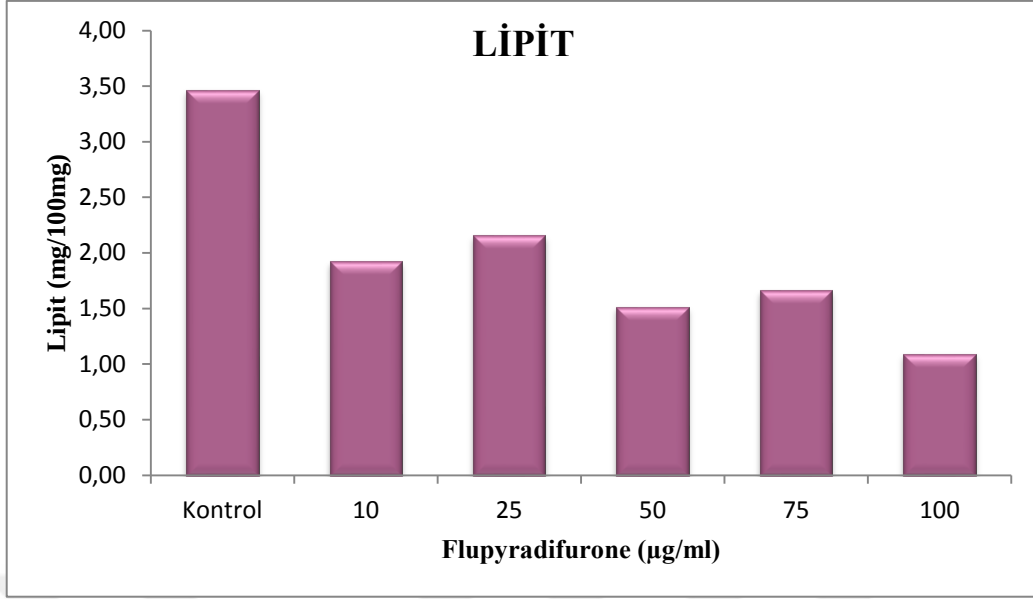
Şekil 4.8. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında protein miktarı üzerine 24 saat sonundaki etkisi

Flupyradifurone uygulanan larvaların protein miktarları incelendiğinde 24. Saatte tüm uygulanan dozlarda protein miktarı kontrol grubuna göre azalmıştır. En ciddi azalış 10 ve 25 µg/ml flupyradifurone uygulanan *G. mellonella* larvalarında görülmüştür. 25 µg/ml flupyradifurone uygulanan grupta protein miktarı 11.99 olarak bulunmuştur. 10, 25 µg/ml flupyradifurone uygulanan dozlar arasında ve 50, 75 µg/ml flupyradifuron uygulanan dozlar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 4.9. *Flupyradifurone'un G. mellonella larvalarında karbonhidrat miktarı üzerine 24 saat sonundaki etkisi*

Flupyradifurone uygulanan *G. mellonella* larvalarının 24. saatteki karbohidrat miktarı incelendiğinde kontrol grubunda 6.90 mg olan karbohidrat miktarı denenen tüm dozlarda önemli ölçüde azalmıştır. 10, 25 ve 50 µg/ml Flupyradifurone maruz bırakılan larvaların karbohidrat miktarları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamakla birlikte bahsi geçen konsantrasyonlara göre 75 ve 100 µg/ml Flupyradifurone uygulanan larvaların karbohidrat miktarları önemli ölçüde azalarak sırasıyla 4.87 ve 3.76 mg olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 4.10. Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvalarında lipit miktarı üzerine 24 saat sonundaki etkisi

Flupyradifurone uygulanan *G. mellonella* larvalarının 24. saatteki lipid miktarında ise kontrol grubuna göre en düşük veri en yüksek doz olan 100 µg/ml Flupyradifurone dozunda meydana gelmiştir. Kontrol grubunda 3.47 mg olan lipid miktarı bahsi geçen dozda önemli ölçüde azalarak 1.09 mg olarak hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Sunulan çalışmada flupyradifurone insektisitinin farklı konsantrasyonları *G.mellonella* larvalarına enjekte edildikten sonra 4 ve 24 saatlik sürelerle maruz bırakıldığında antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz, katalaz ile malondialdehit, karbonhidrat, lipit ve protein miktarlarına olan etkileri incelenmiştir.

Böcekler, ekosistemlerin önemli bir parçasını oluşturan omurgasız hayvanlardır. Yaşam döngüleri süresince sentetik pestisitlerin veya doğal kaynaklı toksinlerin etkisine maruz kalabilirler. Bu canlılar, vücutlarında bulunan detoksifikasyon enzimleri aracılığıyla yabancı maddelere karşı iki aşamalı bir detoksifikasyon reaksiyonlarıyla tepki verirler [87]. Gelişimleri için gerekli olan beslenme sürecinde kimyasallar, patojen organizmalar, nanopartiküller, nanoplastikler, toksik besinler ve metaller gibi doğrudan veya dolaylı olarak sıklıkla karşı karşıya gelen böcekler, bu özelliklerinden dolayı bu tür çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Stres faktörleri, süperoksit radikallerinin ortaya çıkmasına yol açtığında, SOD aktivitesi artar. Ancak SOD aktivitesi bastırılır ve azalırsa, oluşan radikallerin engellenmesi mümkün olmaz ve hücrelerde stres faktörleri altında lipid peroksidasyonu ile birlikte MDA miktarı artar. Çalışmamızda burum sıklıkla görülmüştür. Oksidatif stres koşullarında antioksidan enzim aktivitelerinin artmasının bir kural olmadığını, aksine aktivitenin oldukça azalabileceğini söyleyebiliriz.

Serbest radikallerin artışıyla tetiklenen lipid peroksidasyonun uzun vadeli etkisi, hücresel antioksidan savunma mekanizmalarının zarar görmesine yol açabilir, bu da antioksidan enzim aktivitelerinde bir azalmaya neden olabilir. Bu durum, SOD aktivitesindeki düşüşün, larvaların yüksek MDA içeriğiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Birçok araştırmacı *G. mellonella* larvaları yağ dokularında oluşan oksidatif stresin antioksidan savunma mekanizmalarını etkisiz hale getirmesinden dolayı MDA seviyelerinde artış tespit etmiştir. *G. mellonella* larvaları, *Bacillus thuringiensis*'in üzerindeki etkileri incelenmiş ve MDA miktarında artış tespit edilmiştir [88]. AZA'nın doza bağlı olarak zaman içinde MDA miktarını artırdığı, fenthionun ise larvalarda MDA seviyelerini artırdığı belirlenmiştir [89,90]. Borik asit ve maltoz karışımının etkisi incelendiğinde de MDA miktarında artış gözlemlenmiştir [91]. Bu çalışmalar çevre ve tarım için daha az zararlı kimyasalların belirlenmesine katkı sağlayabilir [90]. Sodyum tetraboratın *G. mellonella* üzerinde MDA seviyelerini artırarak gelişim süresini uzattığı ve

hayatta kalma oranını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu durum, larvaların oluşan oksidatif stresin bir sonucu olarak antioksidan savunma mekanizmalarının etkisiz hale gelmesiyle ilişkilendirilmiştir.

Bir diğer destekleyici çalışmada, tarım zararlılarını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan imidakloprid adlı neonikotinoid insektisidin *G. mellonella* üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki imidaklopridin antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon seviyeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, SOD aktivitesi ile MDA seviyelerinde doza bağlı olarak artışların meydana geldiğini göstermiştir [92].

Aynı ilişkiler, çeşitli zararlı maddelere ve ajanlara maruz kalan böceklerde de gözlemlenmiştir. Artan toksisite ile ilişkili olarak antioksidan enzim aktivitelerinde bir düşüş meydana gelir ve bu azalma, çalıştığımız pestisit kontrol grubuna kıyasla yüksek dozlarda SOD enzim aktivitesinin engellendiği veya tamamen ortadan kaldırıldığı sonucunu göstermektedir.

Önceki bir incelemede, tarımsal zararlılar sıkça kullanılan fenthion etkisi altında *G. mellonella* larvalarının SOD aktivitesinde değişiklikler olduğu belirtilmiştir. Bu değişim, kontrole yakın dozlarda SOD' un artışı, daha yüksek doz seviyelerinde azalış şeklinde kendini göstermiştir. Enzimler üzerine yapılan bir *Bacillus thuringiensis* çalışmasında ise SOD aktivitesinin arttığı belirtilmiştir [88]. Gerçekleştirilen başka bir çalışmada, Azadiraktin yirmi dört ve yetmiş iki saatlik zaman dilimlerinde *G. mellonella* larvaları SOD aktivitesini azaldığı belirtilmiştir [89]. Yine aynı organizma üzerinde yapılan çalışmada ise değişik dozlarda besine eklenen borik asit SOD aktivitesini arttığı tespit edilirken [93] yüksek dozdaki Giberellik asit ise larvaların SOD aktivitesini azalttığı saptanmıştır [94]. Bakır nanoflowers (nanoçiçek) etkisi altındaki *G. mellonella* larvalarının SOD aktivitesinde düşük dozlarda artış olmasına rağmen en yüksek dozda (6000 ppm) ise SOD aktivitesinde düşüş görülmüştür [95]. Bu durum bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Araştırmacılar bu durumu artan konsantrasyona bağlı olarak enzimlerin yapısal olarak olumsuz etkilediğine bağlamıştır. Aynı durumun bizim çalışmamızda da olduğunu düşünüyoruz.

Flupyradifurone üzerinde yapılan çalışmalar, farklı türlerdeki canlılarda da oksidatif stresin meydana geldiğini de göstermiştir. Örneğin, zebrafish üzerinde yapılan çalışmada, SOD ve CAT aktivitelerinin azaldığı ve oksidatif stresin ortaya çıktığı belirtilmiştir [96]. Benzer sonuçlar, *A. mellifera* üzerinde yapılan çalışmada da gözlemlenmiştir [97].

Yapılan çalışmada krom ve kurşun metalleri *G. mellonella*' da POD ve CAT enzim aktivitesinin birlikte yükseltmiştir demiştir [98]. Entomopatojen organizma olan *Heterorhabditis sp. beicherriana* *G. mellonella* üzerine yapılan çalışmanın ilk gününde POD, CAT ve SOD enzim aktivitelerinin yükseldiğini ve MDA düştüğünü daha sonra ise POD aktivitesindeki azalma ile MDA aktivitesinde artış görülmüştür demiştir [99]. Yapılan bir çalışmada Larvaların POD ve CAT enzim miktarlarında aynı anda düşüş belirlenmiş ve orta bağırsak preparatlarında olası deformasyon gösterilmiştir. POD ile birlikte hidrojen peroksitin elimine edilmesinde Askorbat peroksidaz (APX) enziminde görev aldığı bilinmektedir [100]. Peroksidazlar, hücre içinde metabolizma ve oksidatif stresin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Ancak yapı olarak bu enzimler hasar görebilir veya işlevleri değişebilir. POD ve APX gibi enzimlere ek olarak, CAT enzimini de benzerlik gösteren bir enzim olarak söyleyebiliriz. İşlevsel olarak, katalaz da hidrojen peroksiti parçalayarak su ve oksijen üretir, dolayısıyla hidrojen peroksitin hücrelerdeki zararlı etkilerini azaltmaya yardımcı olur [101,102].

Çalışmamızda katalaz enziminde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. APX ve POD aktivitelerine yönelik analizler yapmadığımız için bu konuda kesin bir ifade kullanmak mümkün değildir. Bununla birlikte MDA oranındaki artış oksidatif stresin bir göstergesidir. Peroksidaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin zarar görmesi, böceklerde ciddi sağlık sorunlarına ve yaşam kalitesinde düşüşe neden olabilir. Bu enzimlerin korunması, böceklerin sağlığı ve hayatta kalma şanslarını artırmak için önemlidir. Bu yönde yapılacak çalışmaların değerli olduğunu düşünüyorum.

Oksidatif strese bağlı olarak hücre zarı ve diğer hücresel lipid yapıların bozulmasıyla lipid peroksidasyonu olarak tanımlanan bir reaksiyonlar zinciri meydana gelir ve bunun sonucunda başta malondialdehit olmak üzere aldehit türevlerinin oluşumu sağlanır. Malondialdehit miktarındaki artış, oksidatif stresin son ürünü olan lipid peroksidasyon düzeyindeki artışın güçlü bir göstergesidir.

Malondialdehit seviyesindeki artışın oksidatif strese bir artışı ortaya koymasının yanı sıra, oksidatif stresteki bu artışın hücre ölümüne yol açabileceğinden kullanılan insektisitlerin nekroz veya apoptoz üzerindeki etkisinin aydınlatılması ve yapısal hasarların özellikle orta bağırsaktaki etkisinin histolojik yöntemlerle gösterilmesi enzim aktivitesi sonuçlarının daha güvenilir bir şekilde değerlendirilmesine yardımcı olacaktır.

Günümüzde birçok insektisite karşı canlılar tarafından oluşturulan dirence bağlı olarak yeni insektisitlerin kullanımı kullanıma sunulması kaçınılmaz bir durum oluşturmaktadır. Flupyradifurone butenolid insektisit sınıfının üyesi olarak çevreye verdiği zararın daha az olması ve böceklerde direnç oluşumunu azalttığı için tercih sebebi olmuştur. Birçok araştırmacı farklı türler *B. tabaci* G. , *Aphis gossypii* G. , *Myzus persicae* üzerine toksik etkisini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır [103,104,105]. Zararlılara karşı yaygın olarak tercih edilen kimyasal mücadele, günümüzde en etkili yöntem olmasına rağmen, hedef organizmalar dışında kalan canlılarda doz ve süreye bağlı olarak gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar ve fizyolojik süreçler üzerindeki etkisi konusunda net bir ifade kullanmak ne yazık ki mümkün değildir. İnsektisitlerin her ne kadar sublethal dozları kullanılır olsa da organizma düzeyinde üreme, yaşam süresi, gelişim gibi biyolojik parametrelerde değişikliklere yol açmakta ve sonuçta böceğin popülasyon dinamiği üzerinde olumsuz etkileri olabilmektedir [106,107,108,109].

Bu anlamda yapılan çalışmada *G. mellonella* larvaları karbonhidrat ve lipid metabolizması üzerine Flupyradifurone'un önemli derecede etkilediği bulunmuştur. Verilerin alındığı 4 ve 24 saatlik deney periyodunda toplam karbonhidrat ve lipid miktarı kontrol grubuna göre önemli derecede düşüş göstermiştir. Böceklerin yüksek metabolik hızlarına sahip olmalarına rağmen, vücut yapıları son derece küçük olduğundan enerjinin depolanması sınırlıdır [110]. Depo formundaki lipid, karbonhidrat ve protein türevi moleküllerin hemolenf içinde taşınması, önemli metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumludur. Karbonhidratlar, böceklerin fizyolojik süreçlerinde önemli bir fonksiyon üstlenir ve dokulardaki glikojen, uçuş, metamorfoz ve üreme gibi fizyolojik olayların sürdürülmesine katkı sağlar [111]. Buna ek olarak depo lipidler organlara taşınarak üreme, vitellogenez ve kitin oluşumu gibi genel fizyolojik olayların sürdürülmesinde önemlidir [112,113,114]. Deney periyodunun 24. saat verilerine ait lipid miktarında 50 ppm ve daha yüksek dozlarda kontrol ve denenen diğer oranlara göre bir düşüş söz konusudur. Çalışmamızda son evre larvalar seçilmiştir ve normal fizyolojik süreçler içinde larvaların pupa evresine geçmesi gerekmektedir. Flupyradifurone bu süreci hızlandırmış ve metamorfoz için gerekli enerji lipid kaynaklarının kullanımı ile sağlanmış olabilir. Aynı zamanda özellikle yağ dokuda depolanmış lipid yapısal olarak Flupyradifurone tarafından etkilenmiş olabilir. Flupyradifurone etkisine bağlı olarak *Binodoxys communis* [115], bireylerinin sentezlemiş oldukları lipidlerin azaldığını belirten çalışmada bu durum immün sistem ve kütikula oluşumu için gerekli enerjinin lipidlerden

[116,117] karşılanmış olabileceği yönünde yapılmış çalışmalar ile ilişkilendirilmiş olması yaptığımız yorumu desteklemektedir. Karbonhidrat ve lipid metabolizmasını düzenleyen enzimler ve hormonlar, depolanan enerjinin serbest bırakılmasını ve alınan besinlerin parçalanarak depo edilmesini katalize eder [118]. Yaptığımız çalışmada elde edilen verilere bakarak bu durum hakkında net bir çıkarımda bulunmak olası değildir.

Asetil CoA karboksilaz, hücrelerde enerji üretiminden ve lipid metabolizmasından sorumlu olan önemli bir enzimdir. Bununla birlikte yapılan çalışmalardan birinde Spirotetramat gibi insektisitlerin, bu enzimi inhibe ederek böceklerin gelişimini etkileyebildiği belirtilmiştir [119]. Lohar ve Wright (1993) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise malathion etkisinde *Tenebrio molitor* L. hemolenf ve yağ dokudaki lipid miktarlarında azalma tespit edilmiş olup bu durum lipid metabolizmasını kontrol eden adipokinetik hormon üzerindeki insektisit etkisi ile ilişkilendirilmiştir. Belki benzer durumlar bizim yaptığımız çalışmada da görülmüş olabilir. Bu durumlara ait fizyolojik süreçlerin ve kimyasal olayların daha iyi açıklanması için Flupyradifurone ile yapılacak daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğunu söyleyebiliriz. Yapılan çalışmada lipid miktarının gün ve doza bağlı olarak düştüğü tespit edilmiştir bu durum birçok araştırmamanın bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Farklı insektisit ve böcek türleri üzerine yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. *Spodoptera littoralis* larvalarının klorfluazuron [120] *Rhyzopertha dominica* bireylerinin deltametrin [121] etkisi altında lipid miktarının azaldığı belirtilmiştir. Lipit miktarı sadece insektisit etkisinde değişmemiştir. Örneğin böcek kovucu alletrinin *Periplaneta americana* [122] dişi ve erkek bireylerinin lipid miktarını önemli bir şekilde düşürmüştür. Enjeksiyon yöntemi ile larvalara verilen 10 ppm Flupyradifurone 4 saat sonunda karbonhidrat miktarına herhangi bir etkiye bulunmamıştır. Diğer verilere bakıldığında ise anlamlı bir azalma söz konusudur. Lipitler gibi özellikle glikojen de böcekler için özellikle immün sistem ve hareket için enerji kaynağı olarak kullanılır. Depo glikojen hazır enerji kaynağı olarak kullanılırken besinle alınan karbonhidratların lipitlere çevrimi söz konusu olabilir. Bununla birlikte disakkaritler çevresel zararların proteinler üzerinde oluşturduğu yapısal bozukluların giderilmesinde bu moleküler saperon gibi görev yapar [123,124]. Söz konusu moleküller Flupyradifurone'un olası yapısal hasarların giderilmesinde de kullanılmış olabilir. Protein miktarındaki bazı konsantrasyonlardaki artışın bu şekilde olabileceğini veriler ortaya koymaktadır. Özellikle 4. saat verilerine bakıldığında protein miktarında en yüksek iki konsantrasyonda artışın olması yapısal deformasyonun giderilmesi için daha hazır ve kullanımı kolay enerjinin

kullanılmış olduğunu açıklamaktadır. Hidrofilik gruplar içeren karbonhidratların lipitlere göre taşınımı daha hızlı ve kolay olduğundan birçok böcek türü için tercih edilen enerji kaynağıdır.

Flupyradifurone'un *G. mellonella* larvaları üzerinde gerçekleştirilen fizyolojik ve biyokimyasal çalışmada, doz, yöntem ve süreye bağlı olarak total lipid ve karbonhidrat miktarlarını belirgin bir biçimde modüle ettiği tespit edilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, geniş bir kullanım potansiyeline sahip FLU adı verilen yeni bir neonikotinoid insektisidin olası toksik etkilerini olduğunu ortaya koymaktadır. *G. mellonella* larvaları üzerinde yürütülen bu araştırma, FLU'nun ekotoksikolojik etkilerini bütüncül bir yaklaşımla inceleyen ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Yapılan analizler, *G. mellonella* larvalarının FLU'ya maruz kaldıktan sonra antioksidan savunma mekanizmalarının etkinleştüğünü, ROT homeostazisinin bozulduğunu ve lipit peroksidasyonunun DNA hasarına yol açtığını göstermektedir. Bulgular, larvaların FLU'ya karşı gösterdiği antioksidan stres tepkisi ve detoksifikasyon mekanizmaları hakkındaki bilgimizi derinleştirirken, gelecekteki hedef dışı toksikoloji araştırmalarının önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, bu çalışma, neonikotinoid pestisitlerin tarım arazilerindeki kullanımına yönelik stratejik yönlendirmeler sağlamaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] UNL. (2022). "University of Nebraska Lincoln, Institute of Agriculture and Natural Resources". https://water.unl.edu/article/crop-production/what-pesticide_ Erişim Tarihi: 01.02.2024.
- [2] WHO (World Health Organization) (2022). "Guidelines on Public Health Pesticide Management Policy. SEA-CD-214. New Delhi: (WHO), Regional Office for South-East Asia; 2010". http://www.who.int/whopes/resources/SEA_CD_214.pdf_ Erişim Tarihi: 01.02.2024.
- [3] Efecan, H. (2014). Halfenprox Pestisitinin Mutajenik Aktivitesinin Ames Test Sistemi ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi.
- [4] Carriger, J.F., Rand, G. M., Gardinali, P. R., Perry, W. B., Tompkins, M. S. ve Fernandez, A. M. (2006). "Pesticides of potential ecological concern in sediment from South Florida canals: An ecological risk prioritization for aquatic Arthropods". *Soil and Sediment Contamination*, 15 (1), 21-45.
- [5] Mostafalou, S. ve Abdollahi, M. (2012). "Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases". *Journal of Clinical and Experimental Pharmacology*, 01 (S5), 10-11.
- [6] Öncüer, C. (1995). Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.
- [7] Polat, B., Özüçli, M., Çetin, H. ve Aydın, L. (2019). "Pestisit kullanımının bal arısı sağlığına ve ürünlerine etkisi". *Akdeniz Üniversitesi Dergisi*, 39 (2), 128-134.
- [8] Kasili, S. ve Wanjala, C. (2023). "Use, disposal and environmental challenges of insecticide treated nets". *East African Journal of Health and Science*, 6 (1), 196-209.
- [9] Kollmeyer, W. D., Flattum, R. F., Foster, J. P., Powell, J. E., Schroeder, M. E. ve Soloway, S. (1999). "Discovery of the Nitromethylene Heterocycle Insecticides, in Neonicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor". I. Yamamoto ve J. E. Casida (Ed.), (ss. 71–89). New York: Springer.
- [10] Goulson, D. (2013). "An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides". *Journal of Applied Ecology*, 50 (4), 977-987.
- [11] Jeschke, P. ve Nauen, R. (2008). "Review neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry". *Pest Management Science*, 64, 1084–1098.
- [12] Hopwood, J., Vaughan, M., Shepherd, M., Biddinger, D., Mader, E., Black, S. H. ve Mazzacano, C. (2012). Are Neonicotinoids Killing Bees? A Review of Research into the Effects of Neonicotinoid Insecticides on Bees, With Recommendations for Act. The Xerces Society for Invertebrate Conservation. Broadway: Portland.

- [13] Decourtye, A. ve James, D. (2010). "Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors". S. H. Thany (Ed.), *Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees* (ss. 85-95). New York: Springer.
- [14] Tomizawa, M. ve Casida, J. E. (2005). "Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 247-268.
- [15] Çetin, H. (2016). *Kent Zararlıları, Biyoloji, Ekoloji ve Mücadele Yöntemleri (Vektörler ve diğerleri)*. Antalya: Yıldız Ofset.
- [16] Sánchez-Hernández, L., Hernández-Domínguez, D., Bernal, J., Neusüß, C., Martín, M. T. ve Bernal, J. L. (2014). "Capillary electrophoresis–mass spectrometry as a new approach to analyze neonicotinoid insecticides". *Journal of Chromatography A.*, 1359, 317- 324.
- [17] Zhang, Q., Li, Z., Chang, C. H., Lou, J. L., Zhao, M. R. ve Lu, C. (2018). "Potential human exposures to neonicotinoid insecticides: A review". *Environmental Pollution*, 236, 71-81.
- [18] PMRA. (2015). "Pesticide Incident Reporting Database. Health Canada Pest Management Regulatory Agency". <http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/pi-ip/disclaimer-avertissement-eng.php>, Erişim Tarihi: 30.01.2024.
- [19] European Commission. (2020). "Neonicotinoids". https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal/neonicotinoids_en, Erişim Tarihi: 30.01.2024.
- [20] Colares, F., Michaud, J. P., Bain, C. L. ve Torres, J. B. (2017). "Relative toxicity of two aphicides to *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae): Implications for integrated management of sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae)". *Journal of Economic Entomology*, 110(1), 52-58.
- [21] Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M. E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Wölfel, K., Haas, M., Kunz, K. ve Raupach, G. (2015). "Flupyradifurone: A brief profile of a new butenolide insecticide". *Pest management science*, 71(6), 850-862.
- [22] Jeschke, P., Nauen, R., Gutbrod, O., Beck, M. E., Matthiesen, S., Haas, M. ve Velten, R. (2015). "Flupyradifurone (Sivanto™) and its novel butenolide pharmacophor: Structural considerations". *Pesticide biochemistry and physiology*, 121, 31-38.
- [23] Smith, H. A., Nagle, C. A., MacVean, C. A. ve McKenzie, C. L. (2016). "Susceptibility of *Bemisia tabaci* MEAM1 (Hemiptera: Aleyrodidae) to imidacloprid, thiamethoxam, dinotefuran and flupyradifurone in South Florida". *Insects*, 20, 7 (4), 57.
- [24] Tosi, S. ve Nieh, J. C. (2019). "Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®) on honey bees". *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1900), 20190433.

- [25] Tong, L., James, C. N. ve Tosi, S. (2019). "Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation". *Chemosphere*, 237, 124408.
- [26] US EPA. (2014). Environmental fate and ecological risk assessment for foliar, soil drench, and seed treatment uses of the new insecticide flupyradifurone (BYI 02960).
- [27] Al Naggar, Y. ve Baer, B. (2019). "Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*)". *Scientific reports*, 9(1), 19753.
- [28] Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M. E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W. ve Raupach, G. (2015). "Flupyradifurone: A brief profile of a new butenolide insecticide". *Pest Management Science*, 71 (6), 850–862.
- [29] EFSA. (2015). "Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flupyradifurone". *EFSA J.*, 13(2), 4020.
- [30] Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M. E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Wolfel, K., Haas, M., Kunz, K. ve Raupach, G. (2015). "Flupyradifurone: A brief profile of a new butenolide insecticide". *Pest management science*, 71(6), 850-862.
- [31] Rueppell, O., Hayworth, M. K. ve Ross, N. P. (2010). "Altruistic self-removal of healthcompromised honey bee workers from their hive". *Journal of evolutionary biology*, 23(7), 1538-1546.
- [32] Hesselbach, H., Seeger, J., Schilcher, F., Ankenbrand, M. ve Scheiner, R. (2020). "Chronic exposure to the pesticide flupyradifurone can lead to premature onset of foraging in honeybees *Apis mellifera*". *Journal of Applied Ecology*, 57(3), 609-618.
- [33] Tong, L., Nieh, J. C. ve Tosi, S. (2019). "Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (Flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation". *Chemosphere*, 237, 124408–124409.
- [34] Hesselbach, H. ve Scheiner, R. (2018). "Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition". *Scientific Reports*, 8, 1–8.
- [35] Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). "Antioksidanlar". *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (1), 65-76.
- [36] Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E. Ş. ve Yılmaz, B. (2019). "Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutatyon Peroksidaz (GPX)". *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26 (3), 362-369.
- [37] Sarac, H., Durukan, H. ve Demirbas, A. (2021). "Determination of some nutrient concentrations and antioxidant enzyme activities of naturally grown spinach (*Spinacia oleracea* L.) Plant in field conditions". *Mathematics and Natural Sciences*, 33.

- [38] Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R. ve De, B. (2010). "Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect". International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 3 (1), 91-100.
- [39] Shinde, A., Ganu, J. ve Naik, P. (2012). "Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A review". Journal of Dental and Allied Sciences, 1(2), 63.
- [40] Candan, N. ve Tarhan, L. (2003). "Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg^{2+} Deficiency in the mentha pulegium leaves". Plant Physiology and Biochemistry, 41 (1), 35-40.
- [41] Aydemir, B. ve Karadağ Sarı, E. (2009). "Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi". Kocatepe Veterinary Journal, 2 (2), 56-60.
- [42] Sen, S. ve Chakraborty, R. (2011). "The role of antioxidants in human health. American chemical society, diagnostics". Oxidative Prevention Chapter, 1, 1-37.
- [43] Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R. ve De, B. (2010). "Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect". International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 3 (1), 91-100.
- [44] Sen, S. ve Chakraborty, R. (2011). "The role of antioxidants in human health. American chemical society, diagnostics". Oxidative Prevention Chapter, 1, 1-37.
- [45] Young, I. S. ve Woodside, J. V. (2001). "Antioxidants in health and disease". Journal of clinical pathology, 54(3), 176-186.
- [46] Kirkman, H. N., Galiano, S. ve Gaetani, G. F. (1987). "The function of catalase-bound NADPH". Journal of Biological Chemistry, 262(2), 660-666.
- [47] Limon-Pacheco, J. ve Gonshebbat, M. E. (2009). "The role of antioxidants and antioxidant related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress". Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 674(1-2), 137-147.
- [48] Cheung, C. C. C., Zheng, G. J., Li, A. M. Y., Richardson, B. J. ve Lam, P. K. S. (2001). "Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels *Perna Viridis*". Aquatic toxicology, 52(3-4), 189-203.
- [49] Larson, R. A. (1988). "The antioxidants of higher plants". Phytochemistry, 27 (4), 969-978.
- [50] Torun, M., Yardım, S., Gönenç, A. ve Sargın, H. (1995). "Çeşitli kanser vakalarında serum MDA düzeyleri". Biyokimya Dergisi, 20, 1-7.
- [51] Ritola, O., Peters, L. D., Livingstone, D. R. ve Seppa, P. L. (2002). "Effects of in vitro exposure to ozone and and hyperoxia on superoxide dismutase, catalase, glutathione and lipid peroxidation in red blood cells and plasma". Aquaculture Research, 33, 165-175.

- [52] Akkuş, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları.
- [53] Gutteridge, J. M. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage". Clinical chemistry, 41(12), 1819-1828.
- [54] Akyol, E. (2013). "Mum güvesi (*Galleria mellonella* L.) Zararı ve kontrol yöntemleri". Arıcılık Araştırma Dergisi, 2-7.
- [55] Harding, C. R., Schroeder, G. N., Collins, J. W. ve Frankel, G. (2013). "Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection". Journal of Visualized Experiments, (81), e50964.
- [56] Mikulak, E., Gliniewicz, A., Przygodzka, M. ve Solecka, J. (2018). "*Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies". Przegl Epidemiol, 72(1), 57-73.
- [57] Özer, M. (1962). "Arı kovanlarında önemli zarar yapan balmumu güvesi *Galleria mellonella* L'nin morfoloji, biyoloji ve yayılışı üzerine araştırmalar". Bitki Koruma Bülteni, 2, 12-26.
- [58] Akyol, E. (2013). "Mum güvesi (*Galleria Mellonella* L.) Zararı ve kontrol yöntemleri". Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Arıcılık Araştırma Dergisi.
- [59] Huang, A., Mangold-Döring, A., Focks, A., Zhang, C. ve Van den Brink, P. J. (2022). "Comparing the acute and chronic toxicity of flupyradifurone and imidacloprid to non-target aquatic arthropod species". Ecotoxicology and Environmental Safety, 243, 113977.
- [60] Dere, B., Altuntaş, H. ve Nurullahoğlu, Z. U. (2015). "Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)". Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 89 (3), 138-152.
- [61] Dere, B., Altuntaş, H. ve Nurullahoğlu, Z. U. (2015). "Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae)". Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 89 (3), 138-152.
- [62] Sugeçti, S. (2021). "Biochemical and immune responses of model organism *Galleria mellonella* after infection with *Escherichia coli*". Entomologia Experimentalis et Applicata, 169 (10), 911-917.
- [63]. Wang, R., Wang, J., Zhang, J., Che, W., Feng, H. ve Luo, C. (2020). "Characterization of flupyradifurone resistance in the whitefly *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype)". Pest Management Science, 76 (12), 4286-4292.
- [64] Wu, Y. Y., Pasberg, P., Diao, Q. Y. ve Nieh, J. C. (2021). "Flupyradifurone reduces nectar consumption and foraging but does not alter honey bee recruitment dancing". Ecotoxicology and Environmental Safety, 207, 111268.

- [65] Harwood, G. P., Prayugo, V. ve Dolezal, A. G. (2022). "Butenolide insecticide flupyradifurone affects honey bee worker antiviral immunity and survival". *Frontiers in Insect Science*, 2.
- [66] Scheibli, L., Elsenhans, T., Wolf, H., Stemme, T. ve Pfeffer, S. E. (2023). "Influence of the pesticide flupyradifurone on mobility and physical condition of larval green lacewings". *Scientific Reports*, 13 (1), 19804.
- [67] Ahmed, M. A. I. ve Vogel, C. F. A. (2020). "Toxicological evaluation of novel butenolide pesticide flupyradifurone against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes". *Journal of Medical Entomology*, 57 (6), 1857-1863.
- [68] Hesselbach, H. ve Scheiner, R. (2018). "Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition". *Scientific Reports*, 8 (1), 4954.
- [69] Çakır, E., Uçkan, F., Ergin, E. ve Özbek, R. (2023). "Influence of zebularin on antioxidant enzymes and lipid peroxidation of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)". *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 10 (2), 457-464.
- [70] Kazek, M., Kaczmarek, A., Wrońska, A. K. ve Boguś, M. I. (2020). "*Conidiobolus coronatus* induces oxidative stress and autophagy response in *Galleria mellonella* larvae". *PLoS One*, 15 (2), e0228407.
- [71] Fekry, D. E., ElSheikh, A. A. E., Mohamed, G. E. D., Ismaiel, A. A. E. ve El-Gendy, R. M. (2023). "Physiological responses of Greater wax moth (*Galleria mellonella*) to inoculation with some strains of endophytic fungi". *Bulletin of Faculty of Science, Zagazig University*, 2023 (2), 121-128.
- [72] Doğan, H., Baş, H., Fidan, H., Stankov, S., Stoyanova, A., Uskutoğlu, T., ... Yılmaz, G. (2023). "Phytochemical profile of Agrimonia Eupatoria L. from Bulgaria and effects of its extracts on *Galleria Mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae". *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 15 (3).
- [73] Erbaş, E. D. ve Altuntaş, H. (2021). "Effects of juglone on the antioxidant metabolism in the larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)". *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 11 (1), 18-28.
- [74] Rehab, M. (2021). "Toxicological, histological and biochemical effects of lepidium sativum seeds extract on *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae". *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*, 23(1), 1-10.
- [75] Xu, M. N., Li, L., Pan, W., Zheng, H. X., Wang, M. L., Peng, X. M., ... Huang, X. W. (2021). "Zinc oxide nanoparticles prime a protective immune response in *Galleria mellonella* to defend against *Candida albicans*". *Frontiers in Microbiology*, 12, 766138.
- [76] Eskin, A. ve Nurullahoğlu, Z. U. (2023). "Influence of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) on the hemocyte count and hemocyte-mediated immune responses of the Greater Wax Moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)". *Drug and Chemical Toxicology*, 46(6), 1176-1186.

- [77] Tuncsoy, B. ve Mese, Y. (2021). "Influence of titanium dioxide nanoparticles on bioaccumulation, antioxidant defense and immune system of *Galleria mellonella* L.". Environmental Science and Pollution Research, 28 (28), 38007-38015.
- [78] Liao, C., Yang, Y., Fan, X., Du, J., Zhu, J., Sang, M. ve Li, B. (2021). "Toxicity of insecticidal proteins from entomopathogenic bacteria to *Galleria mellonella* larvae". 3 Biotech, 11, 1-9.
- [79] Ercan, F. S., Baş, H. ve Azarkan, S. Y. (2022). "In silico detection of Cucurbitacin-E on antioxidant enzymes of model organism *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae) and variation of antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in treated larvae". Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 11 (1), 1-17.
- [80] Bronskill, J. K. (1961). "A cage to simplify the rearing of greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae)". Journal of Lepidopterist Society, 15 (2), 102-104.
- [81] Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L. ve Randall, R. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". Journal of Biological Chemistry, 193 (1), 265-275.
- [82] Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro". Methods in Enzymology, 121-126.
- [83] Barr-Or, D., Rael, L. T., Lau, E. P., Rao, N. K. R., Thomas, G. W., Winkler, J. V., Yukl, R. L., Kingston, R. G. ve Curtis, C. G. (2001). "An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala -His- Lys) prevents formation of copper induced reactive oxygen species". Biochemical and Biophysical Research Communications, 284, 856-862.
- [84] Sun, Y., Oberley, L. W. ve Li, Y. (1988). "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase." Clinical Chemistry, 34 (3), 497-500.
- [85] Van Handel, E. (1985a). "Rapid determination of glycogen and sugar in mosquitoes". Journal of the American Mosquito Control Association, 1, 299-304.
- [86] Van Handel, E. (1985b). "Rapid determination of total lipids in mosquitoes". Journal of the American Mosquito Control Association, 1, 302- 304.
- [87] Yu, S.J. (2008). "The Toxicology and Biochemistry of Insecticides". CRC Pres, Taylor Francis Group, s. 250
- [88] Dubovskiy, I.M., Martemyanov, V.V., Vorontsova, Y.L., Rantala, M.J., Gryzanova, E.V. ve Glupov, V.V. (2008). "Effect of Bacterial Infection on Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation in the Midgut of *Galleria mellonella* L. Larvae (Lepidoptera: Pyralidae)". Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 148:1-5.
- [89] Dere, B., Altuntaş, H. ve Nurullahoğlu, Z. U. (2015). "Insecticidal and oxidative effects of azadirachtin on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)". Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 89 (3), 138-152.
- [90] Alp, E. ve Coskun, M. (2018). "Effects Of The Organophosphate Insecticide Fenthion on The Antioxidant Defense System and Lipid Peroxidation of *Galleria mellonella* L". Fresenius Environmental Bulletin, 27(12), 8280-8285.

- [91] Arı, B. (2010). Borik Asit ve Maltozun Besinsel Karışımının *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nin bazı Biyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Zonguldak: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- [92] Yucel, M.S. ve Kayis, T. (2019). "Imidacloprid induced alterations in oxidative stress, biochemical, genotoxic, and immunotoxic biomarkers in non-mammalian model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ". Journal of Environmental Science and Health B, 54 (1), 27–34.
- [93] Hyrsi, P., Büyükgüzel, E. ve Büyükgüzel, K. (2007). "The Effects of Boric acid-Induced Oxidative Stress on Antioxidant Enzymes and Survivorship in *Galleria mellonella*". Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 66, 23-31.
- [94] Altuntaş, H. (2015). "Determination of Gibberellic acid (GA3)-Induced Oxidative Stress in a Model Organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)". Environmental Entomology, 44(1), 100-105.
- [95] Eskin, A., Ekremoglu, M. ve Altinkaynak, C.(2022). "Effects of organic-inorganic hybrid nanoflowers' framework on hemocytes and enzymatic responses of the model organism, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) ". International Journal of Tropical Insect Science, 42(1), 333-344
- [96] Zhong, K., Meng, Y., Wu, J., Wei, Y., Huang, Y., Ma, J. ve Lu, H. (2021). "Effect of flupyradifurone on zebrafish embryonic development". Environmental Pollution, 285, 117323.
- [97] Chakrabarti, P., Carlson, E.A., Lucas, H.M., Melathopoulos, A.P. ve Sagili, R.R. (2020). "Field rates of Sivanto™ (flupyradifurone) and Transform® (sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (*Apis mellifera* L.) ". Plos one, 15(5), e0233033.
- [98] Wu, G. ve Yi, Y. (2015). "Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae". Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 167, 131-139.
- [99] Wu, H.D. ve Liu, Q.Z. (2012). "Antioxidative responses in *Galleria mellonella* larvae infected with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. *beicherriana*". Biocontrol Science and Technology, 22(5), 601-606.
- [100] Liao, C., Yang, Y., Fan, X., Du, J., Zhu, J., Sang, M. ve Li, B. (2021). "Toxicity of insecticidal proteins from entomopathogenic bacteria to *Galleria mellonella* larvae". 3 Biotech, 11, 101.
- [101] Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O. ve Emre, I. (2015). "Alterations in antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ion balance induced by dichlorvos in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)". Annals of the Entomological Society of America, 108(4), 570-574.

- [102] Coskun, M., Kayis, T., Gulsu, E., ve Alp, E. (2020). "Effects of selenium and vitamin E on enzymatic, biochemical, and immunological biomarkers in *Galleria mellonella* L". Scientific Reports, 10(1), 9953.
- [103] Smith, H. A., Nagle, C. A., MacVean, C. A. ve McKenzie, C. L. (2016). "Susceptibility of *bemisia tabaci* MEAM1 (Hemiptera: Aleyrodidae) to imidacloprid, thiamethoxam, dinotefuran and flupyradifurone in South Florida". Insects, 7 (4), 57.
- [104] Liang, P. Z., Ma, K. S. ve Chen, X. W. (2019). "Toxicity and sublethal effects of flupyradifurone, a novel butenolide insecticide, on the development and fecundity of *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae)". Journal of Economic Entomology, 112(2), 852-858.
- [105] Tang, Q., Ma, K. ve Chi, H. (2019). "Transgenerational hormetic effects of sublethal dose of flupyradifurone on the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)". PLoS One, 14, 1–16.
- [106] Antunes, E. C., Guedes, R. N. C., Della, L. T. M. C. ve Serrão, J. E. (2000). "Sublethal effects of abamectin suppressing colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*". Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 56(12), 1059-1064.
- [107] Desneux, N., Decourtye, A. ve Delpuech, J. M. (2007). "The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods". Annual Review of Entomology, 52, 81-106.
- [108] Pineda, S., Schneider, M. I., Smagghe, G., Martínez, A. M., Del Estal, P., Viñuela, E., Valle, J. ve Budia, F. (2007). "Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)". Journal of economic entomology, 100 (3), 773-780.
- [109] Guedes, R. N., Smagghe, G., Stark, J. D. ve Desneux, N. (2016). "Pesticide-Induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs". Annual review of entomology, 61, 43-62.
- [110] Candy, S. G., Swanson, G. T., Kamboj, S. K. ve Cull- (1997). "Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition". Journal of Neuroscience, 17 (1), 58-69.
- [111] Kaufmann, C. ve Brown, M. R. (2008). "Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*". Journal of insect physiology, 54(2), 367-377.
- [112] Van Hensden, H. C. ve Law, J. H. (1989). "An insect transport particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein". Journal of Biological and Chemistry, 264, 17287–17292.
- [113] Zhou, G. ve Miesfeld, R. L. (2009). "Energy metabolism during diapause in *Culex pipiens* mosquitoes". Journal of Insect Physiology, 55, 40–46.

- [114] Dapporto, L., Lambardi, D. ve Turillazzi, S. (2008). “Not only cuticular lipids: First evidence of differences between foundresses and their daughters in polar substances in the paper wasp *Polistes dominulus*”. *Journal of Insect Physiology*, 54, 89–95.
- [115] Gao, X., Zhao, L., Zhu, X., Wang, L., Zhang, K., Li, D., Ji, J., Niu, L., Luo, J. ve Cui, J. (2023). “Exposure to flupyradifurone affect health of biocontrol parasitoid *Binodoxys communis* (Hymenoptera: Braconidae) via disrupting detoxification metabolism and lipid synthesis”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 255, 114785.
- [116] Arrese, E. L. ve Soulages, J. L. (2010). “Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation”. *Annual review of entomology*, 55, 207-225.
- [117] Lehmann, P., Pruisscher, P., Posledovich, D., Carlsson, M., Käkälä, R., Tang, P., Nylin, S., Wheat, C. W., Wiklund, C. ve Gotthard, K. (2016). “Energy and lipid metabolism during direct and diapause development in a pierid butterfly”. *Journal of Experimental Biology*, 219(19), 3049-3060.
- [118] Klowden, M. J. (2002). *Physiological systems in insects*. San Diego, California: Academic Press.
- [119] Nauen, R., Reckmann, U., Thomzik, J. ve Thielert, W. (2008). “Biological profile of spirotetramat (Movento®) – a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species”. *Bayer CropSci. J.* 61, 245–278.
- [120] Abdel-Aal, A. E. (2006). “Effect of chlorfluazuron, nuclear polyhydrosis virus (SLNPV) and *Bacillus thuringiensis* on some biological and enzymes activity of cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd)”. *Bull Ent Sic Egypt Econ Ser*, 32, 171–185.
- [121] Ali, N. S., Ali, S. S. ve Shakoori, A. R. (2014). “Biochemical response of malathion-resistant and -susceptible adults of *Rhyzopertha dominica* to the sublethal doses of deltamethrin”. *Pakistan J Zool*, 46 (2), 853–861.
- [122] Amrutsagar, M. V. ve Joshi, S. S. (2017). “Insect repellent induced lipid diversions of *Periplaneta americana*”. *Int J Rec Sci Res*, 8 (7), 18370–18372.
- [123] Singer, M. A. ve Lindquist, S. (1998). “Multiple effects of trehalose on protein folding in vivo and in vitro”. *Mol Cell*, 1, 639–648.
- [124] Crowe, J. H. (2007). “Trehalose as a “Chemical chaperone” fact and fantasy”. *Molecular aspects of the stress response: Chaperones, membranes and networks*, 143-158.