

**T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SULFOXAFLOK' UN *Galleria mellonella*'NİN GELİŞİMİNE VE
BAZİ BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

EMEL ALP

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADİYAMAN, 2021

ÖZET

Doktora Tezi

SULFOXAFLOK' UN *Galleria mellonella*'NIN GELİŞİMİNE VE BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİSİ

Emel ALP

Adıyaman Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mustafa COŞKUN
Yıl : 2021, 132
Jüri : Doç.Dr. Tamer KAYIŞ
: Doç. Dr. Ertan YOLOĞLU
: Dr.Öğr.Üyesi Pınar ÖZALP
: Dr.Öğr.Üyesi Mehmet SULANÇ

Yapılan çalışmada Sulfoxaflor'un farklı konsantrasyonlarının (0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1 µg/20 g besin) model organizma *Galleria mellonella* larvalarında bazı enzim aktivitelerine, total hemosit sayısına, mikronükleus oluşumuna, MDA düzeylerine ve gelişimine etkisi araştırıldı. Besinin Sulfoxaflor içeren bütün konsantrasyonlarında (0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1 µg/20 gr besin) *G. mellonella* larvalarının SOD, CAT, APX aktivitesi ve MDA miktarı kontrole göre artış gösterdi. Besinin 1 µg Sulfoxaflor içermesi durumunda gerek kontrole gerekse diğer konsantrasyonlara göre GST aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü görüldü. Denenen tüm konsantrasyonlarda PO aktivitesinin kontrole göre azaldığı belirlendi. Sulfoxaflor oranındaki artışa bağlı olarak protein, karbonhidrat ve lipid miktarında kontrole göre düşüşler gözlemlendi. Toplam hemosit sayısının denenen konsantrasyonlarda (0.01, 0.10, 0.25 µg) kontrol ile karşılaştırıldığında arttığı fakat yüksek konsantrasyonlarda (0.50, 1.00 µg) kontrole göre önemli ölçüde azalma görüldü. Mikronükleus oluşumu yüksek konsantrasyonlar olan 0.50 ve 1.00 µg da kontrole oranla önemli miktarda artış gösterdi. Comet analizi sonucu genotoksik hasar olduğu belirlendi. Sulfoxaflor'un denenen tüm konsantrasyonlarının kontrol ile karşılaştırıldığında *G. mellonella* erginlerinin bıraktıkları toplam yumurta sayısını, açılan yumurta sayısını ve açılan yumurtaların yüzdesini düşürdüğü görüldü. Sulfoxaflor uygulamasına bağlı olarak, larval gelişim süresinin, kontrol grubuna kıyasla uzadığı görüldü. Aynı şekilde pup olma ve ergin olma süresinin uzadığı görüldü. Çalışmamız Sulfoxaflor'un model organizma *G. mellonella* üzerindeki negatif etkilerini açıkça göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Sulfoxaflor; *G. mellonella*; Antioksidan enzimler; Büyüme ve gelişme

ABSTRACT

Doctoral thesis

SULFOXAFLOL' UN *Galleria mellonella*'NIN GELİŞİMİNE VE BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİSİ

Emel ALP

Adiyaman University
Graduate School of Education
Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa COŞKUN
Year : 2021 , 132
Jury : Assoc.Prof.Dr. Tamer KAYIŞ
: Assoc.Prof.Dr. Ertan YOLOĞLU
: Asst. Prof. Dr. Pınar ÖZALP
: Asst. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ

The effects of different concentrations of Sulfoxaflor (0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 µg/100 g nutrient) on some enzyme activities, total hemocyte count, micronucleus formation, MDA levels and development in model organism *Galleria mellonella* larvae were investigated in the study. SOD, CAT, APX activity and MDA amount of *G. mellonella* larvae increased in all concentrations of the food containing Sulfoxaflor (0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1 µg/20 g of food). When the food contained 1 µg of Sulfoxaflor, GST activity was found to decrease significantly compared to both control and other concentrations. It was determined that PO activity decreased in all tested concentrations compared to the control. Due to the increase in the sulfoxaflor ratio, decreases in the amount of protein, carbohydrate and lipid were found out compared to the control. It was found out that the total number of hemocytes increased in the tested concentrations (0.01, 0.10, 0.25 µg), but decreased significantly in higher concentrations (0.50, 1.00 µg) compared to the control. Micronucleus formation increased significantly at high concentrations of 0.50 and 1.00 µg compared to control. Comet analysis determined that there was genotoxic damage. When all tested concentrations of Sulfoxaflor were compared with the control, *G. mellonella* adults were found out to reduce the total number of eggs laid, the number of urgent eggs and the percentage of urgent eggs. Depending on the Sulfoxaflor application, it was observed that the duration of larval development prolonged compared to the control group. In the same way, it was seen that the duration of pup and adult was prolonged. Our study clearly demonstrated the negative effects of Sulfoxaflor on the model organism *G. mellonella*.

Key words: Sulfoxaflor; *G. mellonella*; Antioxidant enzymes, Growth and development

DESTEKLER

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEFDP/2020-0001 numaralı proje ile desteklenmiştir.



BEYAN

‘Sulfoxaflor’un *Galleria mellonella*’nın gelişimine ve bazı biyokimyasal parametrelerine etkisi” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Emel ALP

imza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve Doktora eğitimim süresince tez danışmanlığımı yapan, akademik hayatımın en önemli basamaklarında benimle birlikte olan, bana her türlü konuda yol gösteren insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa COŞKUN'a, ayrıca doktora eğitimim sırasında bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Tamer KAYIŞ'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Barış TANRIVERDİ' ye çok teşekkür ederim.

Zorlu ve uzun olan bu sürecin ilk gününden beri çalışmalarımda sabır gösteren ve yardım eden, bütün telaşlarıma nazlarıma stresime ortak olan, her fırsatta güçlü olduğumu hatırlatan canım eşim Hüseyin ALP' e, onu ihmal etmeme rağmen çalışmama sürekli izin verdiği için oğlum Emre'ye ve tezimi yazdığım dönemde ailemize katılıp neşe verdiği için kızım Ezgi'ye teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitime beni yönlendiren ve her zaman destekleyen babam Ali YALÇINKAYA ve sevgisini esirgemeyen annem Fatma YALÇINKAYA'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca yardımlarından dolayı emektar ablam Zeliha DOĞAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan Adıyaman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım. Doktora tezi projemizi (FEFDP/2020-0001) maddi olarak destekleyen Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin akademik ve idari personeline teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
DESTEKLER.....	IV
BEYAN.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLO DİZİNİ	XI
RESİMLER DİZİNİ.....	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Oksidatif Stres.....	3
1.2. Reaktif Oksijen Türleri	4
1.3. Antioksidan savunma sistemleri	7
1.3.1. Enzimatik antioksidan savunma sistemi	8
1.3.1.1. Katalaz (CAT) (CAT; EC: 1.11.1.6).....	8
1.3.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC.1.15.1.1)	9
1.3.1.3. Glutasyon S Transferaz (GST; EC 2.5.1.18).....	9
1.3.1.4. Glutasyon peroksidaz (GPX, EC 1.11.1.9).....	10
1.3.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2)	11
1.3.1.6. Fenoloksidaz (PO).....	11
1.3.1.7. Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11).....	13
1.3.2. Nonenzimatik savunma sistemi	14
1.3.2.1. Glutasyon.....	14
1.3.2.2. Ürik asit.....	14
1.3.2.3. Melatonin	15
1.3.2.4. Albümin	15
1.3.2.5. Askorbik asit (C vitamini).....	15
1.3.2.6. Selenyum.....	16
1.3.2.7. β-karoten	16
1.3.2.8. α-Tokoferoller	16
1.4. Serbest Radikallerin Etkileri	16
1.4.1. Proteinlere etkileri.....	16
1.4.2. Karbonhidratlara etkileri	17
1.4.3. Lipidlere etkileri.....	18
1.4.4. Hemositlere etkileri.....	19
1.4.5. Mikronükleus oluşumuna etkisi	19
1.4.6. DNA üzerine etkileri: Comet Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	20
1.4.7. <i>G.mellonella</i> ’ nın genel özellikleri ve yaşam döngüsü üzerine serbest radikallerin etkisi.....	21
1.5.1. Yumurta	23
1.5.2. Larva	23

1.5.3. Pupa.....	23
1.5.4. Ergin.....	23
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. <i>G.mellonella</i> ‘nın elde edilmesi	30
3.1.2. Kontrol besinin hazırlanması	30
3.1.3. Deney besinlerinin hazırlanması	31
3.1.3.1. Deney gruplarının hazırlanması.....	31
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Böceklerin Homojenizasyonu	32
3.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesinin tayini.....	33
3.2.3. Katalaz (CAT) aktivitesinin tayini	35
3.2.4. Glutatyon S-Transferaz (GST) Yöntemi	36
3.2.5. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi	37
3.2.6. Fenoloksidaz (PO) aktivitesi tayini.....	39
3.2.7. MDA(Malondialdehyde) tayini.....	40
3.2.8. Protein Tayini.....	41
3.2.9. Karbohidrat ve Lipid Miktarının Tayini İçin Böceklerin Homojenizasyonu.....	42
3.2.10. Lipid Miktarının Tayini	43
3.2.11. Karbohidrat Miktarının Tayini.....	44
3.2.12. Toplam Hemosit Sayıları	45
3.2.13. Mikronükleus Sayılarının Belirlenmesi	47
3.2.14. Comet analizi (Tek hücre elektroforezi) protokolü.....	48
3.2.15. Sulfoxaflor’un <i>G.mellonella</i> ’nın Biyolojisine Etkisi	50
3.2.15.1. Son Larval evreye ulaşma süresi.....	51
3.2.15.2. Pup sarma süresi.....	51
3.2.15.3. Ergin olma süresi	52
3.2.15.4. Ergin Yaşam Süresi.....	52
3.2.15.5. Son larval evreye ulaşma oranı	52
3.2.15.6. Puplaşma ve erginleşme oranı.....	53
3.2.15.7. Erkek ve dişi ömür uzunluğu	53
3.2.15.8. Toplam Yumurta Sayısı	53
3.3. Verilerin istatistiksel analizi.....	54
4. BULGULAR.....	55
5.TARTIŞMA	87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	104
KİŞİSEL BİLGİLER.....	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Oksidatif stres ile ilgili reaktifler	5
Çizelge 1.2 Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu	6
Çizelge 1.3 Antioksidan savunma sistemleri	8
Çizelge 3.1 Sulfoxaflor içerikli besin ve miktarları	31
Çizelge 3.2 SOD aktivitesi ölçüm prosedürü	34
Çizelge 3.3 CAT aktivitesi ölçüm prosedürü	35
Çizelge 3.4 Glutasyon-S-Transferaz yöntemi	36
Çizelge 3.5 Askorbat Peroksidaz yöntemi	38
Çizelge 3.6 Protein miktarı ölçüm prosedürü	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Sulfoxaflor'un kimyasal yapısı.....	3
Şekil 1.2 Süperoksit radikallerinin oluşum mekanizması ve antioksidan enzimler...	10
Şekil 1.3 Fenoloksidaz enzimi aktivasyon sistemi.....	13
Şekil 4.1 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarında SOD aktivitesi üzerine etkisi ...	58
Şekil 4.2 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarında CAT aktivitesi üzerine etkisi ...	59
Şekil 4.3 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarında GST aktivitesi üzerine etkisi ...	59
Şekil 4.4 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarında APX aktivitesi üzerine etkisi ...	60
Şekil 4.5 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarında MDA miktarı üzerine etkisi.....	61
Şekil 4.6 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> hemolenfinde PO aktivitesi üzerine etkisi ...	62
Şekil 4.7 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarında PO aktivitesi üzerine etkisi.....	62
Şekil 4.8 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarında Protein miktarı üzerine etkisi...	65
Şekil 4.9 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarında Karbonhidrat miktarı üzerine etkisi	66
Şekil 4.10 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarında Lipid miktarı üzerine etkisi ...	67
Şekil 4.11 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının hemosit sayısı üzerine etkisi...	69
Şekil 4.12 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının mikronükleus oluşumu üzerine etkisi	70
Şekil 4.13 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının genotoksik hasarı üzerine etkisi	73
Şekil 4.14 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarındaki comet görüntüsü	74
Şekil 4.15 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> ergin dişilerinin bıraktıkları toplam yumurta sayısı etkisi	76
Şekil 4.16 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> ergin dişilerinin açılan yumurtaların sayısına etkisi	77
Şekil 4.17 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> ergin dişilerinin açılan yumurtaların yüzdesine etkisi	78
Şekil 4.18 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının Son larval evreye ulaşma süresine etkisi	80
Şekil 4.19 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının pup olma süresine etkisi	81
Şekil 4.20 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının erginleşme süresine etkisi	81
Şekil 4.21 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının son larval evreye ulaşma oranına etkisi	82
Şekil 4.22 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının pup olma oranına etkisi	83
Şekil 4.23 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının erginleşme oranına etkisi.....	83
Şekil 4.24 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> 'nın erkek ve dişi bireylerinin ömür uzunluğuna etkisi	86

TABLO DİZİNİ

Tablo 4.1 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının SOD, CAT, GST, APX aktivitelerine ve MDA miktarlarına etkileri	56
Tablo 4.2 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının PO enzimi aktivitesine etkisi...	57
Tablo 4.3 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının Protein, Lipid ve Karbonhidrat miktarlarına etkisi	64
Tablo 4.4 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının hemosit sayısı ve mikronükleus oluşumuna etkisi	68
Tablo 4.5 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının DNA'sı üzerine etkisi (comet analizi)	72
Tablo 4.6 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarından erginleşen bireylerin bıraktıkları toplam yumurta sayısı, açılan yumurta sayısı, açılan yumurtaların yüzdesi üzerine etkisi	75
Tablo 4.7 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının Son larval evreye ulaşma süresi, pup olma süresi, ergin olma süresi, Son larval evreye ulaşma oranı, pup olma oranı, erginleşme oranı üzerine etkisi	79
Tablo 4.8 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> 'nın erkek ve dişi bireylerinin ömür uzunluğuna etkisi	85

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1 <i>G.mellonella</i> 'nın yumurta, larva, pupa ve ergin hali.....	24
Resim 3.1 Hemosit sayımı	46
Resim 3.2 Neubauer hemositometre lamı	46
Resim 3.3 Neubauer Hemositometresi sayım alanı	47
Resim 3.4 Mikronükleus sayımı için hazırlanan preparatlar	48
Resim 3.5 Deney besinlerinin içinde bulunduğu kaplar	51
Resim 3.6 İçinde pelür kağıt ve son evre larvalarının bulunduğu kaplar	52
Resim 3.7 Açılan yumurtaların mikroskopik görüntüsü.....	54
Resim 4.1 Hemositlerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	69
Resim 4.2 <i>G. mellonella</i> larvalarının hemositlerindeki mikronükleuslu hücreler	71
Resim 4.3 Sulfoxaflor'un <i>G. mellonella</i> larvalarının erginleşen bireylerinin bıraktıkları toplam yumurta sayısına ilişkin ışık mikroskobu görüntüsü ..	76
Resim 4.4 <i>G.mellonella</i> 'nın Sulfoxaflor etkisinde açılan yumurtalarının mikroskopik görüntüsü	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

APX	: Askorbat peroksidaz
ALB	: Albümin
AsA	: Askorbat
CAT	: Katalaz
CHCl ₃	: Kloroform
C ₈ H ₈ O ₃	: Vanilin
CH ₃ OH	: Metanol
CDNB	: 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen
C ₆ H ₈ O ₆	: Askorbik asit
CH ₂ O	: Formaldehit
C ₃ H ₆ O	: Aseton
C ₁₄ H ₁₀ O	: Antron
CuCl ₂ .2H ₂ O	: Bakır klorür
C ₂ H ₅ OH	: Etil Alkol
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır sülfat
PO	: Fenoloksidaz
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
GSR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon S- transferaz
GSH	: Glutasyon peroksidaz
HOCl	: Hipokloröz asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
K ₂ HPO ₄	: Potasyum fosfat
KCl	: Potasyum klorür
K ₂ HPO ₄	: Di-Potasyum hidrojen fosfat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
L-DOPA	: L-3,4 Dihidroksifenil alanin
LPO	: Lipid peroksidasyonu
MEL	: Melatonin
MN	: Mikronükleus
MDA	: Malondialdehid
nAChR	: Nikotinik asetilkolin reseptörü
Na ₂ SO ₄	: Sodyum sülfat
NO	: Nitrik oksit
NaCl	: Sodyum klorür
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum sülfat
Na ₂ EDTA	: Di-Sodyum etilendiamin tetraasetik asit
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	: Di-Sodyum hidrojen fosfat

NBT	: Nitrotetrazoliumbluechloride
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
NaCl	: Sodyum klorür
ProPO	: Profenoloksidaz
$\text{RO}\cdot(\text{LO}\cdot)$	: Alkoksil radikali
$\text{ROO}\cdot(\text{LOO}\cdot)$	: Peroksil radikali
$\text{ROOH}(\text{LOOH})$	: Organik hidroperoksit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif azot türleri
ROOH	: Hidroperosit
SOD	: Süperoksit dismutaz
OS	: Oksidatif stres
$^1\text{O}_2$	: Singlet moleküler oksijen
O_2^-	: Süperoksit anyonu
OH	: Hidroksil radikali
UA	: Ürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TBA	: Tiyoarbiturik asit

1. GİRİŞ

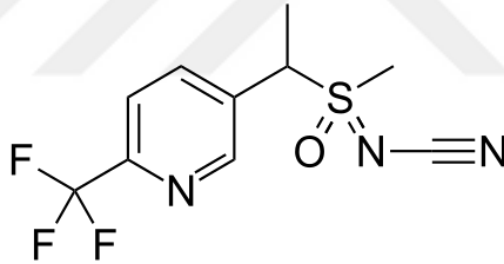
Hızla büyüyen dünya nüfusu karşısında tüketimin de hızla artması nedeniyle yeterli tarım üretimi sağlanamamaktadır. Tarımın sürdürülebilirliği ve hayvansal üretimin sınırlı olması artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamada yetersiz kalmaktadır. [1]. Tarımsal üretimin devamının sağlanması için mahsul verimini korumak amacıyla pestisit adı verilen kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Modern tarım uygulamalarında pestisitler tarımın ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Ancak uzun vadede insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir. Pestisitlerin ilk olarak kullanımı, böcek istilasını azaltmada, tarımsal verimliliği artırmada çok etkili olmuştur. Fakat zamanla hedeflenen zararlıların yok edilmesi ekolojik sistemde bir dengesizlik ortaya çıkarmıştır. Çevreye zararlı olduğu tespit edilen, bazıları topraklarda ve suda yaşayan omurgasızlar ve omurgalıların dokularındaki biyobirikim ile trofik zincirlerden yukarı taşınarak ve üst yırtıcıları etkilemektedir [1]. Örneğin, *Daphnia magna* üzerinde yapılan bir çalışmada, endosülfan sülfatın ekdisteroidal sistem (deri değiştirme ve embriyonik gelişim gibi düzenleyici işlemler) ve kabukluların hormon aktivitesini (cinsiyet oranını ve üremeyi) olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Pestisitlerin bal arıları üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma da erginlerin ortaya çıkmasının gecikmesi gibi sonuçlar ortaya çıkmıştır [2]. Başka bir örnek verilirse üreme hormonu üretiminde linuron sıçanlarda testosteron üretimini önemli ölçüde sağlarken linuron, pestisit maruziyetinden sonra azalırken, progesteron üretimi etkilenmemiştir. İnsan düzeyinde, pestisitlerin de üreme yeteneğini ve cinsel gelişimi bozduğu gösterilmiştir [1] Başka bir çalışma da bağışıklık sistemine verilen hasar ile artan miktarlarda bazı kanserli dokulardaki pestisit kalıntıları gözlenmiştir. Pestisitler insanlar ve diğer canlılar üzerinde istenmeyen etkileri bulunan ve tarım ürünler için potansiyel risk teşkil eden herhangi bir böcek veya zararlının kontrolü amacıyla ortama salınan madde veya maddeler karışımıdır [3]. Pestisit terimi çok çeşitli bileşikleri kapsamaktadır. Bunlar etki ettiği canlı grubuna göre insektisitler, fungisitler, herbisitler, rodentisitler, mollusitler, nematositlerdir. Ölümcül etkiler, pestisitlerin sublethal ya da düşük konsantrasyonlarına maruz kalan ve hayatta kalan bireyler üzerindeki fizyolojik ve davranışsal etkiler olarak tanımlanır. Pestisitlerin

neden olduğu ölümcül etkilere ek olarak, eklembacaklılar üzerinde fizyolojik ve davranışsal değişimlere de yol açmaktadır. Bu etkiler yaşam süresinde azalma, doğurganlık ve yumurtlama davranışındaki değişiklikler, beslenme davranışında gerileme ve gelişme oranının düşmesidir [4].

İnsektisitler tarımda zararlı böceklerin kontrolünde kullanılan pestisitlerdir. Böcekler sürekli kullanılan insektisitlere direnç ve adaptasyon geliştirirken insektisitlerin tarımsal sürdürülebilirliği, çevreyi ve çiftçilerin sağlığını ve de bunların yanı sıra çiftliklerin yakınında yaşayan diğer canlılara da zararlı etkileri olduğu bilinmektedir [5]. İnsektisitler etki şekillerine göre karbamatlar, organofosforlar, pretiroidler, kloroidler, juvenil hormon analogları ve neonikotinoidlerdir [6]. Neonikotinoidler nikotin maddesinin kimyasal yapısı baz alınarak üretilen sentetik insektisitlerdir. Neonikotinoidler diğer insektisitlere oranla daha fazla kullanılır ve emici böceklerin kontrol edilmesi için dayanak noktasıdır fakat böceklerde neonikotinoid insektisitlere karşı direnç geliştiğinden yeni bir insektisit grubu kullanılmaya başlanmıştır [7]. Yedi grup neonik insektisit olduğu bilinmektedir. Bunlar Butenolid, Siyanoiminler, Mezoionik, nitroiminler, nitrometilen, Nikotinoidler ve Sülfoksiminlerdir. Tüm neonikler, benzer bir etki tarzına ve hedef bölgede çapraz dirence sahip nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) agonistleridir ve formüllerindeki bazı önemli farklılıklara rağmen, memeli nAChR'lerine göre böcek üzerinde daha etkilidir. Sülfoksiminler, yeni bir insektisit sınıfını temsil ederler. Azot içeren molekülü sayesinde neonikotinoidlere ve diğer insektisitlere dirençli olan emici böcekler de dahil olmak üzere birçok zararlıya karşı yüksek derecede etkinlik gösterir [5]. Sülfoksiminler böcek nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR) etki eden diğer insektisitlerden farklı bir yere bağlanarak nAChR'leri etkilemektedir [7].

Sülfoksiminler, bitki özsuyla ile beslenen böcekleri hedef alan bir insektisit sınıfıdır. Bu bileşikler memelilerde böceklerden daha düşük toksisiteye sahiptir. Sulfoxaflor, yeni bir alternatif olarak Entegre Zararlı Yönetimi programlarında kullanılan, Dow Agrosiences tarafından geliştirilen ve yeni bir hareket tarzına sahiptir. Sulfoxaflor, bir neonikotinoid olarak kabul edilmez çünkü İnsektisite Dayanıklı Eylem Komitesi tarafından Sulfoximinlerin yeni 4C alt grubundaki benzersiz etki şekli ile sulfoxaflor'un son derece etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Sulfoxaflor yeni kimyası, biyolojik aktivite spektrumu ve çapraz direnç eksikliği ile zararlı kontrolü için önemli yeni bir ajandır, bu nedenle özellikle insektisit direnç yönetimi programlarında yararlıdır, sülfoksamin sınıfından geliştirilmekte olan ilk bileşiktir. Sulfoxaflor [metil (oksido) {1- [6- (triflorometil) piridin-3-il] etil} -lambda (6) -sülfaniliden] siyanamid, içerisinde 5-etil-2-triflorometilpiridin olan piridin sınıfının bir üyesidir. Etil grubu 1. pozisyonunda bir N-siyano-S-metilsülfonimidoil grubu ile adlandırılır. Sulfoxaflor, iki tetrahedral dört stereoizomerin bir karışımıdır. Piridinlerin bir üyesi, bir sülfoksimid, bir nitril ve bir organoflorin bileşiğidir. Sulfoxaflor sistemik bir insektisittir, etkilenen böceklerde nörotoksin etki gösterir ve öldürür. Sulfoxaflor, asetilkolin yerine nAChR'lere bağlanır ve diğer neonikotinoidlerden veya nikotinik aktif bölgelerden farklı olduğu düşünülen bir bölgeye bağlanarak bunu sağlamaktadır. Sulfoxaflor bağlanması, kas titremesi ve ardından felç ve ölüm ile sonuçlanan kontrolsüz sinir uyarılarına neden olur [5].



Şekil 1 Sulfoxaflor'un kimyasal yapısı [8]

1.1. Oksidatif stres

Çeşitli kimyasalların (pestisitler, ilaçlar, metaller, duman, anormal oksijen konsantrasyonu, vb.), fiziksel (radyasyon, sıcaklık, gürültü, titreşim vb.) ve fizyolojik (hastalıklar, yaralanma, yaşlanma, inflamasyon, vb.) stres faktörleri fonksiyonel homeostaziye bozabilecek bir stres durumuna neden olabilirler. Böyle bir durum oksidatif stres (OS) olarak adlandırılır [9]. Detoksifikasyon sistemlerinin eşzamanlı bozulması ile reaktif oksijen türleri (ROT) oluşmaktadır. Oksidatif stres, ROT' un üretim ve eleme süreçleri arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Organizmada

ki tüm süreçleri olmasa da çoğunu etkileyebilmektedir. Oksidatif stres durumunda ROT'un geçici ya da kalıcı olması hücrel bileşenlerin zarar gördüğü bilinmektedir. [9]. Artan ROT konsantrasyonları proteinlere, lipidlere ve nükleik asitlere oksidatif hasar verir ve böylece hücrelerin, organların veya tüm organizmanın fonksiyonlarını ciddi şekilde bozarak ölüme yol açabilir [10]. Teorik olarak, OS dört aralığa bölünebilir: bazal, düşük yoğunluklu, orta ve yüksek yoğunluklu OS sırasıyla BOS, LOS, IOS ve HOS olarak kısaltılabilir [10]. Farklı yoğunluktaki oksidatif strese tepki olarak farklı sistemler görev yapmaktadır. Organizmalar sinir sistemi tarafından kontrol edilen etkili savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Böceklerde, anti-OS reaksiyonları ağırlıklı olarak corpora'dan salgılanan adipokinetik hormonlar tarafından düzenlenmektedir [11].

1.2. Reaktif oksijen türleri

ROT, normal hücrel metabolizma sırasında aerobik organizmalar tarafından üretilir. Oksijen, aerobik yaşam süreçleri için gereklidir, ancak kullanılan oksijenin yaklaşık% 1 -% 3'ü veya daha fazlası solunumda oksijenin redüksiyonu ile süperoksit anyonu O_2^- , hidroksil radikali $\cdot OH$ ve hidrojen peroksit H_2O_2 gibi ROT'a ve perhidroksil radikali, nitrik oksit (NO) ve peroksinitrite dönüştürülür [9]. Böylece ROT, düşük ile orta konsantrasyonlarda üretildiğinde, çeşitli fizyolojik hücrelerde işlev görür, ancak yüksek konsantrasyonlarda hücrel bileşenler üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. Lipid, protein, karbonhidrat, antioksidan enzimler, kan hücreleri ve DNA modifikasyonlara sebep olmaktadır. ROT'un sitotoksik etkileri genel olarak nötralize edilir. Bir dizi karmaşık enzimatik ve enzimatik olmayan detoksifikasyon mekanizması ROT'un zararlı etkileriyle mücadele etmek için gelişmiştir. Bu nedenle, her zaman ROT üretimi ile güçlü antioksidan sistemler arasında dinamik bir denge vardır. Ancak, ROT üretimi ve antioksidan savunma sistemi arasında oksidanlar lehine değişimler oluşabilmektedir. Bu nedenle OS, oksidasyonun antioksidan sistemlerini aştığı bir durum olarak tanımlanabilir. Daha önce de belirtildiği gibi, hücrel homeostaz, lipid peroksidasyonu, protein hasarı, oksidatif hasar gibi olaylarla sonuçlanır [11].

Çizelge 1.1 Oksidatif stres ile ilgili reaktifler [11]

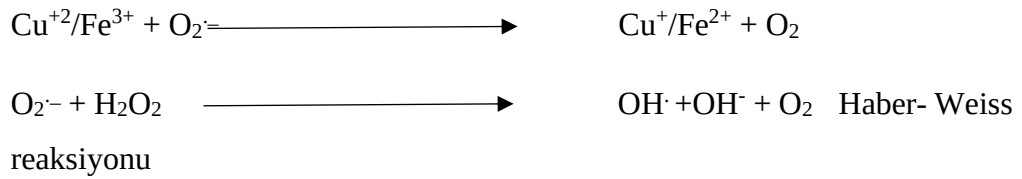
*O ₂ ^{•-}	Süperoksit anyonu	Tek elektron redükte durum
*H ₂ O [•]	Perhidroksil anyonu	Protonlaşmış O ₂ ^{•-} , oldukça lipid çözünür
*H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit	O ₂ ^{•-} ya da O ₂ den oluşur
*OH [•]	Hidroksil radikali	Fazla reaktiftir
*RO [•] (LO [•])	Alkoksil radikali	Organik radikal
*ROO [•] (LOO [•])	Peroksil radikali	Organik hidroperoksitten oluşur
*ROOH(LOOH)	Organik hidroperoksit	
* ¹ O ₂	Singlet moleküler oksijen	
RO []	Ekşite karbonil	
*HOCl	Hipokloröz asit	Nötrofillerde oluşur

ROT, serbest radikaller ve radikal olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Öte yandan, iki serbest radikal eşleştirilmemiş elektronlar paylaştıkları zaman radikal olmayan formlar oluşur. Burda *in vivo* ortamlarda toksik etkiler oluşturan hidroksil radikali (*OH), süperoksit anyonları (O₂⁻), (O₂) ve perhidroksi radikalleri (HOO), ROT tarafından ve nitroksil radikali (NO) RNS tarafından oluşturulmaktadır. Hidroksi radikali üretildiği birçok yerde moleküller ile tepkimeye girebilen en toksik ve en aktif oksijen radikalidir. Perhidroksi radikali, süperoksit anyonlarının protonlanmasıyla meydana gelir. Nitroksil radikali ise gaz halinde bulunan çözünebilir bir serbest radikaldir. Radikal olmayanlar ise H₂O₂, organik hidroperoksitler (ROOH) ve hipokloröz asittir (HOCl) [12]. Aerobik solunum da süperoksit anyon radikalinin

üretimi için ana alan mitokondridir yani canlı organizmalarda aerobik koşullar altında tüketilen oksijenin %90'ından fazlası ROT salımı olmadan dört elektronlu mekanizmalar yoluyla elektron taşıma zincirinde sitokrom oksidaz ile doğrudan suya indirgenir. Tüketilen oksijenin %10'undan daha azı ise dönüşümle ardışık yollar aracılığıyla tek elektronlu süperoksit anyon radikaline ve moleküler oksijene (O_2) bunu takiben iki protonun eşzamanlı kabulü ile tek elektron indirgemesiyle H_2O_2 elde edilir. Özetlemek gerekirse moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu H_2O_2 oluşur, [10] ancak bu işlem sırasında tüm elektronların %1-3'ü sistemden sızar ve süperoksit anyon radikalleri üretir. Süperoksit anyon radikalleri lökositler, monositler ve makrofajlar tarafından fagositik aktivite sırasında üretilir.

H_2O_2 serbest bir radikal değildir fakat serbest radikal kimyasında önemli bir yer tutmaktadır. Biyolojik sistemlerde H_2O_2 Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en fazla hasar veren hidroksil radikalini (OH) oluşturmaktadır. Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamda geçiş metalleri veya Fe^{2+} nin bulunması gereklidir. OH , biyolojik sistemler üzerinde etkisi bulunan ve meydana geldiği yerde dönüşümsüz hasarlara sebep olabilen bir oksidandır. ROT'nin en güçlüsüdür ve lipid peroksidasyonunda rol oynar [13].

Çizelge 1.2 Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu [13]



O_2^- tek başına H_2O_2 ile reaksiyona girebilir ve OH^- üretebilir [13]. Bir organizmayı etkileyen ve ROT oluşumuna yol açan birkaç ekzojen oksidan vardır.

İyonlaştırıcı radyasyon: Oksijenin varlığında, süperoksit anyon radikalleri, H_2O_2 ve organoperoksitlere karşı diğer organik radikaller iyonlaştırıcı radyasyon hidroksil radikallerini dönüştürebilir. Bu hidroperoksit türlerinin Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi redoks aktif metal iyonları ile Fenton yolu reaksiyonu ile OS indüksiyonuna yol açar.

Ozona maruz kalma: Lipid peroksidasyonuna neden olabilir.

Kirleticilerden gelen ağır metal iyonları: Demir, bakır, kadmiyum, cıva, nikel gibi ağır metal iyonları, kurşun ve arsenik ROT oluşumunu indükleyebilir ve hücrel hasara yol açabilir. Önemli bir metal katalizli serbest radikal oluşumunun mekanizması, yukarıda tarif edilen Fenton tipi reaksiyonlar yoluyla. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları dışında, bazı metal iyonları hücredeki bazı moleküllerle doğrudan etkileşime girebilir ve serbest radikaller oluşturabilirler. Bu radikaller ayrıca O_2^- üretmek için diğer tiol molekülleri ile reaksiyona girebilir. Ayrıca, $O_2^- \cdot H_2O_2$ 'ye dönüştürülür, bu da ek oksijen radikal oluşumuna neden olur [11].

Pestisitler: ROT'un herbisitler ve böcek öldürücüler gibi çevresel kontaminantlara maruz kalarak sürekli olarak üretildiğini göstermektedir [11].

1.3. Antioksidan savunma sistemleri

Antioksidan savunma sistemi organizmada çeşitli faktörlerin neden olduğu oksidatif stres sonucu artan ROT'u yok etmek amaçlayan bir sistemdir. ROT'u ortadan kaldıran veya olumsuz etkilerini en aza indiren bu sistemlere antioksidan savunma sistemi denir. Bu sistemlere çoğunlukla moleküler kütlelerine göre sınıflandırma yaklaşımları bulunmaktadır. Bu yaklaşıma göre antioksidanlar iki gruba ayrılır: Düşük moleküler kütle antioksidanları radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (genellikle bir kilodaltonun altında moleküler kütleleri olan) yüksek moleküler kütle antioksidanları radikal oluşumunu önleyen (moleküler ile kütle birden fazla veya aslında on kilodaltondan daha yüksek) sistemlerdir Düşük orandaki ROT miktarı antioksidan savunma sisteminden kaçarak OH radikaline dönüştürülebilir. Düşük moleküler kütleli antioksidan sistemi OH radikalinin oluşumunu engellemekte ve yok edilmektedir.

Düşük moleküler kütle antioksidanlar grubu kimyasal olarak C vitamini (askorbik asit) ve E vitamini (tokoferol), karotenoidler, antosiyaninler, polifenoller ve ürik asit gibi genellikle iyi bilinen farklı bileşikler içerir. Çoğu gıda veya takviye bileşenleri olarak insanda önemli bir yere sahiptir. Oksidatif stres sonucu ortamda artan serbest radikalleri yok etmek amacıyla hücrelerde devamlı olarak enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar meydana gelmektedir. [11].

Çizelge 1.3 Antioksidan savunma sistemleri [11].

Enzimatik antioksidan savunma sistemi	Nonenzimatik savunma sistemi
*Katalaz (CAT)	*Albümin
*Süperoksit dismutaz (SOD)	*Ürik asit
*Glutasyon S- transferaz (GST)	*Transferrin
*Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	*Ferritin
*Glutasyon redüktaz (GSR)	*Laktoferrin
*Askorbat peroksidaz (APX)	*Melatonin
*Fenoloksidaz (PO)	*Sistein Glutasyon (GSH)
	* α -Tokoferol (vit E)
	*Askorbat (vit C)
	* β -Karoten
	*Flavonoidler
	*Ürat
	*Bilirubin

1.3.1. Enzimatik antioksidan savunma sistemi

Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon redüktaz (GR), Glutasyon peroksidaz (GPx), Fenoloksidaz (PO), Askorbat peroksidaz (APX) enzimatik savunma hattını oluşturan enzimatik antioksidanlardır [14].

1.3.1.1. Katalaz (CAT) (CAT; EC: 1.11.1.6)

Enzimatik antioksidanlardan biri olan katalaz 60 kDa ağırlığında ve aynı yapıya sahip dört tetrahedral alt birime sahip olan her molekülde dört tane ferriprotoporfirinler içeren bir hem-enzimdir. Her alt birimde hem grubuyla birlikte NADPH molekülü bulunmaktadır. Eritrosit, karaciğer, böbrek ve kemik iliği gibi canlı organizmanın dokularında ve hücrede peroksizomlar, mitokondri ve endoplazmik

retikulumda bulunur. CAT, H₂O₂' i parçalayarak suya ve oksijene dönüştürülür [15]. Bu durum aşağıdaki tepkimede gösterilmiştir [16].



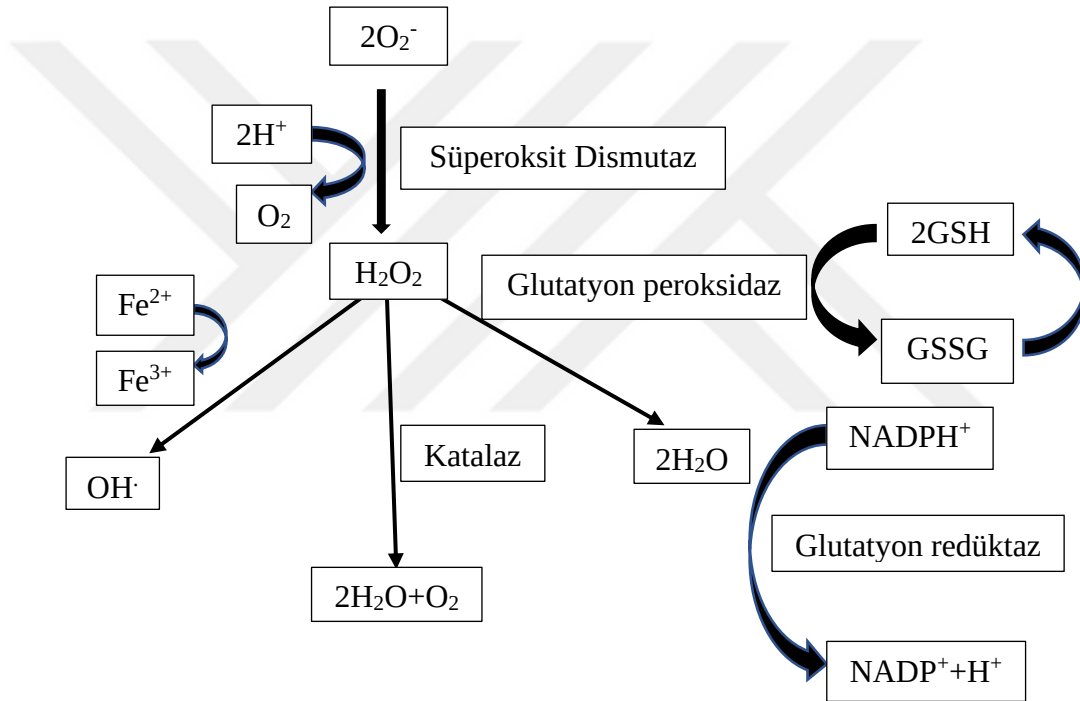
1.3.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC.1.15.1.1)

Süperoksit Dismutaz (SOD), süperoksitin H₂O₂ 'e dismutasyonunu katalizleyen ilk enzimatik adımı oluşturur. Yani süperoksit anyonlarını temizler ve H₂O₂ ve oksijene dönüştürerek bunları detoksifiye eder. Sitoplazma da bulunan çinko (Cu, Zn-SOD veya SOD1) ve bakır bulunduran bir SOD dimerik proteinidir. Mitokondride bulunan manganez (Mn-SOD veya SOD2) içeren bir SOD homotetramerik proteinidir. Hücre dışında Cu ve Zn (EC-SOD veya SOD3) içeren bir SOD tetramerik glikoproteindir. Ayrıca hücrelerde en bol bulunan sitozolik form olan CuZn-SOD'dır. CuZn-SOD enziminin en önemli fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücrelerde meydana gelen süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı hücreyi korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. [15].

1.3.1.3. Glutasyon S Transferaz (GST; EC 2.5.1.18)

Glutasyon S Transferaz bitkiler de dahil olmak üzere mikroorganizmalar ve hayvanlarda hemen hemen her türde bulunmaktadır. Hücresel yerlere göre, GST'ler sitozolik, mikrozomal ve mitokondriyal olarak adlandırılır. Böceklerde keşfedilen böcek GST'leri esas olarak sitozolde bulunmaktadır. Genellikle sitosolik GST'ler 200-250 amino asit ve mikrozomal GST 150 amino asite sahiptir. GST'ler amino asit sekanslarına ve immünolojik, kinetik ve yapısal özelliklere göre yedi alt sınıfa (Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta, Mu ve Zeta) ayrılır. Altı alt sınıf (Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Teta ve Zeta) böceklerde bulunur. Sigma sınıfı GST'ler en büyük GST alt aileleridir. Böceklerde bulunan GST'ler artan insektisit toksisitesinden kaynaklanan oksidatif strese karşı dirence yol açmaktadır [17]. GST'ler çeşitli reaktif

türlerin konjugasyonu ve lipid peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonu ile oksidatif hasarı önleyen detoksifikasyon enzimleri ailesidir. GST'lerin insektisitlerin organizmanın vücudunda zehirlilik oranının azaltılmasıyla oluşan ara ürünleri yok ederek bunların zararlarına karşı koruma sağladığı bilinmektedir [18]. Ara ürünlerin oluşturulması Faz 1 reaksiyonları olarak bilinirken ara ürünlerin yok edilmesi ise Faz 2 reaksiyonlarının görevidir. GST, Faz 2 reaksiyonlarında görev almaktadır. Glutasyon konjugasyonu, merkapturik asit yolunda toksik bileşiklerin ortadan kaldırılmasına yol açan ilk adımdır [19].

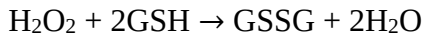


Şekil 1.2 Serbest radikallerin oluşum mekanizması ve antioksidan enzimler

1.3.1.4. Glutasyon peroksidaz (GPX, EC 1.11.1.9)

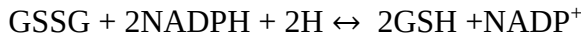
Glutasyon peroksidazların selenyuma bağımlı GPX ve selenyumdan bağımsız GPX olmak üzere iki çeşidi vardır. Memeli hücreleri selenyuma bağımlı GPx'lerin beş izoformunu içerir: sitozolik GPx (GPx1), gastrointestinal GPx (GPx2), plazma GPx (GPx3), fosfolipid hidroperoksit GPx (GPx4) ve insanlarda sadece koku sisteminde GPx5 bulunur. Sitozolik hücresel GPx olarak da adlandırılan GPx1, en önemli GPx

izoformudur ve GSH'yi bir indirgeyici madde olarak kullanarak lipid peroksidasyonu ile oluşan H_2O_2 ve lipidi metabolize eder. GSH için bir dizi organik peroksidi azaltabilir. Böylece H_2O_2 'den $OH\cdot$ 'nin oluşmasını engeller. GPX düşük konsantrasyondaki H_2O_2 'ye karşı aktif iken CAT daha çok yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'ye karşı aktif hale gelir. Bu antioksidan enzimin yokluğunda, ROT birikimine bağlı olarak proteinler, lipidler ve DNA zarar görür. [20]. Aşağıdaki denklemlerde GPX' in gerçekleştirdiği tepkimeler görülmektedir.



1.3.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2)

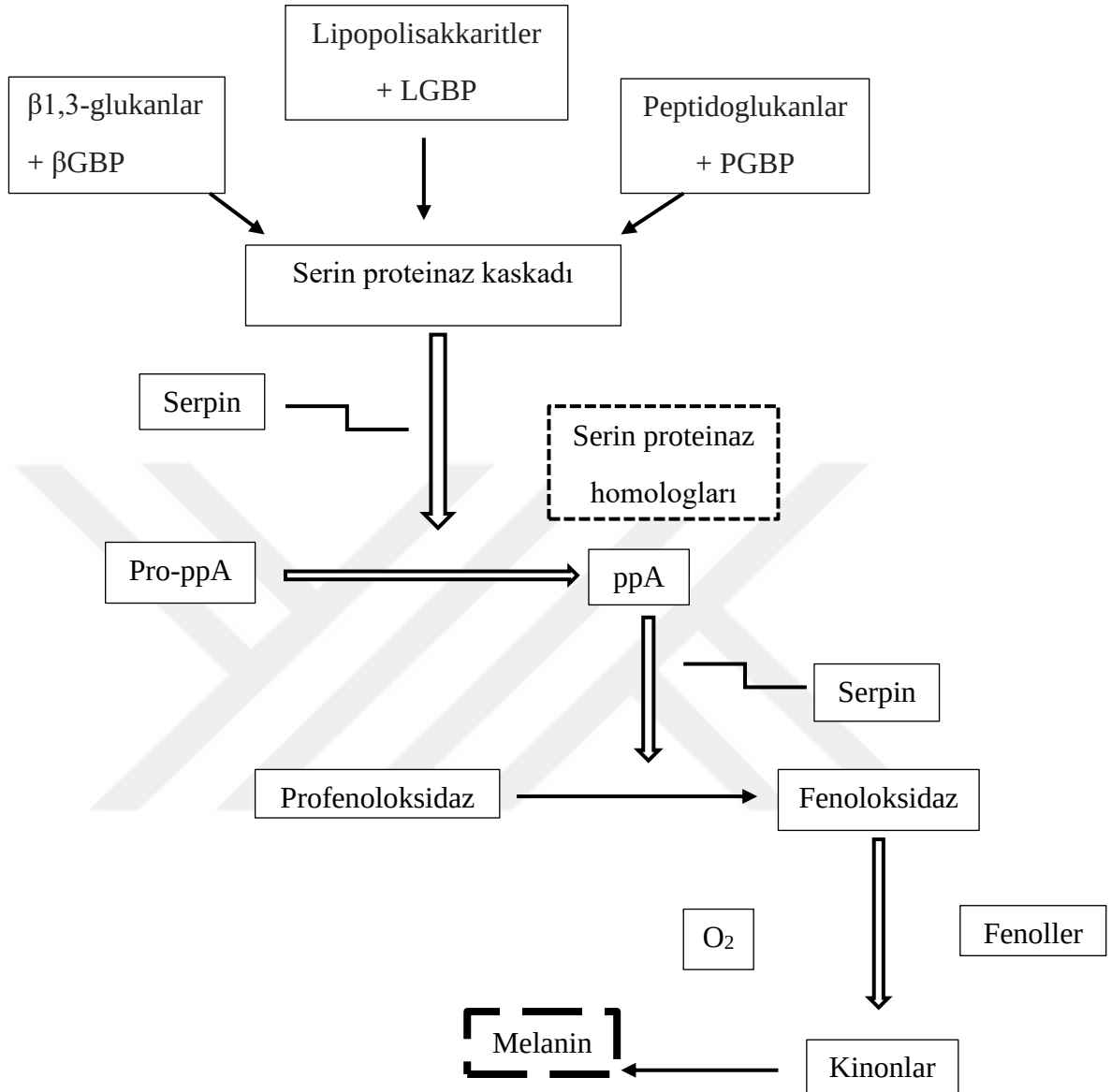
Glutasyon Redüktaz, hücre sitoplazmasında ve mitokondrilerde bulunur. GR enziminin katalizlediği reaksiyonun en önemli amaçlarından biri hücre ortamındaki indirgenmiş ve yükseltgenmiş durumdaki glutasyon (GSH/ GSSG) oranını korumaktır. Bu işlevini yerine getirirken NADPH'ın bir elektronunu okside glutatyona aktararak yeniden GSH'ye dönüştürülür. Hidroperoksitlerin detoksifikasyonu sonucu GSSG oluştuğu için GR hücre içi glutasyon indirgeme/yükseltgeme olayında çok önemli bir göreve sahiptir. GR, glutasyon peroksidaz ile birlikte hücre içinde hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasında rol alır. Aşağıdaki denklemde indirgenme yükseltgenme reaksiyonu verilmiştir [20].



1.3.1.6. Fenoloksidaz (PO)

Böceklerdeki bağışıklık mekanizmalarından biri profenoloksidaz enzimidir [21]. Fenoloksidazın (PO) aktif olmayan haliyle bilinen profenoloksidaz (proPO)

böceklerde bulunmaktadır. Böceklerde kütikular melanizm ve bazı doğal bağışıklık tepkileri ortak fizyolojik yolları paylaşırlar. Fenoloksidaz (PO) melanin sentezinin kilit enzimi olup hemolimf, bağırsak ve kütikulada bulunur. Melanin oluşması için proPO'nun PO'ya dönüşmesi gerekmektedir. ProPO inaktif formun aktif forma dönüşebilmesi için proteaz kaskadlarına ve proPO aktive edici proteinazlara (PAP) ihtiyacı vardır. Daha sonrasında ise tirozinden melanin pigmenti oluşana kadar bir dizi olaylar gerçekleşmektedir [21]. Melanin ve öncülleri bakteri, fungus ve virüslere kadar uzanan patojenlere karşı geniş bir yelpazede koruyuculuk sağlar. Melaninin böceklerde patojene karşı direnç bağlamında iki yönlü rolü vardır: ilki, patojenlere karşı kütikulada fizikokimyasal bir bariyer olarak ve ikincisi, böcek vücudu içerisine girmiş patojenlerin etrafında birikerek hareketsiz hale getirerek sağlamaktadır. Bir böcek hemolimfinde patojenle karşı karşıya geldiğinde hemositler patojenlerin etrafına birikerek etkisiz hale getirmesi enkapsülasyon tepkisidir. Hemositler degranüle olarak tirozini L-DOPA'ya ve ardından çeşitli difenol kinonlara dönüştüren tirozinaz fenoloksidaz salgırlar. Bu substratlar en sonunda melanokroma dönüşerek enzim içermeyen bir yolla melanine çevrilir [22].



Şekil 1.3 Fenoloksidaz enzimi aktivasyon sistemi [22]

1.3.1.7. Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11)

Askorbat peroksidaz küçük, suda çözünür ve H_2O_2 in enzimatik detoksifikasyonu nda rol alan bir antioksidan moleküldür. APX, peroksidaz sınıfının bir üyesidir. APX, ROT kaynakları olan süperoksit, singlet oksijen, ozon ve hidrojen peroksit ile doğrudan reaksiyona girmektedir. Katalaz, yüksek H_2O_2

konsantrasyonlarının giderilmesinde rol alırken düşük konsantrasyondaki H_2O_2 'in yok edilmesinde APX görev almaktadır. Peroksitleri parçalama mekanizmasında askorbat ve askorbat peroksidaz (APX) kullanılmaktadır. APX, hücreleri normal ve stresli koşulların altında H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesi sağlayarak H_2O_2 'ye karşı korumaktadır [23].

1.3.2. Nonenzimatik savunma sistemi

Nonenzimatik antioksidanlar arasında glutatyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, β -karoten, selenyum, askorbik asit ve α -Tokoferoller sayılabilir [14].

1.3.2.1. Glutatyon

Glutatyon en önemli düşük molekül ağırlıklı sülfhidril içeren antioksidan moleküldür [24].

1.3.2.2. Ürik asit

Ürik asit, purinlerin metabolizması sırasında üretilen düşük moleküler ağırlıklı organik bileşiklerden biridir. Ürik asit hidrofilik bir antioksidandır ve çeşitli ROT'ları, örneğin peroksinitrit, hidroksil radikali, tekli oksijen ve lipid peroksitleri temizler. Muhtemelen azot dioksit ve karbonat iyonlarını da temizleyebilir ve Fenton ve Haber-Wiees reaksiyonu gibi serbest radikal reaksiyonların inhibisyonuna yol açan demir iyonları ve bakır iyonları ile stabil kompleksler oluşturabilir. Hücre içi süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin korunmasına katkıda bulunur [25].

1.3.2.3. Melatonin

Melatonin indol olarak sınıflandırılan bir bileşiktir. Melatoninin önemli işlevlerinden biri, oksidatif stresi azaltmak için serbest oksijen radikallerini temizleme ve antioksidanların aktivitelerini uyarabilmesidir. MEL çok etkili bir hidroksil radikal temizleyicidir. Bazı ROT ve RNS, singlet oksijen, peroksi nitrit anyonu ve nitrik oksidi detoksifiye etme yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda bazı antioksidan enzimlerin uyarıcısı olarak işlev görür ve mitokondriyal aktivite sırasında artan ROT seviyelerinin oluşmasını önler [25].

1.3.2.4. Albümin

Albümin çok sayıda fizyolojik işlevi gösteren bir proteindir. Albüminin antioksidan özellikleri bazı bileşiklerin oksidasyonunu önleyen bilirubin ve doymamış yağ asitlerinin bağlanması ile ilişkili olmasından kaynaklanmaktadır [25].

1.3.2.5. Askorbik asit (C vitamini)

Plazma ve hücrelerde askorbik asit, güçlü bir antioksidandır. Askorbat genellikle indirgenmiş formda (AsA) bulunur. Temel rolü metabolik süreçleri toksik serbest oksijen türevlerine karşı korumaktır. ROT'u ve RNT'yi yok etmeye çalışır. AsA genel olarak indirgeyici gibi davranır ve birçok serbest radikal türünü yok etmektedir. AsA, H_2O_2 'yi azaltmak için APX tarafından askorbat-glutasyon döngüsünde kullanılır. Hücre içi askorbik asit, hücre ölümünü önleyebilir ve oksidatif stresin neden olduğu mutasyonları inhibe edebilir [26].

1.3.2.6. Selenyum

Selenyum, antioksidan maddeleri ve bağışıklık sistemini düzenleyici role sahip temel bir elementtir. Selenyum aminoasit sentezi için kullanılır, selenosistein olarak adlandırılır. Selenyum, GPx aktivitesini artırarak ROT oluşumunu baskılar [26].

1.3.2.7. β -karoten

β -karoten, karotenoid grubunun yağda çözünen bir üyesidir. Provitamin olarak tanınırlar çünkü bunlar aktif A vitaminine dönüşebildikleri bilinmektedir. β -karoten, güçlü bir antioksidan ve en iyi $1O_2$ temizleyicidir [25].

1.3.2.8. α -Tokoferoller

α -Tokoferol, lipidte çözünür bir antioksidandır. α -Tokoferoller çeşitli ROT ve lipid oksidasyon ürünlerini temizler ve söndürür, membranları stabilize eder ve sinyal iletimini modüle eder. α -Tokoferoller lipid oto-oksidasyon zincirini ilerlemesini engeller ve serbest radikalleri uzaklaştırır [26].

1.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin fizyolojik seviyeleri hücrelerde ve biyolojik sistemlerin tümünde ciddi tahribat oluşturabilir. Serbest radikallerin hücrede meydana getirdiği hasarlar aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

1.4.1. Proteinlere etkileri

Bütün canlılarda olduğu gibi böcekler de yaşamsal olaylarını gerçekleştirmek için protein, lipid ve karbonhidrat gibi temel organik bileşiklere ihtiyaç

duymaktadırlar. Büyüme, gelişme ve neslin devamı bu maddelerin beslenme ile alınmasını gerektirir. Böceklerde yağ doku, lipid, protein, glikojen ve serbest karbonhidratlar gibi enerjice zengin molekülleri sentezler ve depolarlar. Bu maddelerden lipid ve proteinler yağ dokunun en büyük bileşenleridir [27].

Çeşitli insektisitlere maruz kalma böceklerde, serbest oksijen radikallerinin artışı ve bu durum protein oksidasyonuna yol açmaktadır. Proteinin okside olması proteinin yapısında değişimlere yol açarak protein karbonil (PCO) ürünlerini oluşturmaktadır. Oksitlenmiş proteinlerin artışı ise dokularda oksidatif hasara neden olmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin proteinlerle etkileşmesi sonucu yapısında bulunan aminoasit kalıntılarında modifikasyona, peptit bağlarının kırılmasına ve dolayısıyla metabolik olayların bozulmasına neden olmaktadır. Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri, amino asitlerin bileşimine bağlıdır. Yapılarında bulunan sistein, metiyonin, histidin, triptofan, tirozin gibi amino asitleri daha fazla bulunduran proteinlerin radikallerin oksitleyici durumundan etkilenmeleri daha olasıdır [27].

1.4.2. Karbonhidratlara etkileri

Besin unsurları, bir organizmanın gelişmesi, üremesi ve enerji elde etmesini sağlayan kimyasallar olarak tanımlanır. Bu kimyasalların büyük bir bölümü beslenme ile alınırken diğerleri ise böcekler tarafından sentezlenir [27]. Böceklerin çoğu metabolik olayları gerçekleştirebilmek için karbonhidratlara ihtiyaç duymaktadırlar. Beslenme yoluyla aldıkları şeker kaynakları büyüme gelişme üreme gibi faaliyetlerde kullanılabileceği gibi fazlası glikojen veya trehaloza çevirilerek depo edilmektedir. Böcekler kısa yaşam döngüsüne sahip oldukları için depo ettikleri karbonhidratları larva, pupa ya da ergin evrede kullanabilirler. Bu evrelerin herhangi birinde insektisitlere maruz kalmaları sonucu oluşan oksidatif stres ile serbest oksijen radikalleri karbonhidratların yapısında dejenerasyon; glikojen depolimerizasyonu gibi olaylar gerçekleştirmektedir. Ayrıca monosakkaritlerin oksitlenmesi sonucu H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehitler oluşur.[29] Okzoaldehitler ise DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilir ve aralarında çapraz bağlar oluşturduklarından dolayı antimitotik etki

gösterirler. Böylece dokularda kanserleşme ve yaşlanma olaylarını meydana getirirler [29].

1.4.3. Lipidlere etkileri

Böceklerde lipidler çoklu metabolik fonksiyonları yerine getirmek, değişen fizyolojik ihtiyaçları karşılamak diğer organlardan gelen sinyalleri geliştirme ve bütünleştirebilme sırasında gerekir. Aynı zamanda böceklerde metamorfoz, yumurta gelişimi, büyüme, başkalaşım, üreme veya bu olayların merkezindeki bileşenleri serbest bırakmak gibi çok önemli başka görevleri de vardır. Bu görevlerin yerine getirilmesi için gerekli olan lipidler, beslenme ile alınabileceği gibi vücutta depo halindeki protein ve karbonhidratlardan sentezlenmektedir [28]. Oksidatif stres sonucunda meydana gelen serbest radikaller, lipid peroksidasyonuna ve bunun da MDA miktarının artmasına yol açmasıyla hücre zarının geçirgenliğini bozmaktadır. Oluşan zincirleme reaksiyonlar ile hücredeki doymamış yağ asitleri, bazı enzimlerin yapısında bulunan proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler de hasar görmektedirler [30].

Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış lipidlerin oksidatif bir bozulmasına yol açan serbest radikal aracılı bir reaksiyon zinciridir. En yaygın hedefler biyolojik zarların bileşenleridir. Lipid peroksidasyonu (LPO), iyi bilinen bir membran hasarı belirticidir [15]. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan en basit ve en yaygın yöntem peroksitlerin parçalanması sonucu oluşan malondialdehid (MDA) miktarının belirlenmesidir. Daha ayrıntılı açıklamak gerekirse reaktif türlerin hedefi, çoklu doymamış yağ asitlerinin karbon-karbon çift bağıdır. Bu çift bağ, karbon-hidrojen bağına zayıflatır ve hidrojenin serbest bir radikal tarafından kolayca çıkarılmasını sağlar. Daha sonra, bir serbest radikal hidrojen atomunu soyutlayabilir ve bir peroksil radikali üreten oksidasyona maruz kalan bir lipid serbest radikali oluşur. Peroksil radikali, bir çoklu elektronu soyutlayarak ve bir lipid hidroperoksit ve bir başka lipid serbest radikali üreterek diğer çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girebilir. Bu işlem sürekli olarak bir zincir reaksiyonunda çoğaltılabilir. Lipid

hidroperoksit kararsızdır, malondialdehid ve 4-hidroksi-2-nonenal gibi ürünler vermektedir. [31]. Bu nedenle böceklerde lipid peroksidasyonunun seviyesi bu bileşiklerin oksidatif hasarın boyutlarının değerlendirilmesinde belirteç olarak kullanılmaktadır [32].

1.4.4. Hemositlere etkileri

Diğer birçok hayvan gibi böceklerin vücutları ROT eliminasyonuna yönelik antioksidan ve detoksifiye edici enzim komplekslerine sahiptir. Böceklerde edinilmiş bir bağışıklık sistemleri bulunmamakla birlikte doğuştan gelen bir bağışıklık sistemine sahiptirler. Böceklerin doğuştan gelen bağışıklık sistemleri hemositlerin aracılık ettiği fagositoz ve kapsülleme oluşumu gibi hücresel savunmaların üretimini içeren humoral ve hücresel savunma tepkileri olmak üzere iki alt bölüme ayrılmaktadır. Humoral savunma sürecinde üç tip reaksiyon gerçekleşmektedir. Bunlar melanizasyon, hemolenfin pıhtılaşması, reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerinin üretimini ve antimikrobiyal peptidlerin sentezidir. Hücresel savunma yanıtı çeşitli hemosit türleri ile aracılık ettiği antimikrobiyal peptidler, tamamlayıcı benzeri proteinler, fagositoz, nodülasyon ve enkapsülasyonla ilgilidir. Böcekler farklı tiplerde ve sayıda hemositlere sahiptirler [33]. Böceklerde immün sistem diğer birçok sistemle ilişkili olmakla birlikte dış ortamdan uygulanan sıcaklık değişimleri, insektisit veya bitkisel kaynaklı uygulamalar gibi çevresel faktörlere karşı oldukça duyarlıdır [34]. Kullanılan kimyasallar hücre hacminde ve sayısında artışlar, hücre boyutunda azalma, hücre sayısının azalması gibi durumlara sebep olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, hemositler, toksik kimyasalların neden olduğu sitogenetik hasarı (hücre sayısındaki ve yapısındaki) ölçmekte kullanılmaktadır [34].

1.4.5. Mikronükleus oluşumuna etkisi

Mikronükleuslar (MN), ilk olarak eritrositlerde belirlenmiş ve kromozom hasarını değerlendirmek için kullanılmıştır. MN, mitoz hücre bölünmesi sırasında

sentromer içermeyen asentrik kromozom parçaları veya iç kutuplarına gidemeyen tam kromozomlar içerir. Ana çekirdeklerden daha küçük olduklarından "mikronükleus" terimi kullanılmaktadır. Kromozom hasarının sebebi iyonlaştırıcı radyasyona veya kanserojen kimyasallara maruz kalınması dolayısıyla fiziksel ve kimyasal ajanların ökaryotik hücrelerin genetik materyallerinde büyük değişikliklere neden olabileceğini ortaya koymaktadır [35]. MN sayısındaki artış, çeşitli kimyasalların hücrelerde oluşturduğu kromozomlarda kırılma sonucunda meydana gelen anormalliklerin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Hücre içinde oluşan bir yapının MN olarak değerlendirilebilmesi için bu yapının ana nükleusdan ayrı durması, ana nükleusdan küçük yapıda olması ve ana nükleusla aynı oranda boyanması gereklidir. [36]. Pestisit etkilerini değerlendirmek için yapılan çalışmalarda mikronükleus testi pratik ve ucuz olmasından dolayı diğer yöntemlere göre genotoksisite araştırmalarında tercih edilen biyolojik izleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçtir [37].

1.4.6. DNA üzerine etkileri: Comet Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür ve üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır. Hasar, normal DNA'nın kimyasal ve fiziksel yapısındaki bir değişimdir. Lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi DNA da ROT'un saldırısına maruz kalır. İnsan bedeninin her hücresindeki DNA, günde yaklaşık 10.000 kez serbest radikal saldırısına maruz kalmaktadır. Serbest radikale enerji sağlayan süreçlere müdahale ederek detoksifikasyon ve metabolizma için gerekli kaynakları azaltabilir [30].

Son yıllarda DNA hasarı ve onarımında bazı genotoksisite uygulamaları yapılmaktadır. Comet analiz yöntemi ilk kez Östling ve Johansson (1984) tarafından temelleri oluşturulmuş daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından günümüze kadar modifiye edilmiş ve yeni teknikler ile birlikte sunulmuştur [38]. Comet analizi en yaygın olarak izole edilmiş hayvan hücreleri (örneğin ayrılan lenfositler kan veya ayrıştırılmış dokulardaki hücreler) veya kültürde çalışılmaktadır. Bununla birlikte, hücrelerin DNA'sındaki hasarı incelemek için yöntemler de geliştirilmiştir. Comet

analizi en yaygın şekilde kullanılan yöntemdir. Araştırmacıların baş ve kuyruktan oluşan DNA yapısına “COMET” demesinin sebebi ise mikroskopta kuyruklu yıldız görünümüne sahip olmasından kaynaklanmaktadır [40].

Comet analizi yöntemiyle düşük seviyedeki DNA hasarlarını gösterebilmesi, hücre sayısının az olması durumunda bile analizin gerçekleştirilebilmesi, kolaylıkla uygulanabilmesi, farklı hücre grupları ile DNA hasar analizi çalışılabilmesi, sonuçların kısa sürede elde edilmesi, sonuçların güvenli ve ekonomik olması sebebiyle kullanılmaktadır [41].

Tek hücre jel elektroforezi kirleticilerin genetik üzerindeki doğrudan veya dolaylı etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır ve değerlendirme için standart yöntemlerden biri haline gelmiştir [39].

1.4.7. *G.mellonella*'nın genel özellikleri ve yaşam döngüsü üzerine serbest radikallerin etkisi

Çalışmada kullanılan *G. mellonella* L. Pyralidae familyası, Lepidoptera takımına ait bir böcektir [42]. Arı kovanlarına yerleşerek bal ve petek beslenerek onlara zarar veren *G. mellonella* larvaları, laboratuvar şartlarında maliyetinin az olması ve yapay besinler ile fazla miktarlarda üretilmesinden dolayı biyolojik çalışmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır. *G. mellonella*'nın gelişim döngüsü ortam sıcaklığı ile yakından ilgilidir ve en uygun koşullarda 4-5 haftadan 6 aya kadar ortalama 6 hafta yaşamaktadırlar. Bu modelin bir avantajı larvalarının büyük boyutlu olmasıdır. Patojen veya test edilen aktif maddenin kolay uygulanmasını sağlamaktadır. Ayrıca boyutları daha fazla hemolenf, böcek yağ gövdesi ve diğer dokular için örnek almayı kolaylaştırmaktadır. Deneylerin sonucunda özellikle fiziksel değişiklikler kolaylıkla gözlemlenebilir (renk değişimi- melanizasyon, larva şekli, daha yavaş hareket). *G. mellonella* son dönem larvaları araştırmalara için oldukça kullanışlıdır. Burada açıklanan *G. mellonella*'nın sahip olduğu model organizma özellikleri; hızlı büyüme, yüksek doğurganlık, büyüklük ve nispeten kısa ömüre denk gelmektedir.

Ayrıca bu böceğin dahil olduğu ailenin içindeki birçok türün depolanmış ürün zararlısı olmaları açısından tarımsal olarak da önemlidirler [43].

1.5. Yaşam döngüsü

Büyük balmumu güvesi tipik bir böcektir ve yaşam evreleri yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere dört farklı şekilde gelişir. Yaşam döngüsü haftalar ya da aylar arasında değişir. Gelişim süresini etkileyen spesifik faktörler hem biyotik hem de abiyotik faktörlerdir. Sıcaklığın 30 ± 2 °C nemin ise 65 ± 5 olması gelişim için optimumdur. Yumurtlama, dişilerin ortaya çıkmasından ve çiftleşmesinden oldukça kısa bir süre sonra başlar. Yumurtlama sırasında dişi bireyler 50-150 kümeler halinde yumurta bırakırlar [44]. Bu yumurtalar doğal ortamlarda kovan kısımları arasındaki çatlaklara, karanlık ve gizli yerlere yerleştirilir. Larvalar genellikle 5 ila 8 gün sonra yumurtaların açılmasıyla çıkmaktadırlar, ancak düşük sıcaklıklarda bu süre 30 güne kadar olabilir. Larva dönemi 22 ila 60 gün arasında bazen abiyotik faktörlere bağlı olarak 100 güne kadar uzanır [44] Yumurtadan çıkan larvalar bal ve petek ile beslenirler. Sadece son evreye gelen larvalar koza örür. Pupa devresi 28 gün ile 6 ay arasında sürer [42]. Doğada kullanılan insektisitlerin organizmada radikal oluşumuna sebep olduğu ve bunun sonucunda canlının gelişimi üzerinde de etkileri olduğu görülmüştür. Galvan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, spinosad ve indoxacarb'ın *Harmonia axyridis* (Pallas)'in büyüme gelişme ve üremesine etkisini larva dönemi ve ergin dişilerde araştırmış ve indoxacarb'ın larvaların ve erginlerin hayatta kalma süresini düşürdüğünü, larvaların yaşam süresini uzatıp ergin evreye geçmesini engellemiştir [42]. İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ROT üretimi, üremeyi olumsuz yönde etkileyen oksidatif strese neden olduğu belirtilmiştir [13]. İnsektisitlerin neden olduğu oksidatif stres sonucu vücutta artan serbest oksijen radikalleri zararlı böcekler gibi hedef olmayan canlılarında hücre ve dokularında tahribata neden olurken aynı zamanda büyüme, gelişme, yumurta sayısı, doğurganlık ve de yaşam süresini de etkilemektedir [48].

1.5.1. Yumurta

Dişi *G. mellonella*, yumurtalarını, kovan içerisinde bal arılarının ulaşamayacağı yarıkların içlerine bırakırlar. Balmumu güvesi yumurtaları, sırasıyla 0.478 mm ve 0.394 mm'lik ortalama uzunluk ve genişliğe sahip olarak değişir. Yumurta, küresel şekle sahiptir. Yumurtanın rengi pembe, krem ve beyaz arasında değişir. 24-26 °C sıcaklığa sahip ortamlarda, yumurtalar 5-8 gün içerisinde açılırlar ve içlerinden larvalar çıkar [42]

1.5.2. Larva

Yumurtadan çıkan larvalar yaklaşık 1-3 mm uzunluğunda ve 0.12-0.15 mm çapındadır. Sıcaklık ve besin varlığına bağlı olarak, larvaların büyümesi 1-5 ayı bulur. Larva, krem beyaz renktedir, ancak büyüdükçe kararır [42]. Yedi evreden oluşan larval dönem son evrede ördüğü sağlam yapıyla pupa dönemine girmiş olur [43].

1.5.3. Pupa

Büyük balmumu güvesi pupaları ortalama 12-20 mm uzunluğunda ve 5-7 mm çapındadır. Pupa başlangıçta, pupa beyazdan sarıya renklidir, ancak yavaş yavaş kahverengiye ve daha sonra yaş ve gelişme ile koyu kahverengiye dönüşür. Pupa süre 7 ila 60 gündür. [44].

1.5.4. Ergin

Ergin büyük balmumu güvesi belirgin eşeyssel dimorfizm gösterir. Dişi balmumu güvesi ortalama 15-20 mm vücut uzunluğunda, 31 mm kanat açıklığında ve 169 mg ağırlığındadır. Erkek, dişilere göre oldukça küçük ve daha az koyu renklidir [42]. Vücut rengi, yaşam süresi içinde hafif pembe renkten açık griye dönüşür [43].



Resim 1.1 *G.mellonella*'nın yumurta, larva, pupa ve ergin hali

G.mellonella'nın model bir organizma olması, birçok kullanım alanı olmasından dolayı önemi gittikçe artmaktadır. *G. mellonella*'nın ve memeli bir canlının immün sisteminin verdiği yanıt ve mekanizması birbirine oldukça benzerdir. Ayrıca, bir materyalin toksik etkisi hakkında, memeli canlı grupları ile yapılan çalışmalardan daha kısa sürede veri almamıza olanak sağlar.

Aynı zamanda Sulfoxaflor'un yeni nesil bir insektisit olması ve henüz bazı canlılar üzerindeki toksik etkilerinin bilinmemesinden dolayı çalışmamız sonraki çalışmalara ışık tutacaktır. Bu amaçla çalışmamızda sülfoxaflor insektisitinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan model organizma *G. mellonella*'nın; bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri, malondialdehid (MDA) protein, lipid ve karbonhidrat miktarlarının değişimi, hemosit sayısı, mikronükleus oluşumu ve DNA hasarının tespit edilmesi, larval gelişim süresinin, eşey ve puplaşma oranının, dişi ve erkek ömür uzunluğunun, yumurta verimi üzerindeki etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Birçok parametrenin araştırıldığı bu çalışmadan elde edilen bulgular Sulfoxaflor'un hedef olan ve olmayan canlıları ne şekilde etkilediğini ortaya çıkartmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Önen ve Kılıç; *In vivo* şartlarda meydana gelen serbest radikaller, lipidler gibi biyomolekülleri etkileyerek yeni serbest radikaller oluşturur. Bu aynı zamanda hücre ve dokularda hasara neden olarak metabolik değişikliklere yol açar. Neonikotinoidlerin canlılar için son derece toksik olması ve neonikotinoidlerin akut toksisitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Çünkü bu histopatolojik ve genotoksik derlemede açıklanan çalışmalar kapsamında omurgalılarda hızlı metabolize edilemez. Gelişmiş tekniklerin kullanıldığı biyoçeşitliliği korumak için yapılan tüm diğer araştırmalar sürekli artan pestisit kullanımını ve içindeki organizmalarda meydana gelen değişiklikleri histolojik ve genotoksik seviyelerle ortaya konulabileceğini belirtmişlerdir [45].

Sparks ve Watson; sulfoxaflor ([N- [metiloksido [1- [6- (triflorometil) -3-piridinil] etil] -λ4-sülfaniliden] siyanamid] sülfoksiminler grubunda yeni bir insektisit sınıfını temsil eder. Sulfoxaflor, böcek nikotinik asetilkolin reseptörlerinde (nAChR'ler) bir agonisttir ve nAChR'lerde etkili olan diğer insektisitlerden farklı bir şekilde işlev görür. Neonikotinoidler gibi diğer nAChR agonistlerinden farklı ilişkilerini göstermişlerdir [46].

Johnson ve Ellis; bal arılarının pestisitlere kasıtsız ve kasıtlı olarak maruz kalması kovan ürünlerindeki kalıntıları incelemişlerdir. Pestisitlerin kovan ürünlerindeki kalıntılarının koloni çöküş bozukluğuna ve diğer koloni problemlerine neden olduğunu ve tek bir pestisit koloni çöküş bozukluğuna, çoklu pestisit maruziyetinin bal arısı sağlığının düşmesine neden olduğunu bildirmişlerdir [47].

Öztürk ve Akdoğan; vinclozolin'in *G. mellonella*'nın (Lepidoptera: Pyralidae) bazı fizyolojik özellikleri üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlamışlardır. *G. mellonella* arıcılığa zarar veren ekonomik olarak zararlı bir türdür. Deney grupları için stoktan elde edilen yumurtalar karışık yemlere bırakılmıştır. Farklı dozlarda vinclozolin ve larvaları bu yemle beslemiştir. Daha sonra, çiftleşen bireylerin cinsiyet oranı ve bu larvaların olgunlaşma süreleri belirlenmiştir. Verilere göre uygulanan vinclozolin miktarındaki artış kontrol grubuyla karşılaştırıldığında erginleşme ve gelişme süresini uzattığını ortaya çıkarmışlardır [48].

Rahman ve Mahboob; çalışmada iki organofosfor (OP) pestisit (kloropirifos ve asefat) ve siklofosfamid (CP) tek hücreli jel kullanılarak İsviçre albino farelerinin lökositlerinde *in vivo* genotoksik etki indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Ortalama kuyruklu yıldız kuyruğu uzunluğunda, DNA hasarını gösteren önemli bir artış meydana gelmiştir. Çalışmada comet analizinin pestisitlerin neden olduğu genotoksitenin saptanması için hassas bir tahlil olduğu sonucuna varılmıştır [49].

Dikilitaş ve Koçyiğit, fiziksel ve kimyasal ajanların organizmalar üzerindeki etkileri kuyruklu yıldız analizi olarak da bilinen önemli bir yöntem ile DNA hasarını ölçmeyi ve genotoksik ve sitotoksik mekanizmaların değerlendirilmesini sağlar. Yöntem güvenilir, kolayca uygulanabilir ve son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, tekli izole edilmiş DNA'ya bağlıdır. Bu yöntem, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu tek veya çift sarmallı kırılmaları belirler. Comet analizi yöntemi yaygın olarak tüm canlı hücrelerde uygulanmaktadır [38].

Altuntaş ve Duman; saf azadirachtinin (AZA) model böcek ve depolama zararlısı olan *G. mellonella*'nin larva hemositleri üzerindeki genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Ölümcül AZA dozu uygulandıktan sonraki 72. saatte, AZA uygulanmayan gruplara kıyasla larva hemositlerinde DNA hasar göstergelerinde önemli bir artış gözlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma AZA'nın sublethal dozlarda bile *G. mellonella* larvalarının genomunda önemli hasara neden olduğunu ve kuyruklu yıldız analizinin larva hemositlerinde AZA'nın *in vivo* genotoksitesinin izlenmesinde yararlı olduğunu göstermiştir [50].

Altuntaş ve Duman; Juglonun model böcek *G. mellonella* üzerinde insektisit potansiyeline sahip önemli bir fitokimyasal bileşiktir. Burada, *G. mellonella* larvalarında juglonun neden olduğu oksidatif ve genotoksik stres değişikliklerini araştırılmıştır. Tüm deneylerde ölümcül konsantrasyonlar (LC10: 0.50 mg; LC30: 1.5 mg; LC50: 2.3 mg) juglon doğrudan *G. mellonella*'nın ilk instar larvalarının diyetine dahil edilmiştir. Juglona maruz kalan son instarların doku homojenatları, antioksidan enzim aktivitelerini (glutatyon-S transferaz, glutatyon peroksidazlar, katalaz ve süperoksit dismutaz) ve malondialdehit (MDA) miktarını test etmek için kullanılmıştır. Juglonun larvalar üzerindeki genotoksik etkilerini belirlemek için Comet ve Mikronükleus ana olanlızleri kullanılmıştır. Juglon, antioksidan enzim

aktivitelerindeki değişiklikleri ifade etmiştir ve konsantrasyona bağlı bir şekilde lipid peroksidasyonunu indüklemiştir. Böcek hemositlerinin genomunda önemli DNA ve kromozom hasarı meydana gelmiştir. MDA seviyelerindeki artış ve DNA hasarı, juglon bağımlı oksidatif stresin meydana geldiğini göstermiştir [51].

Emre, Kayış ve Coşkun; çalışmalarında kadmiyumun (1.25, 2.5, 5, 10, 20 ve 40 mg başına *G. mellonella* larvalarına etkileri analiz edilmiştir. Toplam protein, lipid ve glikojen seviyeleri, MDA, SOD ve CAT aktiviteleri ve metal birikimi ölçülmüştür. Cd (20 ve 40 mg) konsantrasyonları toplam protein, lipid ve glikojen seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür. MDA seviyesi, SOD aktivitesi önemli ölçüde artmıştır. CAT etkinliği önemli ölçüde tüm konsantrasyonlarda azalmıştır. Metal birikimi de doza bağlı olarak önemli ölçüde artmıştır Antioksidan enzimlerin aktivitesi, enerji rezervleri, MDA içeriği ve Cd birikme seviyeleri çevresel ağır metallerin güvenilir bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarmışlardır [52].

Kayış ve Coşkun; DDVP'ye maruz bırakılan *G. mellonella* larvaları üzerinde yapılan çalışmada DDVP'nin oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna neden olduğunu, bu durumun *G. mellonella* larvalarında antioksidan enzim aktivitelerini ve iyon dengesini değiştirdiği buna ek olarak, bu sonuçlar *G. mellonella*'nın insektisitlerin etkilerini test etmek için yararlı bir model olduğunu göstermiştir [53].

Büyüküz ve Kayaoğlu; güçlü antihelmintik aktivite gösteren Niklozamidin memelilerde iyi karakterize edilmiştir. Çalışmada *G. mellonella* larvalarının in vivo insektisit etkisi araştırılmıştır. Niklozamidin, *G. mellonella* larvalarının hayatta kalma süresini azaltmıştır. Bu antihelmintik antibiyotikğin sadece en yüksek konsantrasyonu pupa ve yetişkin dönemlerinde gelişim süresini ciddi oranda uzatmıştır. Niklozamidin en yüksek konsantrasyonunda yumurta elde edilmediği ve erkek yetişkinlerin uzun ömürlülüğünde bir artış elde edilmiştir. Düşük konsantrasyondaki niklozamidin, (MDA içeriğini (4 kat), GST etkinliği (2 kat) arttırmıştır. Kontrole göre test edilen konsantrasyonlarda niklozamidin protein karbonil (PCO) içeriğini en az 5 kat önemli ölçüde artırmıştır. Bu çalışma *G. mellonella* larvalarının klinik açıdan önemli olup olmadığını belirlemek için iyi bir model olarak kullanılabileceğini belirtmiştir [32].

Grizanova ve Semenova; hemositlerde lipid peroksidasyon süreci, fenoloksidaz ve anahtar enzimatik antioksidanların aktiviteleri (süperoksit dismutaz,

glutasyon-S-transferaz, katalaz) ve enzimatik olmayan antioksidanlar (tiyoller, askorbat) büyük balmumu güvesi *G. mellonella* hemolenfinde naylon implantların kapsülleme işlemi sırasında incelenmiştir. Sonuçlar, tiyollerin ve askorbat moleküllerinin antioksidan yanıtta yer aldığını, kapsülleme sürecinin sonraki aşamalarında hemolenf glutasyon-S-transferazın böcek organizmasını detoksifiye ettiğini ve koruduğunu ve böylece iç redoks dengesini geri kazandığını göstermişlerdir [54].

Gwokyalya ve Altuntaş; çalışmalarında borik asitin (78.125–10.000 ppm) böcek öldürücü etkilerini araştırmayı ve immünolojik ve genotoksik ile ilgili toksik aktiviteler model organizma olarak kullanılan *G. mellonella* larvalarına besleme yöntemi ile etkileri araştırılmıştır. Hemosit sayılarında azalmalar BA en yüksek konsantrasyonda mikronükleus oranları artmış, DNA hasarını gösteren kuyruklu yıldız parametreleri artmıştır [55].

Sezer ve Özalp; Juvenil hormon analogu olan piriproksifeninin *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısı ve hemositlerin morfolojisine etkilerini incelenmiştir. Piriproksifen *G. mellonella*'nın son dönem larvalarına sırt toraksında, topikal olarak uygulanmıştır. 1, 5 ve 10 ug / ml piriproksifene maruz kalan larvalarda hemosit sayısında toplamda önemli bir düşüş gözlenmiştir. Piriproksifen muamelesi hemen hemen tüm hemosit tiplerinde farklı düzeylerde deformasyonlara neden olmuştur [56].

Shin; *G. mellonella* larvaları farklı konsantrasyonlarda CdCl₂ (1.25, 2.50, 5.00) ile tamamen kontamine olmuş yapay bir diyeteye tabi tutmuştur. Bu çalışmaların sonuçlarında, *G. mellonella* larvalarının tüm vücut lipid içeriğini etkilediği bulunmuştur. Lipid konsantrasyonları, fosfovanilin yöntemi ile fotometrik olarak ölçülüp Cd ile kontamine olmuş larva ve pupalarda toplam lipid içeriğinde önemli bir azalma olduğu bildirilmiştir [57].

Aslantürk ve Kalandar; Çalışmalarında *Lymantria dispar* larvalarına, daldırma yöntemi ile hazırlanan meşe yaprakları farklı methidathion konsantrasyonlarını uygulamışlardır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Antioksidan savunma bileşenleri ROT'ni etkisiz hale getirerek böcekleri oksidatif strese karşı korumaktadır. Bu çalışmada LC₅₀ / 48h methidathion değerinin oksidatif

stres göstergesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır, MDA miktarı, antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir [58].

Sevgili; Omurgasızlarda patojenlere yanıt olarak aktive olan doğuştan gelen bağışıklık sistemi çok çeşitli özel yanıtlardan oluştuğunu belirtmiştir. Böceklerde litik aktivite ve fenoloksidaz kaskadı olmak üzere iki önemli önemli bağışıklık parametresi bulunmaktadır. Barbitistin etkisinin araştırıldığı çalışmada barbitistin verildiği çalı çekirgelerinden (*Isophya speciosa*, *Poecilimon similis*) bir mikro şırıngayla aynı yaşta bulunan her iki tür için 10 günlük 10 erkek 10 dişi, farklı oranlarda hemolenf (3, 6, 8, 10 µl) örnekleri alınıp hem PO hem de litik aktivite ile optik yoğunluktaki toplam değişim bir mikropilaka okuyucu kullanarak tahmin edilmiştir. Ancak toplam PO aktivitesi ve litik faaliyet tahmini için daha fazla hemolenf olması gerektiği sonucuna varılmıştır [59].

Kurt ve Kayış; Çalışmada deltametrinin *G. mellonella*'da hücre aracılı immün yanıtı ve genotoksik hasarı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin (5, 20, 50, 100 ve 150 ug) uygulanmış ve 24. 48. 72. ve 96. saatte *G. mellonella*'da beş tip hemosit tanımlanmıştır: prohemositler, plazmatositler, granülositler, küresitler ve oenositlerdir. Toplam hemosit sayıları (THS) deltametrinden önemli ölçüde etkilenmiştir. 72. saatte, tedavi edilen THS'ler yüksek deltametrin konsantrasyonlarında (50, 100 ve 150 ug) kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azalmış; ancak, 96 saatte, THS'ler 100 ve 150 ug deltametrin konsantrasyonlarında önemli ölçüde artmıştır. Mikronükleus oluşumu anlamlı derecede deltametrin'den etkilenmiş; özellikle, yüksek konsantrasyonlarda deltametrin (100 ve 150 ug) mikronükleusta bir artışa neden olmuştur. Deltametrinin THS'leri etkilediği ve mikronükleus oluşumuna neden olduğu sonucuna varılmıştır. [60].

3. MATERYAL ve YÖNTEM**3.1. Materyal****3.1.1. *G.mellonella* ‘nın elde edilmesi**

Sulfoxaflor’un değişik konsantrasyonlarının *G. mellonella*’nın bazı biyoparametrelerine etkileri araştırıldı. Çalışmada kullanılan *G. mellonella* bireyleri, 30±2 °C ve %65±5 neme sahip laboratuvar koşullarında yetiştirilen *G. mellonella* larvalarından elde edildi. Pestisit olarak %50 w/w Sulfoxaflor (C₁₀H₁₀F₃N₃OS) uygulandı. Deneylere başlanmadan önce Sulfoxaflor’un *G. mellonella* larvaları için LD₅₀ değerleri besinde çalışıldığında 1.8 gr iken mikroenjeksiyon ile çalışma sonucu 34 µg olarak belirlendi. Deney böceklerinin beslenmesinde kullanılacak Sulfoxaflor oranları LD₅₀ değerinin hesaplanmasından sonra saptandı.

3.1.2. Kontrol besinin hazırlanması

G. mellonella L. stok kültürünün devamının sağlanması amacıyla yumurtadan yeni çıkmış larvalar belirli oranlarda yapay besinde beslendi. *G. mellonella* larvalarının beslenmesi için kepek, gliserin, bal, saf su ve petekten oluşan yapay besin bileşenleri geniş bir kabın içerisinde el yardımıyla yoğurularak homojenize bir ortam sağlandı. Kültür 30±2°C ve %65±5 oranda nemde ve gün boyunca sürekli olarak karanlıkta uygulandı. 100 gr besinin oluşumu için her kavanoza 58 gr kepek, 3.5 gr öğütülmüş petek, 22 gr gliserin, 9.7 gr süzme bal, 6.8 gr saf su katılarak karıştırıldı. Hazırlanmış besin bir litrelik plastik kavanozların yaklaşık 2/3’ne kadar eklendi. Hava alışverişinin sağlanması için kavanozların ağızları tel kafes içeren kapak ile kapatıldı. Stok kültürün devamlılığı, dişilerin bıraktığı yumurtaların açılmasıyla sağlandı. Bu yumurtalardan gelişen larvalar önce pupa sonra ergin hale geçerek aynı döngü

sağlanmış oldu. Bu şekilde stok kültürün devamlılığı sağlanırken aynı zamanda deney için de istenen her evre larvanın mevcudu sağlandı.

3.1.3. Deney besinlerinin hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan besin 100 gr olacak şekilde ayarlandı. Besin bileşimine 0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1 µg konsantrasyonlarında Sulfoxaflor eklenerek *G.mellonella* larvaları beslendi.

3.1.3.1. Deney gruplarının hazırlanması

Çizelge 3.1 Sulfoxaflor içerikli besin ve miktarları

Besin bileşeni	Bal	Petek	Gliserin	Kepek	Saf su	Sulfoxaflor
Kontrol	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	-
0.01µg Sulfoxaflor	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
0.10µg Sulfoxaflor	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
0.25µg Sulfoxaflor	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
0.50µg Sulfoxaflor	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
1.00µg Sulfoxaflor	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+

Deneyde kullanılmak üzere *G. mellonella* larvalarının beslenmesi için laboratuvar ortamında sulfaxoflor içeren besin hazırlandı. Sulfoxaflor'un besindeki oranı µg /100 g besin olarak belirlendi. Sulfoxaflor suda önemli miktarda çözündüğü için bu miktarlar besine direkt ilave edildi. Kontrol besini hariç Sulfoxaflor 0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 µg/100 g olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda hazırlandı. SOD, CAT, APX, GST tayinini, MDA ve protein miktarını belirlemek amacıyla her konsantrasyonun her tekrarı için kavanozlara larvalar konuldu. Karbonhidrat, lipid miktarı tayini için her konsantrasyonun her tekrarı için 1 larva olmak üzere toplam her konsantrasyonun her tekrarı için toplam 5 larva kullanıldı. PO enzimi aktivasyonunu

belirlemek için her konsantrasyonun her tekrarı için 2 larva olmak üzere toplam her konsantrasyonun her tekrarı için toplam 10 larva kullanıldı. *G. mellonella* larvaları Sulfoxaflor'un farklı konsantrasyonlarını bulunduran besin ile beslendi. Böcekler kısa süreli kontrol zamanı hariç devamlı olarak karanlıkta tutuldu. Deney sonunda SOD, CAT, APX, GST enzimlerinin aktivasyonu tayini, protein miktarı ve MDA tayini yapmak amacıyla her tekrar için son larva evresindeki 4 adet birey, lipid ve karbonhidrat tayini için 1 adet birey ependorf tüplere konuldu ve -80 °C de saklandı. PO enzimi aktivite tayini için her konsantrasyonun her tekrarı için son larva evresindeki 2 şer larvadan hemolenf alınarak analiz yapıldı. Aynı deney düzeneği hemosit sayımı, mikronükleus oluşumu ve comet analizi için tekrar kuruldu. Son evreye gelen deney ve kontrol gruplarından her konsantrasyon için her bireyden 5 µl hemolenf alındı. Larval hemolenfin alınması için; 7. dönem larvalar, 10 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. Bu sayede hareket yetenekleri zayıflayan larvalar etanol içeren pamuk ile silindi ve sterilize edildi. Diseksiyon iğnesi ile hemolenf örnekleri alındı. Her bireyden alınan 5 µl hemolenf örneği, buz içerisinde bulunan 1,5 mL'lik santrifüj tüpleri içerisine transfer edilerek analizler gerçekleştirildi.

3.2. Yöntem

Deney böceklerinin protein, karbonhidrat, lipid miktarları, enzim aktiviteleri ve MDA miktarını ölçmek için -80 °C de muhafaza edilen larvalar kullanıldı.

3.2.1. Böceklerin Homojenizasyonu

Analizleri gerçekleştirmek için yaş ağırlıkları belirlendikten sonra -80 °C de saklanan *G. mellonella* larvaları, deney tüplerine alınarak bir süre oda sıcaklığında buzunun çözünmesi için beklendi ve bu esnada üstlerine melaninleşmeyi engellemek amacıyla birkaç fenilthioure kristali eklendi. 1/5 oranında fosfat tamponu (pH 7.4) eklenerek 24000 devir/10dk da homojenize edildi. Homojenizasyon işleminden sonra

tüpler 10000 devir/dk da 30 dk santrifüj edildi. Sonuçta elde edilen süpernatant deneylerde kullanıldı.

3.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesinin tayini

Bu yöntem SOD enzim aktivitesi tayini için örnek de bulunan süperoksit radikallerinin NBT ile etkileşime girerek mavi renk oluşturması ve SOD'nin radikalleri inhibe edebilme yeteneğinin ölçülebilmesi, 560 nm de dalga boyunda okunması esasına dayanmaktadır.

Kullanılan çözeltiler

Ksantin çözeltisi (0.3 mM): 9.13 mg ksantin tartıldı (Sigma; X7375) önce birkaç damla 1N NaOH içinde çözüldü ardından saf su ile 200 ml ye tamamlandı.

EDTA (0.6 mM): 22.3 mg EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_2Na_2H_2O$) (Sigma: E-1644) toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf suda çözüldü.

NBT (150 µg/l): 12.3 mg NBT (Sigma; N6876) toplam hacim 100 ml olacak şekilde bidistile saf suda çözüldü.

Na₂CO₃ (400 mM): 4.24 g Na₂CO₃ toplam hacim 100 ml olacak şekilde bidistile saf suda çözüldü.

BSA (1 g/l): 25 mg BSA toplam hacim 25 ml olacak şekilde bidistile saf suda çözüldü.

Reaktif çözeltisi (20 testlik): 20 ml ksantin çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml Na₂CO₃ çözeltisi ve 3 ml BSA çözeltisi karıştırılarak stok reaktif oluşturuldu.

Ksantin oksidaz [(EC:1.17.3.2) (Sigma; X1875) (50 U/l)] enziminden 48 µl alındı, 3 ml 2M buz içerisinde bekletilerek (NH₄)₂SO₄ de çözüldü.

2M (NH₄)₂SO₄: 2.643 g (NH₄)₂SO₄ toplam hacim 10 ml olacak şekilde saf su içerisinde çözüldü.

CuCl₂.2H₂O (0.8 mM): 13,6 mg CuCl₂.2H₂O tartıldı toplam hacimin 100 ml olacak şekilde saf suda çözüldü.

Çizelge 3.2 SOD aktivitesi ölçüm prosedürü [61]

	Kör	Numune
Reaktif(ml)	1.425	1.425
Örnek(ml)	-	0.05
Ksantin oksidaz(ml)	0.025	0.025
Karıştırılır ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.		
CuCl ₂ (ml)	0.05	0.05
Örnek(ml)	0.05	-

SOD enzimi aktivitesinin tayini için gerekli çözeltiler hazırlandıktan sonra iki tüp alındı her bir örnek için iki tüp alındı birincisi kör ikincisi numune tüpü olarak belirlendi. Bunlara ayrı ayrı 1.425 ml reaktif karışımı konuldu ardından sadece ikinci tüpe tayin edilecek numune çözeltisinden 0.05 ml eklendi. Süre not alınarak, ayrı ayrı her iki tüpede hazırlanmış olduğumuz ksantin oksidaz çözeltisinden 0.025ml ilave edildi. Karıştırılıp oda sıcaklığında 20 dk. bekletildikten sonra her iki tüpe reaksiyonu durdurmak için 0.05 ml bakır klorür eklendi. Son olarak da sadece birinci tüpe, tayin edilecek numune çözeltisinden 0.05 ml eklendi. 560 nm dalga boyunda absorbanları okunarak not edildi. Bu işlemler bütün örnekler için uygulandı.

Hesaplama:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{absorbans kör} - \text{absorbans numune}) \times 100}{\text{absorbans kör}}$$

$$\text{Aktivite } \left(\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right) = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{50 \times 0.1}$$

$$\text{Spesifik aktivite} \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \text{ protein} \right) = \frac{\text{Aktivite } \left(\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right)}{\text{Protein miktarı } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

3.2.3. Katalaz (CAT) aktivitesinin tayini

CAT aktivitesi ise Aebi' nin metoduna göre enzim tarafından yıkılan hidrojen peroksidin izlenmesi esasına göre ölçüldü [62].

Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tamponu (50 mM): 6.81 gr KH_2PO_4 ve 7.1 gr Na_2HPO_4 saf suda çözüldü ve sonra pH 1N NaOH ile 7.4'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

H_2O_2 (30 mM): %30 luk H_2O_2 'den 0.34 ml alınarak fosfat tamponu ile 100 ml olacak şekilde tamamlandı.

Çizelge 3.3 CAT aktivitesi ölçüm prosedürü [62]

	Kör	Numune
H_2O_2 (ml)	2.8	2.8
Fosfat tamponu (ml)	0.2	-
Örnek (ml)	-	0.2

CAT enzimi aktivitesinin tayini için iki küvet alındı. Kör ve numune küvetleri olarak belirlendi. Her ikisine 2.8 ml 30 mM H_2O_2 eklendi. Kör küvetine fosfat tamponundan 0.2 ml eklendi. Numune küvetine fosfat tamponu eklenmedi. Son olarak sadece numune küvetine 0.2 ml örnek ilave edildi. İki işlemde sırasıyla yapıldı. Hızlı bir şekilde çalkalanarak spektrofotometrik yöntemle 240 nm de 1 dk aralıklarla iki kez okundu absorbansları okundu. İlk okuma A_1 , ikinci okuma A_2 olarak adlandırıldı.

Hesaplama: $U = \frac{2.3}{\Delta x} \times \log \frac{A_1}{A_2}$

$$U = \frac{2.3}{30} \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

Formülü ile hesaplanarak CAT aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.4. Glutasyon S-Transferaz (GST) Yöntemi

GST enzimi aktivitesi, GST, glutasyonun (GSH) 1-klor2,4-dinitro benzenle konjugasyonunu katalize eder. Bu reaksiyon 340 nm dalga boyunda absorbanstaki artışın okunması ile ölçülür [63].

Kullanılan çözeltiler

1. 0.25 mM KPO₄ Tamponu (pH 7.3)
2. 1 mM CDNB
3. 1 mM Redükte Glutasyon

1. 6.0963 gr K₂HPO₄ ve 3.7616 gr KH₂PO₄ tartıldı 250 ml saf suda çözüldü.
2. 0.0061 gr glutasyon 10 ml tamponda çözüldü.
3. 0.020255 gr CDNB 10 ml asetonda çözüldü ve üzerine 90 ml fosfat tamponu eklenip karıştırıldı.

GST enzimi aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek içeren küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir.

Çizelge 3.4 Glutasyon-S-Transferaz yöntemi

Çözeltiler	Kör (µl)	Örnek (µl)
KPO Tamponu	1100	1050
CDNB	50	50
GSH	50	50
Örnek	-	50

Küvetler çalkalanarak oda sıcaklığında 25 °C' de, 340 nm dalga boyunda, 2 dakika süresince absorbanstaki artış şeklinde ölçülür.

Hesaplama

$$\text{GST Aktivitesi } (\mu\text{mol/dakika/ml}) = \frac{\Delta\text{ABS}}{t} \times \frac{V_t}{0.0096 \times V_o}$$

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi } (\mu\text{mol/dakika/mg protein}) = \frac{\text{GST Aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

ΔABS = Zamana göre absorbans değişimi

V_t = Toplam Hacim

V_o = Örnek Hacmi

0.0096 = 1 mM CDNB' nin 1 cm' lik ışık yolunda verdiği absorbans değeri (ϵ katsayısı)

3.2.5. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi

APX aktivitesi Nakano ve Asada [64] yöntemine göre hesaplandı.

Kullanılan çözeltiler

1. 50 mM pH 7.0 Sodyum Fosfat Tamponu
2. 4 mM EDTA
3. 8 mM H_2O_2
4. 1 mM Askorbik Asit

1) 50 mM pH 7.0 Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanışı: 0.3677 g NaH_2PO_4 ve 0.2748 g Na_2HPO_4 tartılarak behere konuldu. pH 7'ye ayarlandı ve balon jodede saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2) 4mM EDTA Hazırlanışı: 0.1489 g EDTA tartılarak 100 ml'ye saf su tamamlandı.

3) 8 mM H_2O_2 'nin Hazırlanışı:

Yüzde otuzluk H_2O_2 ten 285 μL alınarak 10 mL saf suya konuldu ve iyice karıştırıldı. 900 μL sodyum fosfat tamponunun absorbansı 240 nm dalga boyunda ölçüldü (OD1). Bu çözeltiye seyreltilmiş olan %30 'luk H_2O_2 ' den 100 μL eklenerek optik dansitesi okundu (OD2). Ölçülen absorbans değeri $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ formülünde yerine konularak elde

edilen H_2O_2 (c) derişimine göre 8 mM olacak şekilde sodyum fosfat tamponu ile seyreltme yapıldı. H_2O_2 'nin 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı $\epsilon = 0,0436 \text{ mM/cm}^{-1}$ 'dir. $l = \text{ışık yolu}$; $A = OD_2 - OD_1$

4) 1 mM Askorbik Asit Hazırlanışı: 0.0176 g tartılarak saf su ile 100ml'ye tamamlandı.

Askorbat Peroksidaz enzim aktivitesini ölçebilmek için gerekli çözeltiler hazırlandıktan sonra spektrofotometreye aşağıdaki şekilde yerleştirildi. Örnek ve kör kuvvetleri aynı anda spektrofotometreye yerleştirildi. 30°C 'de 10 dakikalık inkübasyondan sonra hem kör hem de örnek kuvvetlerine H_2O_2 'den 125 μL eklendi. Oluşan tepkime sonucunda absorbans değerlerindeki değişim 3 dakika boyunca 290 nm'de ölçüldü (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.5 Askorbat Peroksidaz yöntemi

Çözeltiler	Kör (μL)	Örnek (μL)
Fosfat Tamponu	500	500
EDTA	25	25
Askorbik asit	-	250
Su	250	-

Hesaplama

$$APx \text{ (mmol/dak/mL)} = \frac{OD_0 - OD_3}{t(3)} \times \frac{V_t(1\text{mL})}{V_0(0.1\text{mL})} \times 2.8$$

OD_0 = Başlangıç absorbans değeri

OD_3 = 3.dakikadaki absorbans değeri

t = Zaman (dak)

V_t = Toplam hacim

V_0 = Örnek hacmi

$2.8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ = İndirgenmiş askorbatın 290 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

$$\text{APx spesifik aktivitesi (mmol/dak/mg protein)} = \frac{\text{Apx aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

3.2.6. Fenoloksidaz (PO) aktivitesi tayini

G. mellonella'nın PO enzim aktivitesinin [64] belirlenebilmesi için Sulfoxaflor'un farklı konsantrasyonlarıyla beslenen ve kontrol grubundan alınan son evre larvalar buz üzerinde bekletilerek hareketsizleşmesi sağlandı. Daha sonra larva diseksiyon iğnesiyle delindi ve larvadaki 5 µl hemolenf alınarak ependorf tüplere konuldu. Mikroplaka okuyucuda okundu.

Kullanılan çözeltiler

1. 10 mM Fosfat tamponu: Na₂HP0₄ (dibazik, 10 mM, 100 ml'de 138 mg) ve NaH₂P0₄ (monobazik, 10 mM, 100 ml'de 142 mg). Dibazik damla damla monobazike eklenip pH'ı 7.0'a getirildi.

2.DL-3,4, dihidroksifenilalanin (L-DOPA)

1ml fosfat tamponu içinde 3 mg'lık bir çözelti hazırlandı. L-DOPA suda veya fosfatta kolayca çözünür olmadığından önce küçük bir miktar asetonda seyreltildi ve sonra hacmi fosfat tamponu ile 1 ml'ye tamamlandı.

3. 5 µl hemolenf 95 µl 10 mM fosfat tamponu (pH 7.0) ile seyreltildi.

4. 5 dakika boyunca 4 ° C'de 10,000 g'de santrifüjlendi.

5. 40 µl tamponlu hemolenf süpernatantı alındı ve mikroplakada 160 µl L-DOPA ile karıştırıldı.

6. Mikroplaka okuyucuda (ELISA okuyucu) 30 dakika süresince 492 nm'de absorbanstaki lineer artış gözlemlendi.

7. Enzim aktivitesi 492 / dak / µl (absorbans birimleri) olarak ifade edildi.

Hesaplama

1. a) Absorbans çizerek absorbanstaki değişiklik (Δ A₄₉₂) dakika başına belirlendi.

b) Eğrinin doğrusal kısmında iki nokta seçip aşağıda ki denklem kullanıldı:

$$\Delta A_{492} / \text{dak} = A_{492} (\text{Süre 2}) - A_{492} (\text{Süre 1}) / \text{Süre 2 (dk)} - \text{Süre 1 (dk)}$$

Enzimatik olmayan kuyular için $\Delta A_{492} / \text{dak}$ oranını belirlendi ve bu oran numune kuyucuklarından çıkarıldı.

3.2.7. MDA(Malondialdehyde) tayini

Lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olarak oluşan MDA'nın ölçümü tiyobarbiturik asit (TBA) ile inkübasyonu sonucu oluşan kompleksin 535 nm'de absorbans ölçümü esasına dayanır.

Çözeltiler:

TBA (%0,8): 0.8 g TBA tartılır ve saf su ile 100 ml ye tamamlanır.

TCA (%20): 20 g TCA tartılır saf su ile 100 ml ye tamamlanır.

MDA aktivitesi için hazırlanan süpernatanttan 250 µl örnek alınır ve 125 µl % 20 lik TCA ile karıştırılır. Bu karışım 15000 devirde +4 °C de santrifüj edildi. Tüpteki süpernatant (yaklaşık 300 µl), 200 µl TBA ile karıştırılır ve 60 dk sıcak su banyosunda (90 °C) bekletilir. Daha sonra 535 nm de köre karşı okunur. Köre hazırlarken 250 µl saf su 125 µl TCA ve 200 µl TBA kullanılır.

Hesaplama: $A = C (\text{Konsantrasyon}) \times b l (\text{Işık yolu}) \times \epsilon (\text{Ekivalent değeri})$

$$C = \frac{A (\text{Okunan absorbans})}{b \times \epsilon (1,56. 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \mu^{-1})}$$
$$= \text{nmol} / \text{mg protein}$$

3.2.8. Protein Tayini

Peptit bağları tarafından indirgenmiş olan Cu^+ iyonlarının Folin–Ciocalteu reaktifi ile reaksiyonu temeline dayanır.

Kullanılan Çözeltiler

Çözelti A: [%2 Na_2CO_3 (0.10 N NaOH içinde)]: 2 g Na_2CO_3 tartılarak 0.10 N NaOH içinde toplam hacim 100 ml olacak şekilde tamamlandı.

Çözelti B1: (%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılarak çözelti saf su ile toplam hacim 100 ml olacak şekilde tamamlandı.

Çözelti B2: (%2 Na-K-tartarat): 2 g Na-K-tartarat tartılarak çözelti saf su ile toplam hacim 100 ml olacak şekilde tamamlandı.

Çözelti C: 50 hacim çözelti A, 1 hacim 1/1 oranındaki çözelti B1 ve B2 karışımı ile karıştırıldı.

Folin-ciocalteu çözeltisi: Kullanılmadan önce 1/1.5 oranında saf su ile seyreltilir.

Çizelge 3.6 Protein miktarının ölçüm prosedürü [66]

	Kör	Standart	Numune
Saf su(ml)	0.3	-	-
Standart(ml)	-	0.3	-
Örnek(ml)	-	-	0.3
Çözelti C(ml)	3	3	3
Karıştırılır ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilir.			
Folin-ciocalteu(ml)	0.3	0.3	0.3

Protein miktarlarının ölçümünde çözeltiye Lowry vd (1951) protein tayini metodu kullanılarak önce 100 ml de 0.10 gr albümin (Sigma; A- 2153) içeren bir stok çözelti olacak şekilde hazırlandı ve bu çözeltiden seyreltme yöntemi ile 0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 mg/ml albümin içeren standart çözeltiler elde edildi. Protein miktarlarının belirlenmesi için örnek sayısı kadar tüp alınarak numaralandırıldı. kör ve numune tüpleri numaralandırıldı. Kör tüpüne 0.3 ml saf su konuldu ve üzerine 3 ml çözelti C ilave edildi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmesi sağlandı daha sonra üzerine 0.3 ml Folin-ciocalteu eklendi vortekslendi. Bu şekilde hızlı karıştırılması sağlandı. 30 dakika kadar süre tutularak bekletildikten sonra 750 nm de absorbansları okundu. Numunelerin okunması için 0.3 ml örnek üzerine 3 ml çözelti C eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildi ve üzerine 0.3 ml Folin-ciocalteu ilave edilerek 30 dakika bekletildi. Sonrasında spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800) 750 nm de köre karşı absorbans değerleri okundu. Elde edilen absorbans değeri regresyon doğrusu denkleminde yerine konulmak suretiyle deney düzeneğinin bir tekrarındaki böceklerin toplam protein miktarı elde edildi. Regresyon denklemi aşağıda görüldüğü gibi elde edilmiştir.

$$y=0.0009x(R^2=0.9894)$$

3.2.9. Karbohidrat ve Lipid Miktarının Tayini İçin Böceklerin Homojenizasyonu

Karbohidrat ve Lipid miktarı tayini için, *G. mellonella* larvalarının yaş ağırlığı alınıp -80 °C de stoklanan bireyleri kullanıldı. Bu bireylerin buzunun çözünmesi sağlandıktan sonra melaninleşmeyi engellemek için birkaç fenilthioure kristali eklendi ve üzerlerine 2 ml sodyumsülfat eklenerek 24000 devir/10 dk da homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi sonrası tüplere 8 ml kloroform/metanol (1/2) çözeltisi eklenerek 9000 devir/dk da 10 dk santrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatanttan 0.2 ml alınarak karbohidrat miktarı için 0.2ml ise Lipid miktarı analizinde kullanıldı.

3.2.10. Lipid Miktarının Tayini

Lipid miktarının tayininini gerçekleştirmek için stoklanmış örnekler alınarak Van Handel (1985b) in yöntemi kullanıldı [67].

Çözeltiler;

1- %2 Na₂SO₄: 2 gr Na₂SO₄ tartıldı ve balon jode saf su ile 100 ml ye tamamlandı.

2- Vanilin-Fosforik Asit: 600 mg vanilin 100 ml sıcak suda çözüldü ve 400 ml %85 lik fosforik asitle karıştırıldı ve karanlıkta saklandı.

3- Konsantre Sülfürik Asit (%95–97)

4- Kloroform/Metanol Karışımı (1/2): 1\2 oranında hazırlandı.

Lipid miktarının analizi sonucu lipid değerlerini değerlendirebilmek için öncelikle lipid standart grafiği çizildi. Bu sebeple standart çözelti hazırlayabilmek için %0.10 lik mısır yağı kullanıldı. Standart çözeltinin konsantrasyon değeri 1 mg/ml olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan stok çözeltiden seri seyreltmeler ile 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 µg/ml olan çözeltiler hazırlandı. Elde edilen bu çözeltilerin 200 µl si cam tüplere ilave edildi. Bu cam tüpler, kloroform/metanol çözeltisinin buharlaşabilmesi için 90°C lik sıcak su banyosunda tamamının buharlaşması gerçekleşinceye kadar ısıtılması sağlandı. Buharlaşma olayı bitince tüpler alınarak biraz soğutulup üzerlerine 40 µl konsantre sülfürik asit çözeltisi eklendi ve vortekslendi. Ardından 2 dk. daha 90°C lik su banyosunda ısıtıldı. Süre sonunda soğutulan tüplere 960 µl vanilin-fosforik asit reaktifi konuldu karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dakika beklendi ve renk oluşumu gözlemlendi. Ardından tüpler son kez karıştırılarak numunelerin absorbans değerleri spektrofotometrede 525 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Bu işlemler her standart çözelti konsantrasyonu için üç kez tekrarlandı. Elde edilen absorbans değerleri ile standart lipid grafiği (regresyon eğrisi) çizildi.

$$y=0.0066x(R^2= 0.9823)$$

Örneklerin lipid miktarlarının analizi için santrifüj sonunda oluşan süpernatantlardan 200 µl örnek alıp cam tüplere eklendi. Tüplerin içlerindeki kloroform/metanol çözeltisinin tamamı buharlaşmaya kadar 90°C deki su banyosunda ısıtıldı. Tüpler banyodan çıktıktan sonra soğutuldu ve üzerine 40 µl konsantre sülfürik asit çözeltisi eklendi tüpler vortexlendi. 2 dk daha 90°C deki su banyosunda ısıtıldı. Ardından tekrar soğutulan her tüpün üzerine, 960 µl vanilin-fosforik asit reaktifi eklendi tüpler 30 dk oda sıcaklığında bekletildi ve renk oluşumu gözlemlendi. Daha sonra tüpler karıştırıldı ve numuneler köre karşı absorbans değerleri spektrofotometrede 525 nm dalga boyunda okundu. Okunan absorbans değerleri, standart grafikte yerine konularak değerlendirildi ve toplam lipid miktarı belirlendi.

3.2.11. Karbohidrat Miktarının Tayini

Karbohidrat miktarının analizinde Van Handel (1985a) in yöntemi kullanıldı [68].

Çözeltiler;

1. Antron Çözeltisi: 750 mg antron, 150 ml bidistile saf su ve 380 ml konsantre H₂SO₄ içerisinde çözüldü.

2. %2 lik Sodyum Sülfat (Na₂SO₄) çözeltisi: 2 gr Na₂SO₄ tartıldı ve son hacim 100 ml olacak şekilde saf su içinde çözüldü.

3. Kloroform/Metanol Karışımı (1/2): 1\2 oranında hazırlandı.

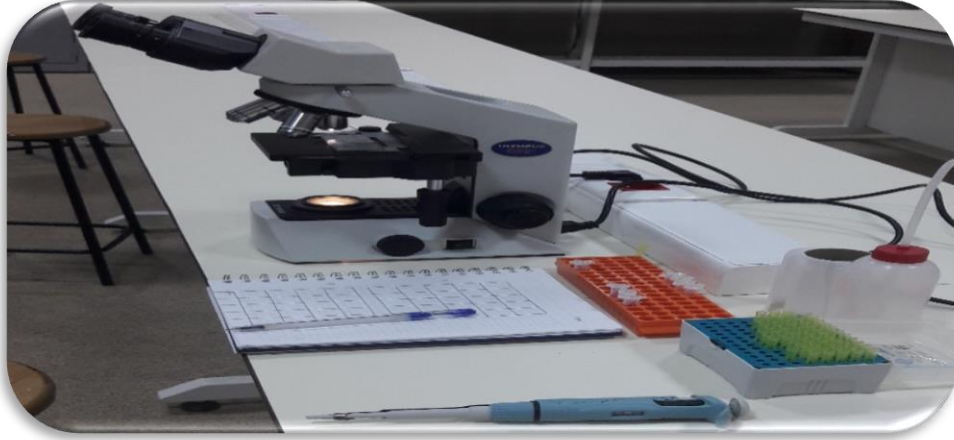
Karbonhidrat miktarının analizi öncesinde mililitresi 0.10 g glikoz içeren stok çözelti hazırlandı. Karbohidrat miktarının tayin etmeden önce bir stok çözelti hazırlandı ve burdan seyreltme yöntemi ile 0.025, 0.050, 0.075, 0.10, 0.125, 0.150, 0.2, 0.250, 0.3, 0.350 mg/ml glikoz standart çözeltileri elde edildi. Numuneler spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu ve elde edilen absorbans değerlerinden standart glikoz regresyonu denklemi elde edilerek regresyon doğrusu çizildi.

$$y = 2.9558x \text{ (R}^2= 0.99\text{)}$$

Karbohidrat miktarı tayini için, santrifüj ile oluşan süpernatantlardan 200 µl örnek alınarak cam tüplere aktarıldı. Bu tüpler, içlerindeki kloroform/metanol çözeltisinin tamamı buharlaşınca kadar 90°C deki su banyosunda bekletildi. Tüplerin soğuması sağlandıktan sonra içerisine 1 ml antron çözeltisi ilave edilerek yine 90°C de 15 dakika bekletildi. Ardından buzdolabında soğutulan tüplerdeki örneklerin absorbans değeri spektrofotometrede 625 nm de okundu. Elde edilen bu absorbans değerleri regresyon denkleminde yerine konularak, 1 ml örneğin içindeki total karbohidrat miktarı mg cinsinden elde edildi.

3.2.12. Toplam Hemosit Sayıları

G. mellonella'nın yedinci evredeki larvalarında toplam hemosit sayılarını belirlemek için kullanıldı. Bu larvaların karın bölgesi etanol ile temizlendikten sonra hareketini yavaşlatmak amacıyla buz üzerinde bekletildi. Larvaların arka bacaklarının üst kısmından diseksiyon iğnesiyle delindi ve 5 µl hemolenf alındı. Alınan hemolenf içerisinde 45 µl Tauber-Yeager çözeltisi (0.005 gr kristal viole, 0.12 ml asetik asit, 0.11 gr CaCl₂, 0.15 gr KCl ve 4.65 gr NaCl) bulunan buz üzerinde bekletilen ependorf tüplerine aktarıldı. Burdan mikropipet ile 1: 10 oranında seyreltilmiş hücre süspansiyonu birkaç kez çekilerek bırakıldı ve karışması sağlandı. Bu süspansiyonundan 10 µl mikropipet ile çekilerek 0.10 mm derinliğe sahip Neubauer hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer; Superior, Germany) yüklendi. Hemositler Olympus CX21 marka mikroskop sayıldı.

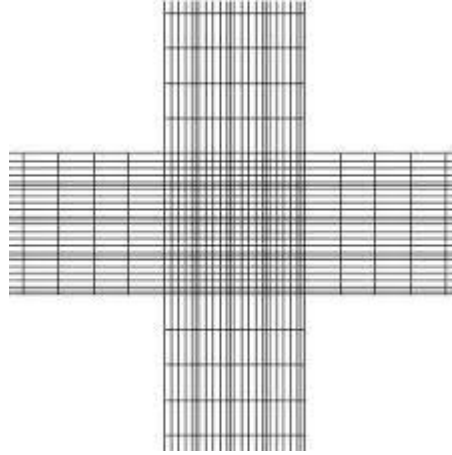


Resim 3.1 Hemosit sayımı

Neubauer hemositometresi ile toplam hemosit miktarının hesaplayabilmek için üzerinde iki farklı sayım alanı bulunan ve bu sayım alanlarının bir çukurlukla birbirinden ayrıldığı sayma lamıdır. Neubauer hemositometre lamında örnek mikropipet ile lama bırakıldı ve üstüne lameli bırakıldı. Lamel bırakılınca lam üzerinde üç yükselti olduğu ve ortadaki yükseltinin diğer ikisinden 0.10 mm aşağıda olduğu görülmektedir. Lam üzerinde 2 sayma alanı bulunmaktadır. Bu sayma alanları bir çukurlukla birbirinden ayrılmaktadır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane büyük kare vardır. Bunlar ise 16 tane orta büyüklükte kareye bölünmüştür. Ortadaki büyük kare ise 25 eşit orta kareye ayrılmıştır. Yani toplam 400 tane küçük kare bulunmaktadır. Küçük karelerin içerisindeki hemositler sayıldı ve not edildi.



Resim 3.2 Neubauer hemositometre lamı



Resim 3.3 Neubauer Hemositometresi sayım alanı

3.2.13. Mikronükleus Sayılarının Belirlenmesi

G. mellonella larvalarında mikronükleus sayılarının belirlenebilmesi için Olympus CX21 marka mikroskoplar altında Venier vd. (1997) tarafından gösterilmiş olan kriterler esas alınarak giemsa ile boyanmış preparatlar incelendi [69].

Çözeltiler;

1. 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içerisinde çözüldü. (PH:4.8'e ayarlandı).
2. 14.83 gr Na_2HPO_4 250 ml saf su içerisinde çözüldü. (PH:9.8'e ayarlandı)
3. 5 ml giemsa boya +5 ml 1. çözelti+ 5 ml 2. çözelti alınarak 100 ml' ye tamamlandı.

G.mellonella larvalarının abdomen bölgesi etanol ile temizlendikten sonra hareketini yavaşlatmak amacıyla buz üzerinde bir kaç dakika bekletildi. Larvaların arka bacaklarının üst kısmından diseksiyon iğnesiyle delindi ve hemolenf alındı. Yayma işleminden sonra kurumaya bırakıldı. Lamin kenarına kurşun kalemle konsantrasyonu yazıldı. Daha sonra şaleya metil alkol konuldu ve fiksasyon yapıldı. 5 dk bekletildikten sonra akıtıp kuruması beklendi. Ardından giemsa boyada 10 dk bekletildi. Süre sonunda saf su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamalar entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirildi.

Mikroskop altında ana nükleustan ayrı, temas halinde olmayan, ana nükleustan küçük ve nükleusla aynı tonda boyanmış yapılar mikronükleus olarak değerlendirildi.



Resim 3.4 Mikronükleus sayımı için hazırlanan preparatlar

3.2.14. Comet analizi (Tek hücre elektroforezi) protokolü

Kullanılan çözeltiler;

1. NMA (Normal Melting Agarose)
2. LMA (Low Melting Agarose)
3. 10X TBE Tris : 81gr
4. Borik Asit: 41,gr
5. EDTA (0,5M): 30ml

(0,5M EDTA: 18,61gr EDTA+ 2gr NaOH + 80 ml dH₂O) Toplam 750ml'ye tamamlandı.

6. Lizing Stok Solüsyonu: NaCl: 146.1 g, EDTA: 37.2, Tris: 1.2 gr

Yukarıda belirtilen maddeler 1000 ml'lik mezür içerisinde tartıldı. Üzerine 10gr NaOH eklenip ve pH 10'a ayarlandı.

7. Lizing stok solüsyon: 99 ml

Triton X: 1 ml

Na lauril sarkosinat:1gr

DTT (65 ml için): 0.09 gr

Çalışma öncesinde yukarıdaki solüsyon hazırlanıp +4°C'ye koyuldu. Bu solüsyon çalışma sırasında soğuk olarak kullanıldı. Hazırlarken DTT hariç tüm solüsyonları eklenip iyice karıştırıldı ve bir şaleye aktarıldı. Solüsyon hazırlandıktan sonra DTT'yi 0.09 gr tartılıp şaleye doğrudan eklendi ve mikropipet yardımıyla çözünmesi sağlandı. DTT toz halde bir madde ve bu solüsyon içerisinde zor çözünebilir olduğundan en az 5 dakika karıştırıldı. Steril PBS: Hazır tablet kullanıldı. (pH 7)

Çalışma Öncesi Hazırlık:

1. Lamlar çalışmadan önce temizlendi. Lamın buzlu olan kısmına kursun kalem ile işaret koyuldu.
2. Lamların NMA ile kaplanması:
 - a. Bu işlemde öncelikle %1'lik NMA hazırlanması gerekmektedir. Bunun için; 1gr 1. NMA tartıldı. Bu 100 ml steril PBS içerisinde mikrodalga (veya bek alevi) kullanarak eritildi.
 - b. Eritilen NMA 100 ml'lik bir beher veya şale içerisine döküldü. Sıvı halde ve sıcak olan NMA 60-70°C'y kadar soğutuldu. Ardından, daha önce hazırladığımız temiz lamlar işaretli kısımlarından tutularak bu beher içerisine daldırıldı ve 7 saniye bekletildi.
 - c. Ardından lamı çıkarıldı ve tuvalet kâğıdı ile lamın alt kısmı silindi. Lamlar oda sıcaklığında bir gece bekletildi.

COMET testi karanlık (loş) bir ortamda yapıldı. Hemolenfler 1200 devir/ 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atıldı. Peletin üzerine 1ml PBS eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Bu sırada LMA 37 °C'ye getirildi. Örnekten mikropipet yardımıyla her bir NMA ile kaplı preparat başına 100.000 hücre olacak şekilde hücre alındı ve bu bir ependorf tüpünde su banyosundaki (veya etüv) LMA ile karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığındaki, lamların üzerine 3 damla olacak biçimde

yayıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı. Lamelleri kapatıldıktan sonra 20-25 dakika donmaları bekletildi. Preparatlar önceden hazırlanıp +4°C’ te şale içerisinde bekleyen lizing solüsyonuna koyulmuş ve +4°C’ te 1 saat bekletildi. 1 saat sonunda solüsyona 15 µl Proteinaz K eklenmiş pastörle veya 1000 µl’lik mikropipet ile solüsyonu birkaç kez yavaşça çekip bırakıldı ve 37°C’ de 2 saat inkübe edildi. 2 saat sonunda preparatlar elektroforez tankı içerisinde tablaya veya tablanın konulduğu yere yerleştikten sonra tankın bir kenarından önceden soğutulmuş soğuk 1XTBE yavaşça tankın içerisine eklendi. 20 dakika sonunda tankın üstünü açmadan 25 dakika 26V’ da yürütüldü. Yürütme aşaması bitince preparatlar tanktan yatay biçimde alıp laboratuvar ortamında kurumaya bırakıldı. Kuruyunca +4°C’te bulunan preparat kutusuna koyuldu. Floresan mikroskopta örneklerin comet analizi yapıldı. Değerlendirme için lamalar kutudan alınıp en az 1 saat önce lamalar 8µg/ml konsantrasyonunda EtBr ile boyandı. Her slayta 50µl EtBr 3 damla halinde damlatıldı ve üzeri lam ile kaplandı.

Hesaplama

Sıfır (0) değeri hasarsız hücreyi, bir (1) değeri az hasarlı hücreyi, iki (2) değeri hasarlı hücreyi, üç (3) değeri orta hasarlı ve dört (4) değeri çok hasarlı hücreyi temsil etmektedir.

3.2.15. Sulfoxaflor’un *G.mellonella*’nın Biyolojisine Etkisi

Yaşama ve gelişme ile ilgili deneylerde Sulfoxaflor’ un 0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1 µg/20 g besin bileşimine ikinci evre larvalarından her kaba 2’şer tane konuldu. İki ayrı etüvde her seferinde 2 konsantrasyon çalışıldı. Daha sonra son evreye gelmiş larvalar alınarak pup olmalarını sağlamak için 30 ml’lik geniş ağızlı kapların içine katlanmış, ince pembe pelür kağıt konuldu. Sağlıklı ve gelişmiş dişiler, vida kapaklı plastik kabın (ORLAB, L190030, 35x55 mm) içine bırakıldı. Larvaların pup sarabilmesi için pelur kağıt parçaları buruşturularak kavanozun içine bırakıldı ve kuru bir ortam sağlandı. Her konsantrasyonun her tekrarında larval, pupal ve ergin evreler için 20 birey kullanıldı.



Resim 3.5 Deney besinlerinin içinde bulunduğu kaplar

3.2.15.1. Son Larval evreye ulaşma süresi

İkinci larval evreden itibaren farklı dozlarda Sulfoxaflor içeren besin ile beslenen deney gruplarına ve kontrol grubuna ait larvaların son evreye kadar olan gelişim süreleri gün olarak belirlendi.

3.2.15.2. Pup sarma süresi

Farklı konsantrasyonlardaki Sulfoxaflor' un, larvaların pup sarma süresine etkilerini belirlemek için her gün aynı saatte kaplarda günlük değişimler takip edilerek her bireyin pup sarma süresi gün olarak belirlendi. Pupa olanlar alınarak pupa oluş tarihleriyle beraber ölenler ve gelişimini tamamlayamayan larvalar kaydedildi. Pelür kağıtların içinde bırakılmış son evre larvalar her gün kontrol edilerek pupa olanlar alındı. Son larval evre ile tam pup olana kadar geçen süre gün olarak hesaplandı.



Resim 3.6 İçinde pelür kağıt ve son evre larvalarının bulunduğu kaplar

3.2.15.3. Ergin olma süresi

Kabın içerisindeki pelur kağıda pup sarmaları için konulan larvalar günlük olarak gözlemlendi ve buradaki puplardan erginleşen bireyler alındı. Pupal evre ile ergin oluncaya kadar geçen süre ergin olma süresi olarak belirlendi. Erginleşen bireylerin eşeyleri belirlendi ve not edildi.

3.2.15.4. Ergin Yaşam Süresi

Sulfoxafloor uygulanan larvalardan tam pup sarmış bireylerden erginleşenlerin her gün günlük değişimleri takip edilerek her bireyin ergin olduktan sonra ölümüne kadar geçen süreleri belirlendi.

3.2.15.5. Son larval evreye ulaşma oranı

Farklı konsantrasyonlardaki Sulfoxafloor' un besine ilave edildiği deney grubu ve kontrol grubunun ikinci larval evreden son larval evreye kadar ulaşan ve ulaşamayan bireylerinin sayısı belirlendi ve yedinci evreye ulaşma oranları gün olarak hesaplandı.

3.2.15.6. Puplaşma ve erginleşme oranı

Farklı konsantrasyonlardaki Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının puplaşma ve erginleşme oranlarına etkilerini belirlemek amacıyla her gün aynı saatte kaplardaki günlük değişimler takip edilerek bireylerin pup ve ergin olup olmama durumları belirlendi. Pup olan ve olamayan bireyler sayılarak puplaşma oranı, pupalardan erginleşen ve pupadan çıkamayan bireylerin sayısı belirlenerek erginleşme oranları hesaplandı.

3.2.15.7. Erkek ve dişi ömür uzunluğu

Farklı Sulfoxaflor konsantrasyonlarının besine ilave edilmesiyle yetiştirilen *G.mellonella*'nın dişi ve erkek bireylerin ömür uzunluklarına etkisini belirlemek için her konsantrasyonun her tekrarındaki erkek ve dişi bireyler tespit edildikten sonra pupadan çıkıp ölünceye kadar geçirdiği süre gün olarak kaydedildi.

3.2.15.8. Toplam Yumurta Sayısı

Dişi erginler 30 ml'lik geniş ağızlı, hava almasını sağlayan vida kapaklı bir plastik kabın içine doğru tabana değmeyecek ve uçları dışarda kalacak şekilde yerleştirilen tela bezinin tabanına bırakıldı. Dişi bireylerin yumurta bırakabilmesi için birkaç gün $28\pm2^{\circ}\text{C}$ ve $\%65\pm5$ nem ortamında bekletildi. Erginin 48 saat içinde bıraktığı yumurtaların zarar görmesini engellemek amacıyla yumuşak uçlu ince bir fırça kullanıldı. Tela bezinden alınan yumurtaların sayımı mikroskopta yapıldıktan sonra her dişi bireyin yumurtası alınarak açılımını hesaplamak üzere 15' ml lik kaba konuldu. Belirli süre (1-3 gün) içerisinde bıraktığımız yumurtaların açılması için kaplar $30\pm2^{\circ}\text{C}$ ve $\%65 \pm 5$ nemli ortamda bekletildi. Kapağı kapatılıp hangi konsantrasyona ait olduğu yazılıp günlük takibi yapıldı. Buradan açılan yumurta sayıları ve çıkan larvalar mikroskopta gözlenerek not edildi. Bir günde bırakılan

yumurta sayısı, açılan yumurta sayısı ve açılmayan yumurta sayısı belirlendi. Bu bilgilere dayanarak yumurta açılma yüzdesi hesaplandı.



Resim 3.7 Açılan yumurtaların mikroskopik görüntüsü

3.3. Verilerin istatistiksel analizi

Deney ve kontrol gruplarından elde edilen verilerin kendi aralarında da karşılaştırılmak suretiyle varyans analiz yöntemi, ortalamalar arası farkın önem kontrolünde ise Student Newman Keul's (SNK) testi, verilerin arasındaki ilişkinin ortaya konmasında SPSS 20.00 istatistik veri paketi kullanılarak uygulandı. Farklı harfi içeren veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırımın var olduğu kabul edildi. Deneyler değişik zamanlarda 5 'er kez tekrar edildi.

4. BULGULAR

Farklı Sulfoxaflor konsantrasyonlarının (0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1 µg/20 gr besin) *G. mellonella* larvalarının SOD, CAT, APX, GST aktivitesi ve MDA miktarı üzerine etkisi tablo 4.1 gösterilmiştir. PO aktivitesi tablo 4.2 de verilmiştir. Protein, karbonhidrat ve lipid miktarı üzerine etkisi ise tablo 4.3 de gösterilmiştir. *G. mellonella* larvalarının hemosit sayısı ve mikronükleus oluşumuna etkisi tablo 4.4’de, *G. mellonella* larvalarının genotoksik hasarı üzerine etkisi (comet analizi) tablo 4.5’de, *G. mellonella* larvalarının bıraktıkları toplam yumurta sayısı, açılan yumurta sayısı, açılan yumurtaların yüzdesi üzerine etkisi tablo 4.6’de, sulfoxaflor’un *G. mellonella* larvalarının Son larval evreye ulaşma süresi, pup olma süresi, ergin olma süresi, Son larval evreye ulaşma oranı, pup olma oranı, erginleşme oranı üzerine etkisi tablo 4.7’de, Erkek ve dişi bireylerinin ömür uzunluğuna etkisi tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının SOD, CAT, GST, APX aktivitelerine ve MDA miktarlarına etkileri

Sulfoxaflor (µg/20 gr Besin)	SOD (U/mg protein) (ORT±SH)	CAT (U/mg protein) (ORT ±SH)	MDA (nmol/mg) ORT ±SH:	GST (U/mg protein) ORT ±SH:	APX (U/mg protein) ORT ±SH:
0.00**	1.454±0.160 a	5.526±0.960 a	41.74±0.743 a	31.321±4.020 b	0.107±0.001 a
0.01	1.846±0.036 b	5.692±0.166 a	51.844±1.339 b	37.096±0.807 bc	0.197±0.059 c
0.10	1.876±0.046 b	5.604±0.0705 a	56.194±1.442 b	37.477±0.904 bc	0.234±0.007 d
0.25	2.086±0.0478 b	5.500±0.118 a	55.338±1.174 b	39.625±0.876 c	0.214±0.181 cd
0.50	2.106±0.0492 b	6.504±0.153 b	65.040±1.755 c	41.812±1.976 c	0.294±0.009 e
1.00	4.830±0.268 c	7.142±0.191 c	84.748±3.236 d	17.921±1.526 a	0.166±0.007 b

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

(ORT±SH)* Aritmetik ortalama ± Standart hata

** : Kontrol

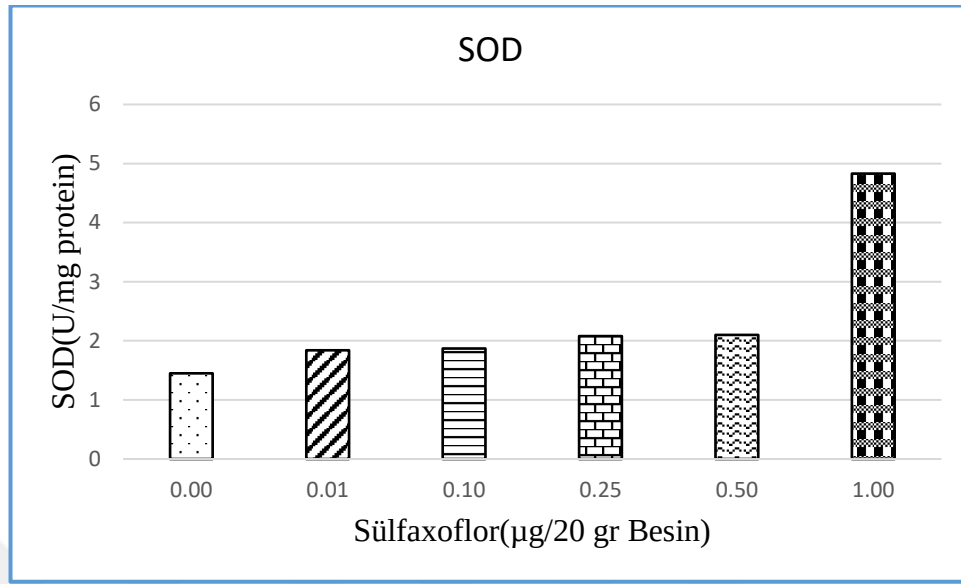
Tablo 4.2 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının PO enzimi aktivitesine etkisi

Sulfoxaflor (µg/20 gr Besin)	0' (U/mg protein) (ORT±SH)*	10' (U/mg protein) (ORT±SH)*	20' (U/mg protein) (ORT±SH)*	30' (U/mg protein) (ORT±SH)*	Total (U/mg protein) (ORT±SH)*
0.00**	0.115±0.0024 a	0.144±0.0051 a	0.174±0.0068 a	0.202±0.0076 a	0.159±0.0079 a
0.01	0.056±0.0007 b	0.056±0.0007 b	0.057±0.0008 b	0.059±0.0008 b	0.057±0.0004 b
0.10	0.052±0.0003 b	0.053±0.0003 b	0.053±0.0003 b	0.054±0.0003 b	0.053±0.0002 b
0.25	0.053± 0.001 b	0.053±0.0012 b	0.054±0.0012 b	0.055±0.0015 b	0.054±0.0006 b
0.50	0.054±0.0006 b	0.054±0.0007 b	0.054±0.0008 b	0.054±0.0008 b	0.054± 0.0003 b
1	0.053±0.0007 b	0.054±0.0005 b	0.054±0.0006 b	0.054±0.0007 b	0.054±0.0003 b

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

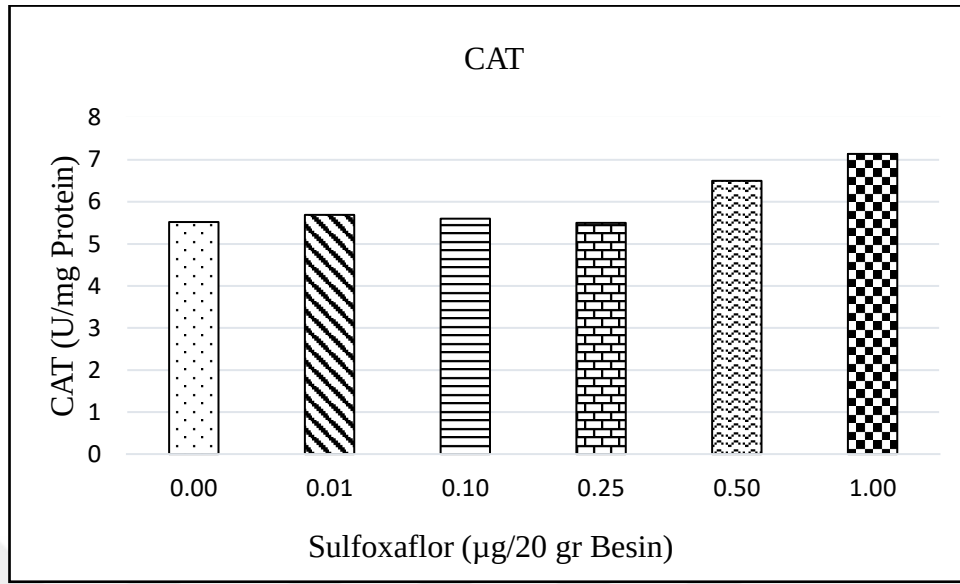
(ORT±SH)* Aritmetik ortalama ± Standart hata

** : Kontrol



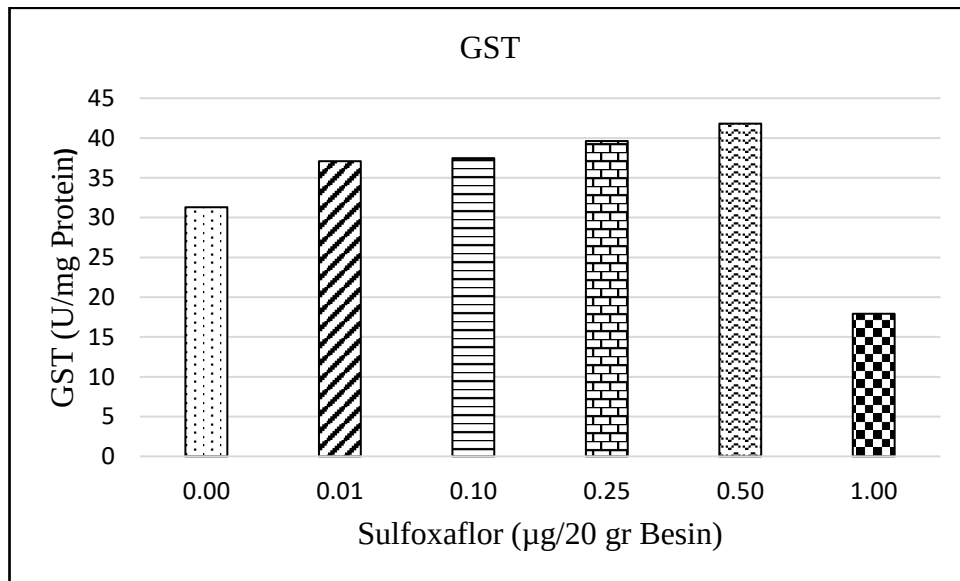
Şekil 4.1 Sulfoxaflo’r’un *G. mellonella* larvalarında SOD aktivitesi üzerine etkisi

Besinin Sulfoxaflo içeren bütün konsantrasyonlarında (0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 µg/20 gr besin) *G. mellonella* larvalarının SOD aktivitesi kontrole göre artış göstermiştir. Konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında SOD aktivitesinin her konsantrasyonda bir önceki konsantrasyona göre arttığı fakat aralarında istatistiki bir fark olmadığı görülmüştür. 1.00 µg ‘da SOD aktivitesinin diğer konsantrasyonlara kıyasla önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. SOD aktivitesi kontrol 1.45 U/mg protein iken Sulfoxaflo içeren gruplarda sırasıyla 1.84, 1.87, 2.08, 2.1, 4.83 U/mg protein olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).



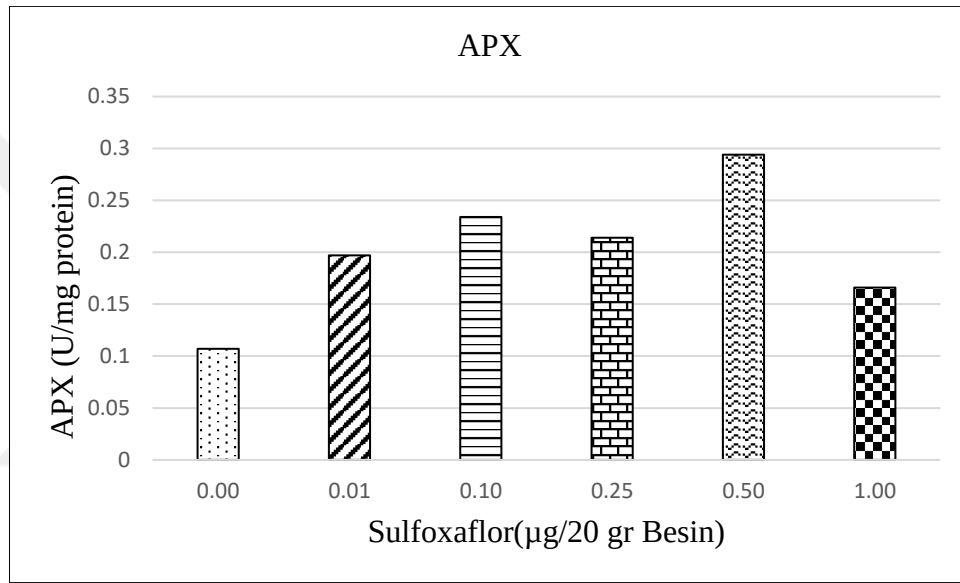
Şekil 4.2 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarında CAT aktivitesi üzerine etkisi

Besinin 0.01, 0.10, 0.25 µg Sulfoxaflor içermesi durumunda kontrole karşılaştırıldığında CAT aktivitesinde istatistiki bir ayrım söz konusu değildir. Sulfoxaflorun yüksek konsantrasyonlarında (0.50 ve 1.00µg) CAT aktivitesi kontrole ve diğer konsantrasyonlara göre önemli bir artış göstermiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.2).



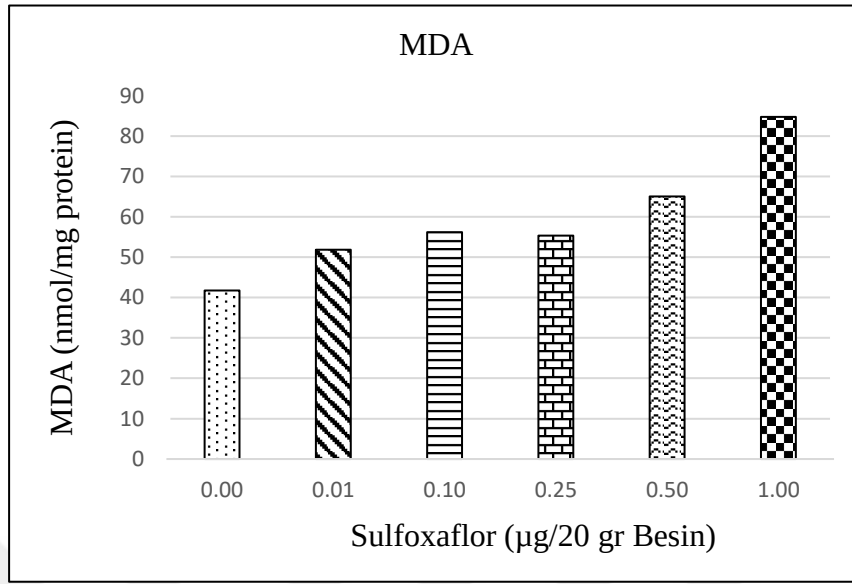
Şekil 4.3 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarında GST aktivitesi üzerine etkisi

Besinin (0.01, 0.10, 0.25, 0.50 μg) Sulfoxaflor içermesi durumunda konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında GST aktivitesinde istatistiksel fark gözlenmemiştir. Besinin 1.00 μg Sulfoxaflor içermesi (17.92 U/mg protein) durumunda gerek kontrole (31.32 U/mg protein) gerekse diğer konsantrasyonlara göre GST aktivitesi önemli ölçüde düşmüştür. Bu durum elde edilen veriler arasında en düşük değer olarak tesbit edilmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.3).



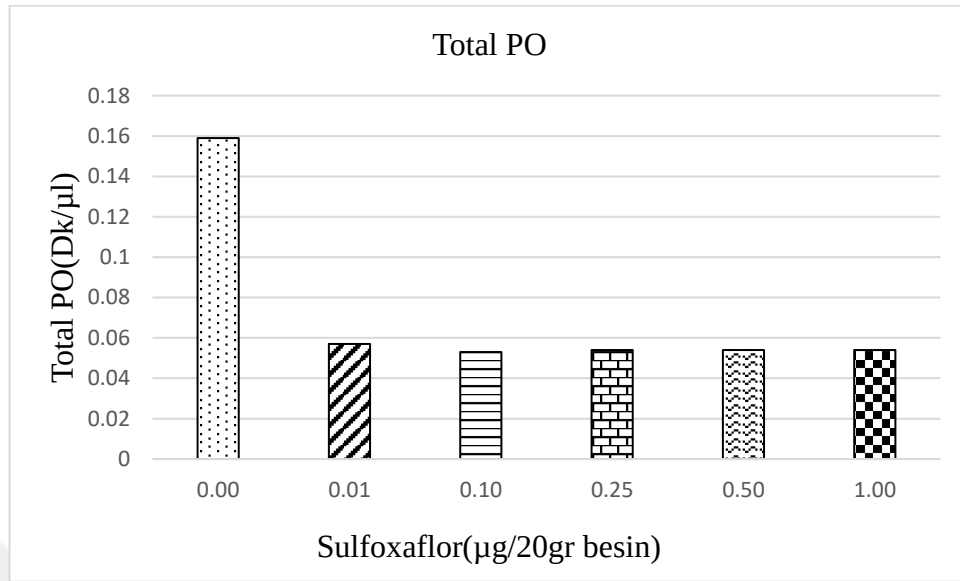
Şekil 4.4 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarında APX aktivitesi üzerine etkisi

Denenen tüm Sulfoxaflor konsantrasyonlarında APX aktivitesinin kontrole göre arttığı gözlenmiştir. Konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında 0.1 ile 0.25 μg arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı ve 0.01 μg göre APX aktivitesinin artmış olduğu gösterilmiştir. En yüksek APX aktivite artışı 0.50 μg da görülmüştür. 1.00 μg konsantrasyon da ise en düşük APX aktivitesi gözlenmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.4).



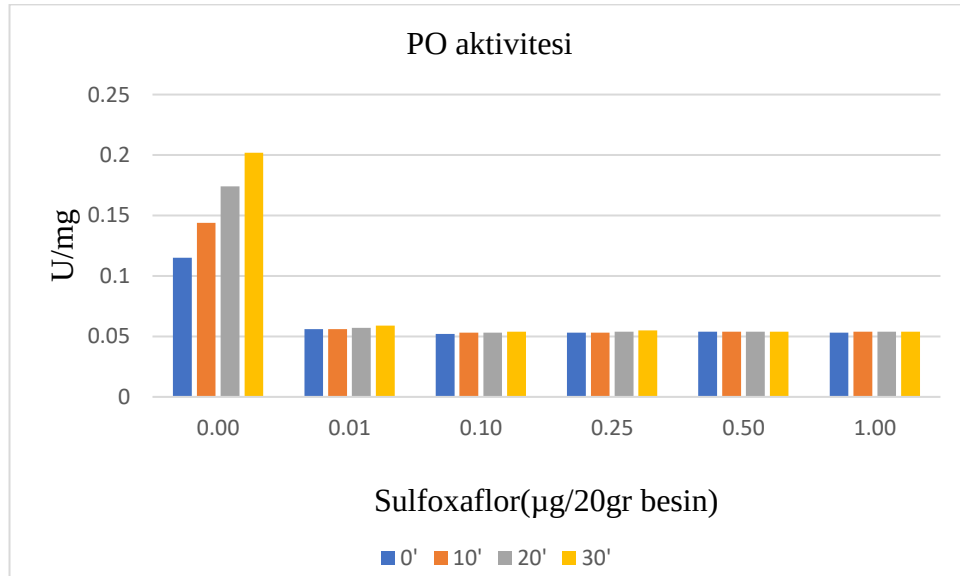
Şekil 4.5 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarında MDA miktarı üzerine etkisi

Tüm konsantrasyonlarda MDA miktarının kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0.05$). Konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında besinin 0.01, 0.10, 0.25 µg Sulfoxaflor içerdiği durumlarda istatistiki bir fark olmadığı fakat 0.50 ve 1.00 µg a göre daha düşük olduğu görülmüştür. En yüksek MDA oranı besinin 1.00 µg Sulfoxaflor içermesi durumunda elde edilmiştir. Bu oran deneyde kullanılan en yüksek Sulfoxaflor konsantrasyonudur. Maksimum MDA miktarlarını 0.166 nmol/mg olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.5).



Şekil 4.6 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* hemolenfinde PO aktivitesi üzerine etkisi

Sulfoxaflorun denenen tüm konsantrasyonlarda *G. mellonella* son evre larvalarında hemolenfte fenoloksidaz aktivitesinin kontrole göre azaldığı belirlendi. 30' boyunca okuma yapılarak bu sürenin ortalaması sonucu 0', 10', 20', 30' da PO enzimi aktivitesinin kontrole göre düştüğünü ortaya çıkarmıştır (Tablo 4.2). Konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiki fark görülmemiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.7 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde PO aktivitesi üzerine etkisi

Sulfoxaflor'un denendiği tüm konsantrasyonlardan alınan *G.mellonella* larvalarının hemolenfi ile yapılan enzim analizi sonucu 0, 10, 20 ve 30.dakikalarda deney grupları kontrol ile karşılaştırıldığında azalma olduğu fakat deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiki fark olmadığı ortaya çıkmıştır($p<0.05$).



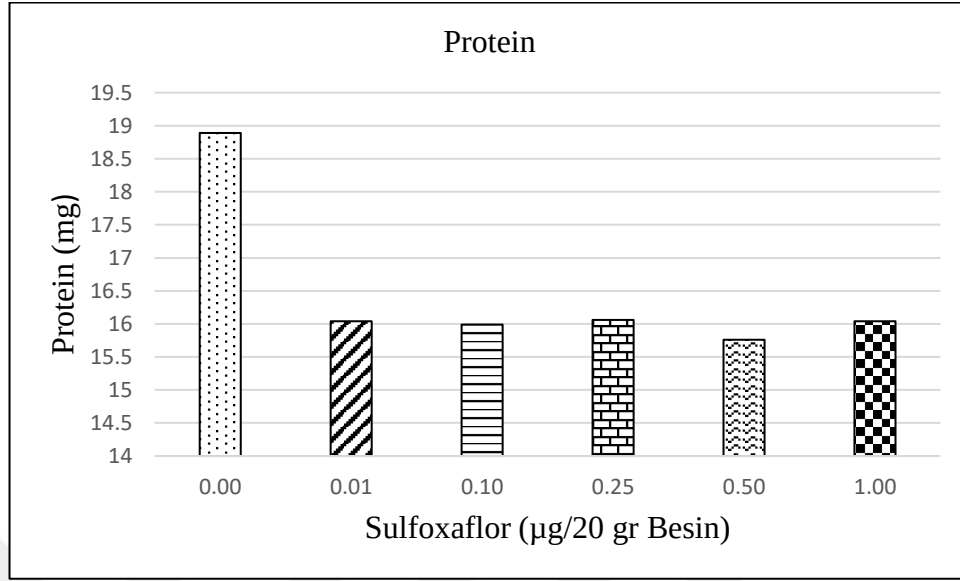
Tablo 4.3 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının Protein, Lipid ve Karbonhidrat miktarlarına etkisi

Sulfoxaflor (µg/20 gr Besin)	Protein (mg)	Karbonhidrat (mg)	Lipid (mg)
0.00**	18.89±0.20 a	9.02±0.22 a	8.82±0.19 a
0.01	16.04±0.43 b	7.59±0.47 b	6.40±0.25 b
0.10	15.99±0.19 b	7.92±0.20 b	6.12±0.18 b
0.25	16.06±0.57 b	7.67±0.26 b	4.43±0.21 d
0.50	15.76±0.53 b	6.42±0.26 c	4.15±0.05 d
1.00	16.04±0.40 b	5.88±0.18 c	5.45±0.18 c

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

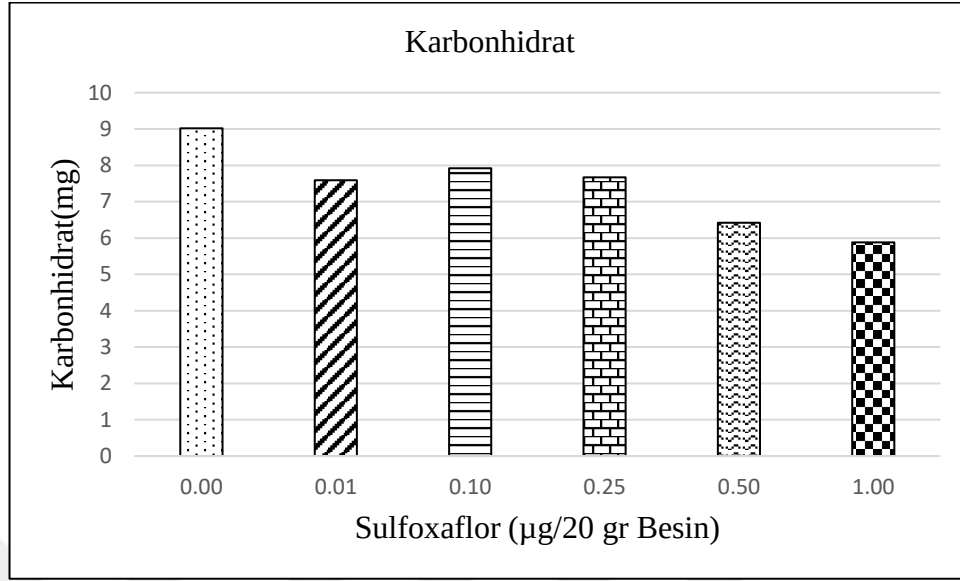
(ORT±SH)* Aritmetik ortalama ± Standart hata

** : Kontrol



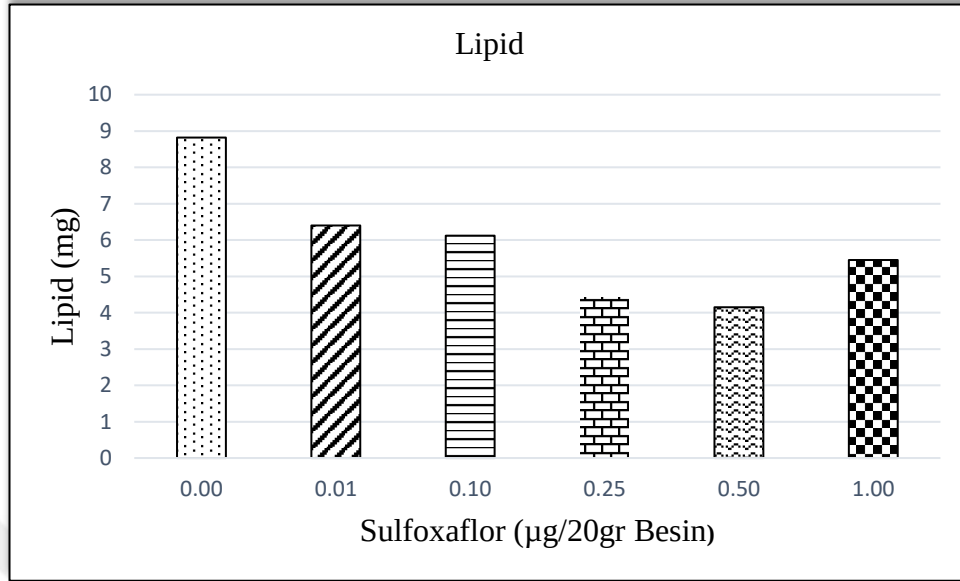
Şekil 4.8 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarında Protein miktarı üzerine etkisi

Farklı Sulfoxaflor konsantrasyonları protein miktarını etkilemiştir. Sulfoxaflor'ın bütün konsantrasyonlarında protein miktarı önemli ölçüde kontrole göre azalmıştır. Sulfoxaflor oranındaki artışa bağlı olarak protein miktarında kontrole göre düşüşler gözlenmiştir fakat denenen insektisit oranlarından elde edilen veriler kendi aralarında incelendiğinde istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Besindeki farklı Sulfoxaflor konsantrasyonlarının (0.01, 0.10, 0.25, 0.50 µg), *G.mellonella* larvalarının protein miktarına etkileri Tablo 4.3 ve Şekil 4.8' de gösterilmiştir.



Şekil 4.9 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarında Karbonhidrat miktarı üzerine etkisi

Sulfoxaflor'un denenen tüm konsantrasyonlarında karbonhidrat miktarında kontrole göre azalma görülmüştür. Konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında 0.01, 0.10 ve 0.25 µg da istatistiki fark gözlenmezken 0.50 ve 1.00 µg da düşüşün artığı görülmüştür. Son iki konsantrasyon arasında da anlamlı bir fark görülmemiştir. Besindeki farklı Sulfoxaflor konsantrasyonlarının (0.01, 0.10, 0.25, 0.50 µg), *G. mellonella* larvalarının karbonhidrat miktarına etkileri Tablo 4.3 ve Şekil 4.9' de gösterilmiştir.



Şekil 4.10 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarında Lipid miktarı üzerine etkisi

Sulfoxaflor'un farklı konsantrasyonlarının verildiği *G. mellonella* larvalarında lipid miktarının etkilendiği ve kontrole göre azaldığı görülmüştür. Denenen konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ilk iki konsantrasyon (0.01, 0.10 µg) arasında anlamlı fark görülmezken (6.4 ve 6.12 mg), diğer iki konsantrasyonda (0.25, 0.50 µg) lipid miktarı azalmıştır (4.43, 4.15 mg). Sulfoxaflor' un denenen en yüksek konsantrasyonda (1.00 µg) lipid miktarının (5.45 mg) kontrole göre düştüğü fakat 0.25 ve 0.50 µg' a göre arttığı görülmüştür (Tablo 4.3 ve Şekil 4.10).

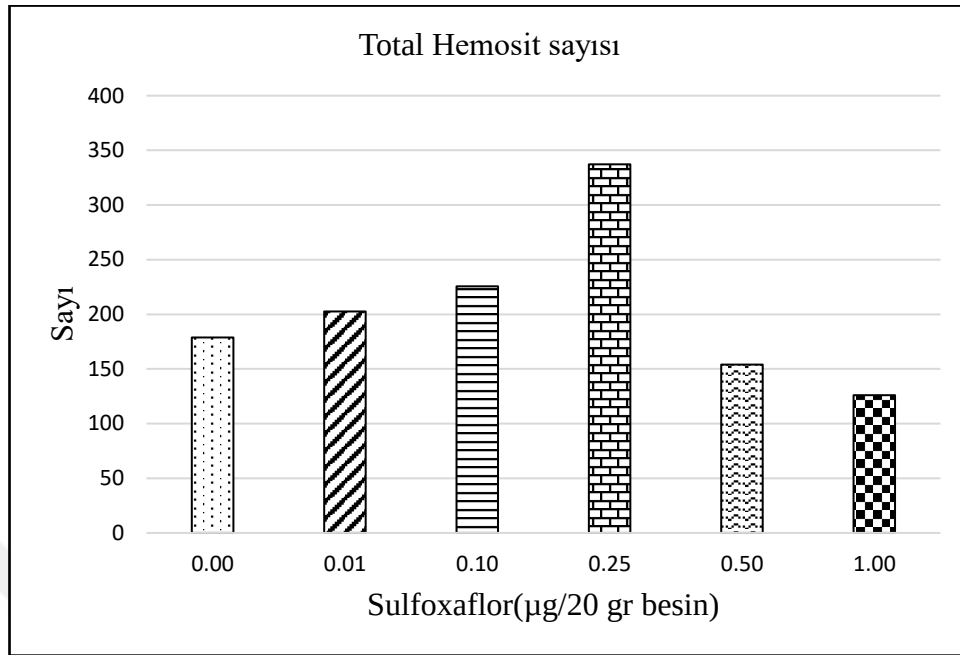
Tablo 4.4 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının hemosit sayısı ve mikronükleus oluşumuna etkisi

Sulfoxaflor (µg/20 gr Besin)	Total Hemosit sayısı (ORT±SH)*	Mikronükleus oluşumu (ORT±SH)*
0.00**	178.80±7.33 c	0.2000±0.2000 a
0.01	202.60±4.38 d	0.2000±0.2000 a
0.10	225.60±4.37 e	1.0000±0.0000 ab
0.25	337.20±6.94 f	1.8000±0.37417 ab
0.50	154.00±3.96 b	3.2000±0.4899 c
1.00	126.00±3.44 a	3.8000±0.3741 c

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

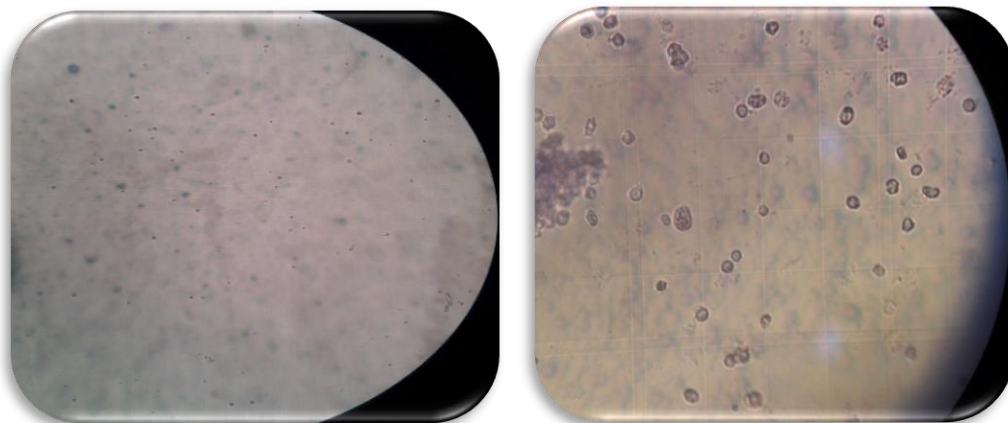
(ORT±SH)* Aritmetik ortalama ± Standart hata

** : Kontrol

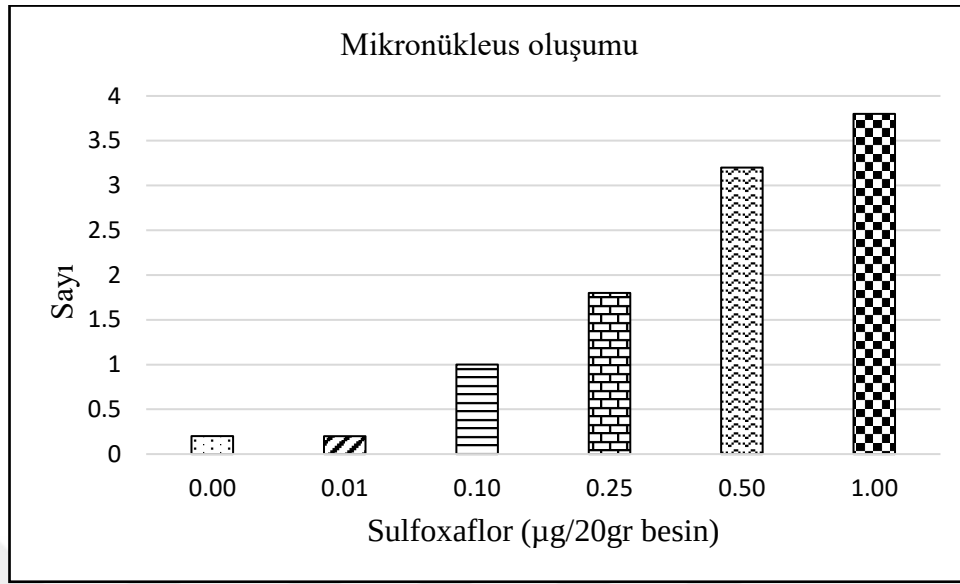


Şekil 4.11 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının hemosit sayısı üzerine etkisi

Sulfoxaflorun değişen konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemositlerin toplam sayısına etkileri Tablo 4.4 ve Şekil 4.11' de gösterilmiştir. Toplam hemosit sayısı denenen düşük konsantrasyonlarda (0.01, 0.10, 0.25 µg) kontrol ile karşılaştırıldığında artmıştır fakat yüksek konsantrasyonlarda (0.50, 1.00 µg) kontrole göre önemli ölçüde azalma görülmüştür ($p < 0.05$).

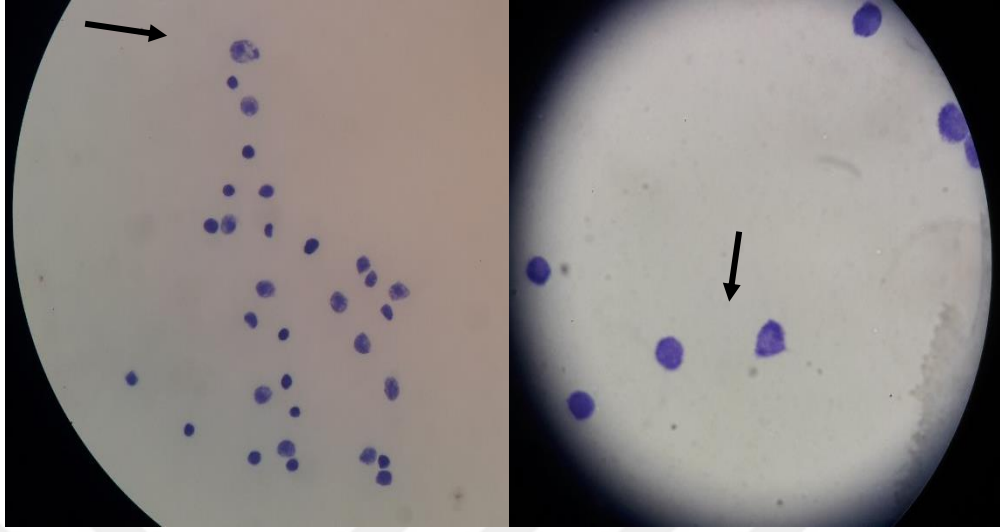


Resim 4.1 Hemositlerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü



Şekil 4.12 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

Farklı Sulfoxaflor konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hücrelerinde mikronükleus oluşumuna etkileri Tablo 4.4 ve Şekil 4.12 de gösterilmiştir. Besinin en düşük konsantrasyon olan 0.01 µg Sulfoxaflor içerdiği durumda kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Benzer şekilde, kontrole karşılaştırıldığında 0.10 ve 0.25 µg konsantrasyonlarını içeren besinle beslenen böcekler göre mikronükleus sayılarında artışın olduğu görülse de istatistiki bir fark görülmemiştir. Yüksek konsantrasyonlar olan 0.50 ve 1.00 µg içeren besinle beslenen böceklerde kontrole kıyasla artışın önemli miktarda olduğu görülmüştür ($p<0.05$). *G. mellonella*'nın hemositlerindeki mikronükleus sayıları Şekil 4.12' de verilmiştir.



Resim 4.2 *G. mellonella* larvalarının hemositlerindeki mikronükleuslu hücreler

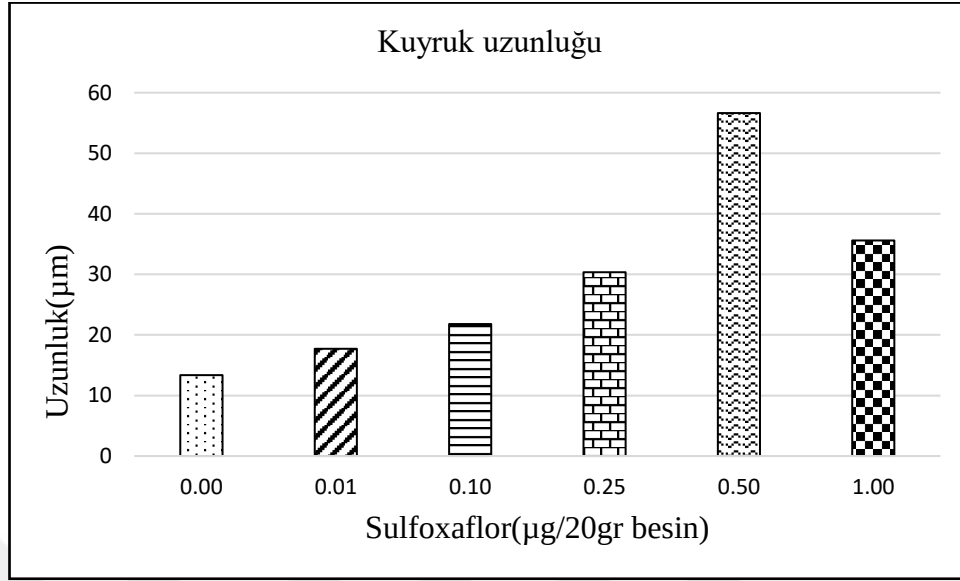
Tablo 4.5 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının DNA'sı üzerine etkisi (comet analizi)

Sulfoxaflor (µg/20 gr Besin)	Kuyruk uzunluğu (ORT±SH)*
0.00**	13.350±0.723 a
0.01	17.708±2.253 ab
0.10	21.794±0.659 ab
0.25	30.350±2.968 ab
0.50	56.634±11.895 c
1.00	35.594±1.453 b

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

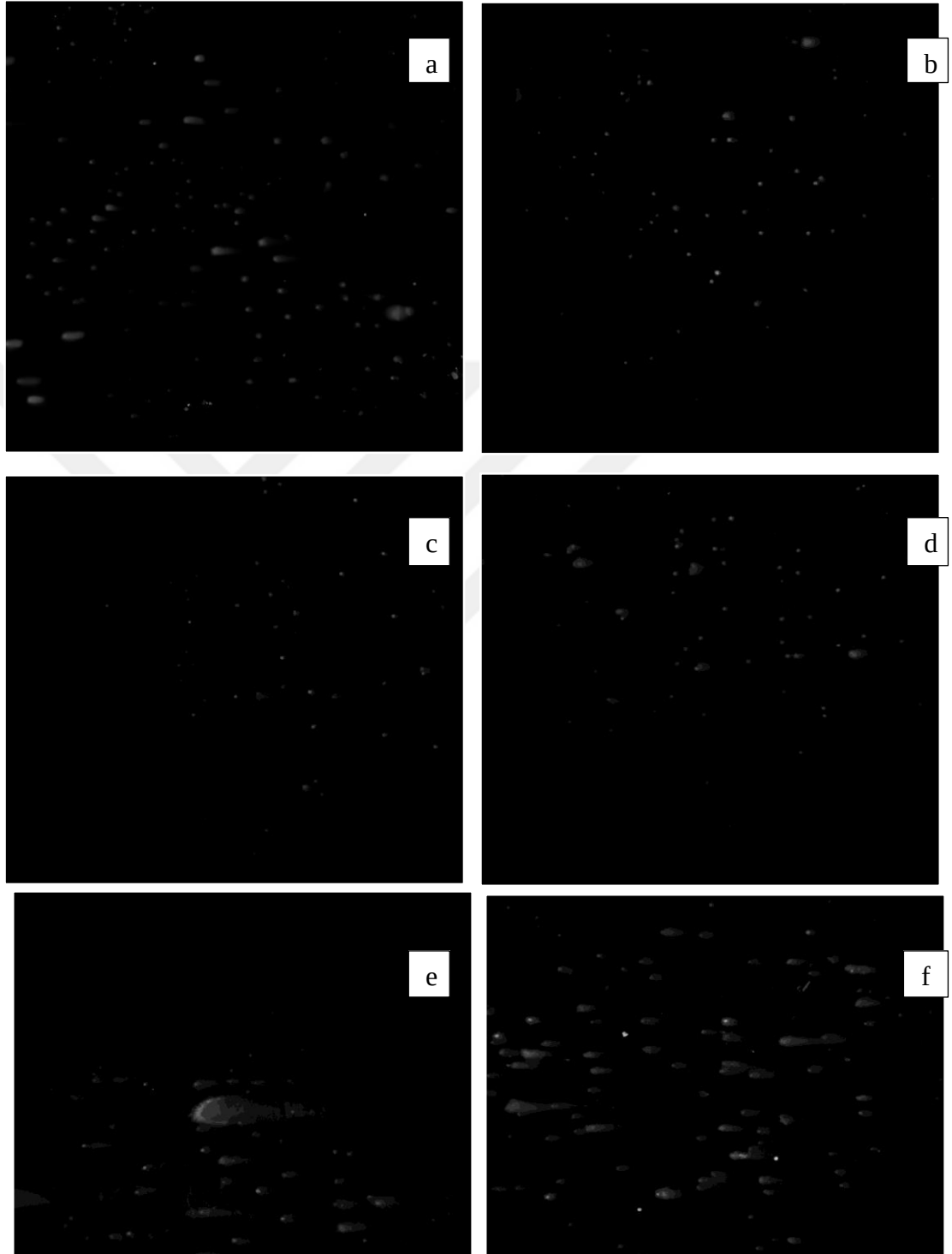
(ORT±SH)* Aritmetik ortalama ± Standart hata

** : Kontrol



Şekil 4.13 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının genotoksik hasarı üzerine etkisi

Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvaları üzerinde 0.50 ve 1.00 µg'da istatistiksel olarak artış olduğu, diğer konsantrasyonlarda ise bu artışın önemli olmadığı görülmüştür. Comet analizi sonucu gözlenen kuyruk uzunluğunun arttığı ve dolayısıyla DNA hasarının arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.14 Sulfoxaflor'un *G.mellonella* larvalarındaki comet görüntüsü: a kontrol, b 0.01, c 0.10, d 0.25, e 0.50, f 1.00 µg

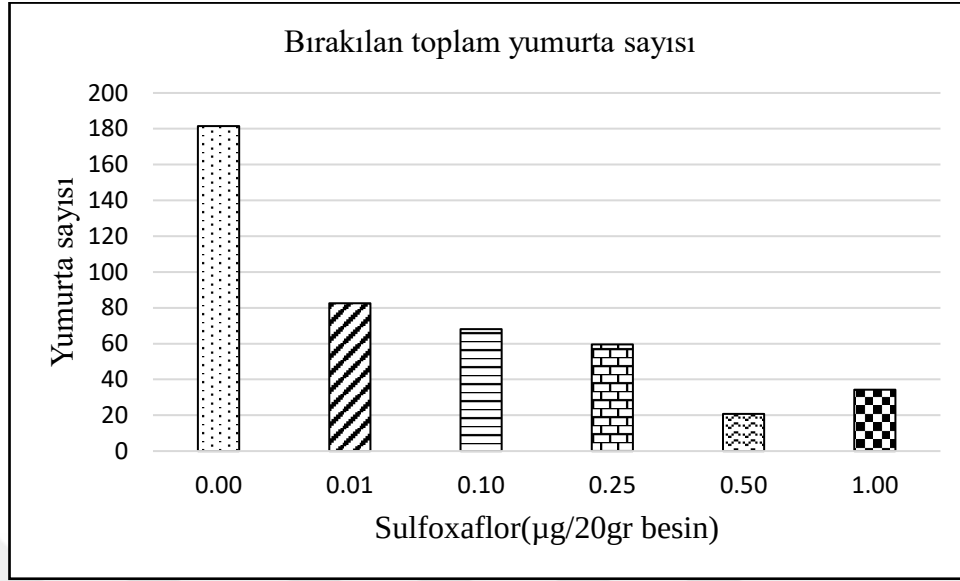
Tablo 4.6 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* ergin dişilerinin bıraktıkları toplam yumurta sayısı, açılan yumurta sayısı, açılan yumurtaların yüzdesi üzerine etkisi

Sulfoxaflor (µg/20 gr Besin)	Bırakılan toplam yumurta sayısı (ORT±SH)*	Açılan yumurta sayısı (ORT±SH)*	Açılan yumurtaların yüzdesi (ORT±SH)*
0.00**	181.56±6.59 a	132.25±6.82 a	72.71±1.61 a
0.01	82.56±1.19 b	52.48±0.46 b	63.58±0.41b
0.10	68.11±1.27 c	46.96±0.93 b	68.94±0.18 c
0.25	59.57±2.26 c	36.63±1.70 c	61.41±0.56 c
0.50	20.77±0.16 e	11.93±0.26 d	57.42±0.98 d
1.00	34.29±29±1.54 d	20.05±1.28 d	58.30±1.46 d

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

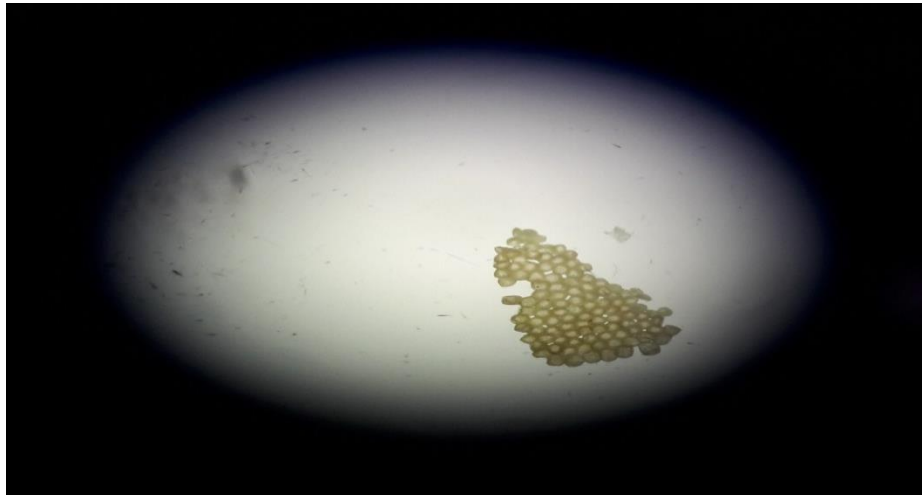
(ORT±SH)* Aritmetik ortalama ± Standart hata

** : Kontrol

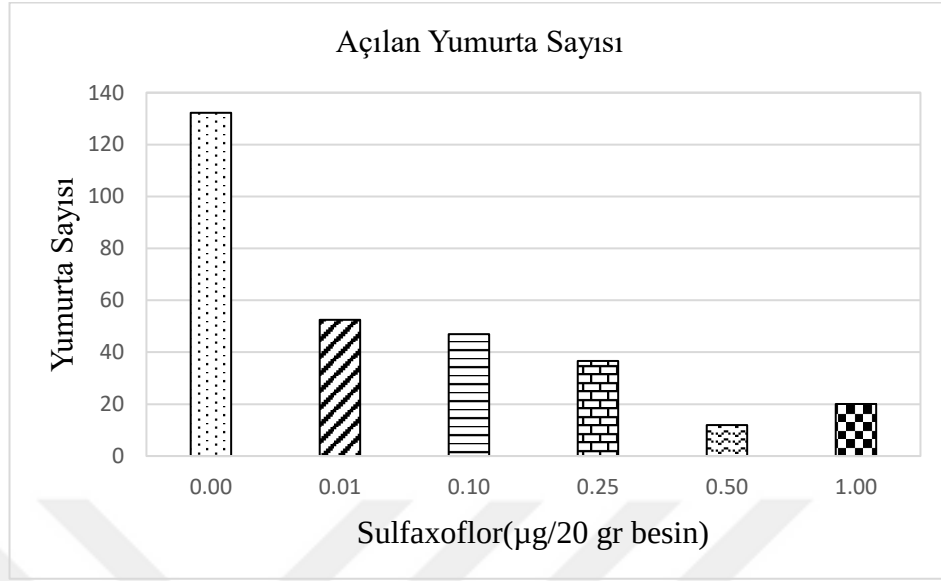


Şekil 4.15 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının erginleşen bireylerinden bıraktıkları toplam yumurta sayısı etkisi

Bırakılan toplam yumurta sayısı tüm konsantrasyonlarda kontrole göre azalırken, konsantrasyon kendi aralarında karşılaştırıldığında 0.10 ve 0.25 µg konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir. Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının erginleşen bireylerinden bırakılan toplam yumurta sayısı Tablo 4.6 ve şekil 4.15'de verilmiştir.

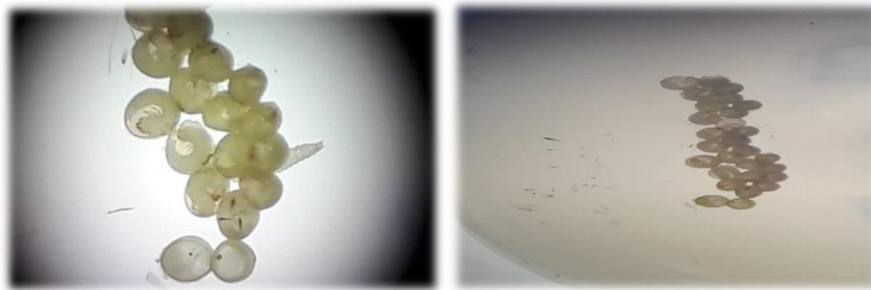


Resim 4.3 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* ergin dişilerinin bıraktıkları toplam yumurta sayısına ilişkin ışık mikroskobu görüntüsü

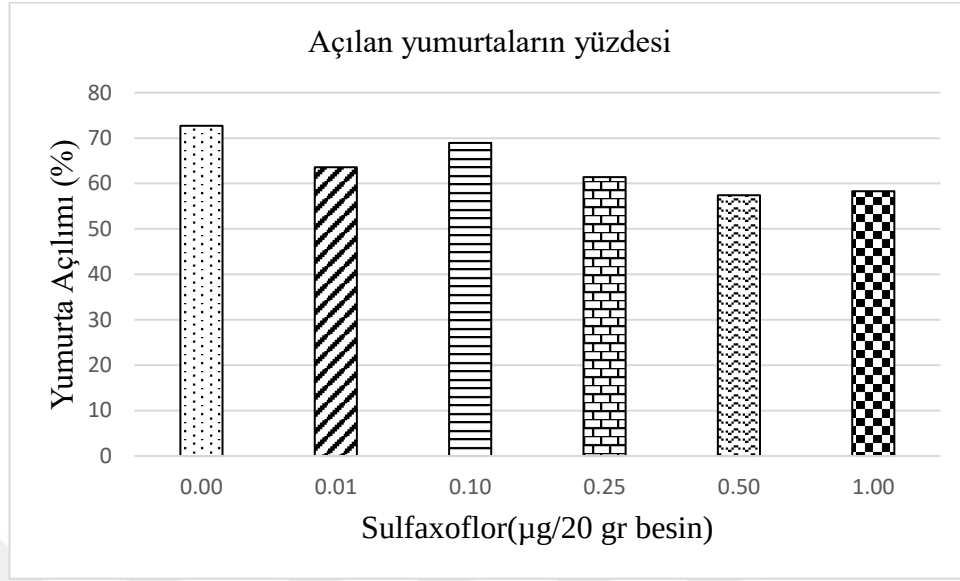


Şekil 4.16 Sulfoxafloor'un *G. mellonella* ergin dişilerinin açılan yumurtaların sayısına etkisi

Sulfoxafloor'un denenen tüm konsantrasyonlarında kontrole göre açılan yumurta sayısında önemli bir azalma olduğu görülmüştür. Düşük konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı bir fark görülmezken yüksek konsantrasyonlarda azalmanın devam ettiği ve besinine 0.50 µg sulfoxafloor eklenen böceklerin açılan yumurta sayısında önemli bir düşüş olduğu istatistiksel bir anlam ortaya çıkmıştır ($p < 0.05$). 1.00 µg'lık besin ile 0.50 µg karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülse de aralarında anlam farkı yoktur. Açılan yumurtaların mikroskopik görüntüsü resim 4.4 de, Sulfoxafloor'un *G. mellonella* larvalarının erginleşen bireylerinden açılan yumurtaların sayısına etkisi ise tablo 4.6 ve şekil 4.16'de verilmiştir.



Resim 4.4 *G. mellonella*'nın Sulfoxafloor etkisinde açılan yumurtalarının mikroskopik görüntüsü



Şekil 4.17 Sulfoxaflores'un *G. mellonella* ergin dişilerinin açılan yumurtaların yüzdesine etkisi

Sulfoxaflores'un *G. mellonella* ergin dişilerinin açılan yumurtaların yüzdesi hesaplanırken denenen tüm konsantrasyonlarda açılan yumurtaların yüzdesinin düştüğü görülmüştür. İstatistiksel analiz sonucunda, yumurtaların açılım yüzdesi bakımından gruplar arasında fark olduğu görülmüştür.

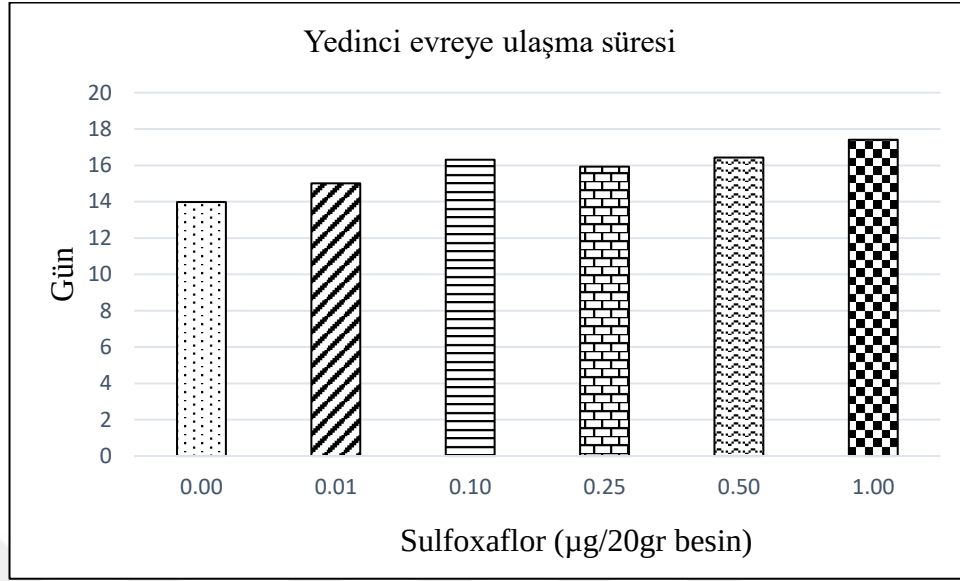
Tablo 4.7 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının Son larval evreye ulaşma süresi, pup olma süresi, ergin olma süresi, Son larval evreye ulaşma oranı, pup olma oranı, erginleşme oranı üzerine etkisi

Sulfoxaflor (µg/20 gr Besin)	Son larval evreye ulaşma süresi (gün) (ORT±SH)*	Pup olma süresi (gün) (ORT±SH)*	Ergin olma süresi(gün) (ORT±SH)*	Son larval evreye ulaşma oranı(%) (ORT±SH)*	Pup olma oranı(%) (ORT±SH)*	Erginleşme olma oranı (%) (ORT±SH)*
0.00**	13.98±0.19 a	6.33±0.33 a	5.75±0.12 a	93.33±1.66 a	96.66±1.66 a	98.33±1.66 a
0.01	15.01±0.41 b	7.35±0.15 ab	6.90±0.38 b	81.66±1.66 b	96.66±1.66 a	91.66±1.66 a
0.10	16.31±0.14 c	9.00±0.40 b	6.20±0.10 ab	80.00±0.00 b	95.00±0.00 a	90.00±0.00 a
0.25	15.93±0.20 c	8.61±0.24 b	6.10±0.35 ab	78.33±4.40 b	96.66±1.66 a	90.00±0.00 a
0.50	16.43±0.15 c	8.13±0.64 b	6.28±0.60 ab	83.33±3.33 b	76.66±1.66 c	91.66±1.66 a
1.00	17.41±0.23 d	8.80±0.62 b	6.21±0.13 ab	83.33±1.66 b	88.33±1.66 b	91.66±3.33 a

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

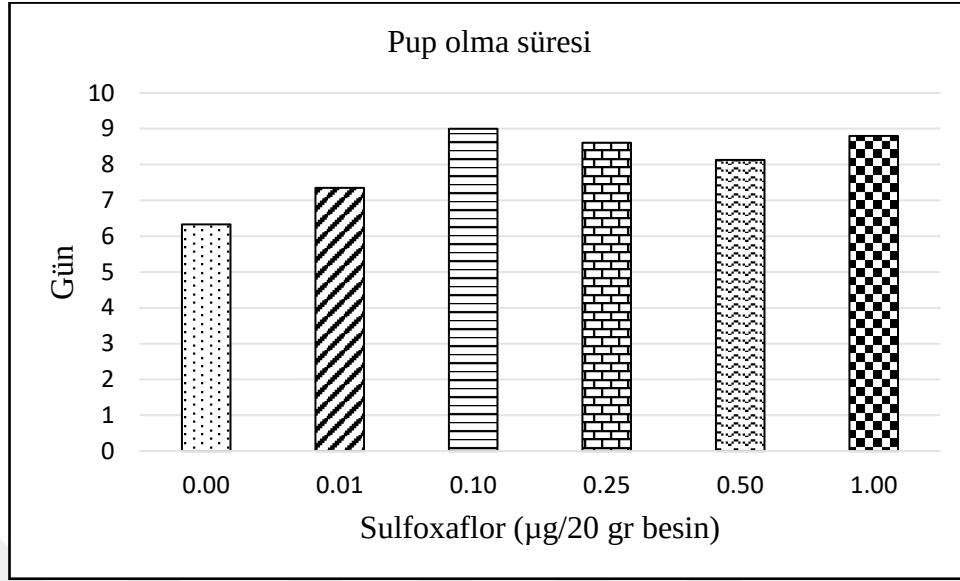
(ORT±SH)* Aritmetik ortalama ± Standart hata

** : Kontrol



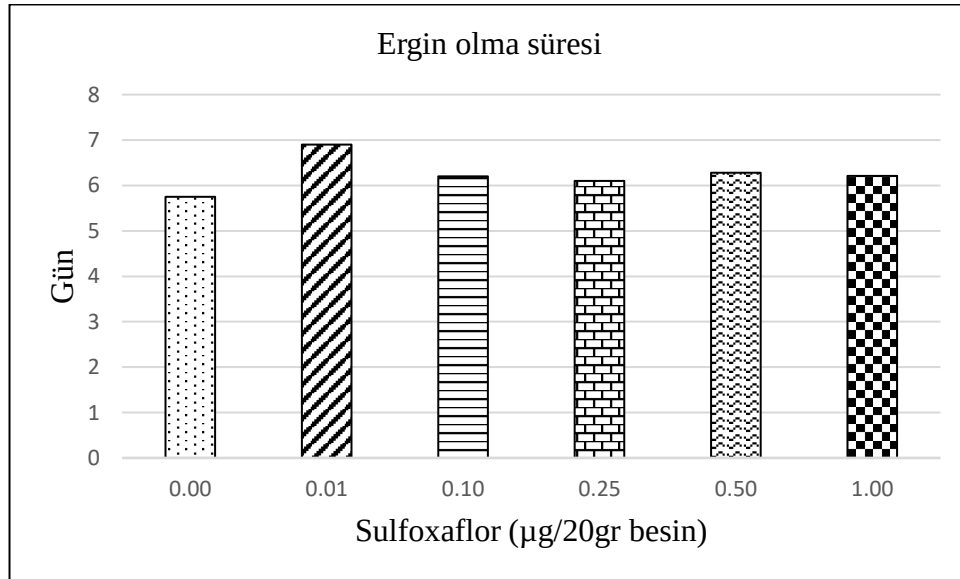
Şekil 4.18 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının Son larval evreye ulaşma süresine etkisi

Son larval evreye ulaşan bireylerin gelişim sürelerine bakıldığında gruplar arasında (sadece 0.10, 0.25 ve 0.50 µg arasında anlamlı fark yoktur) farkın anlamlı olduğu ve sulfoxaflor uygulamasına bağlı olarak, larval gelişim süresinin, kontrol grubuna kıyasla uzadığı görülmüştür. Kontrol grubunda Son larval evreye ulaşma süresi 13.98 ± 0.19 gün iken en yüksek konsantrasyondaki bireylerin 17.41 ± 0.23 gün olarak hesaplanmıştır. Buradan yola çıkarak larval gelişim süresinin ortalama 4 gün uzadığı ortaya çıkmıştır. İkinci evre larvaların son evreye kadar olan gelişim süreleri Tablo 4.7 ve şekil 4.18'de verilmiştir.



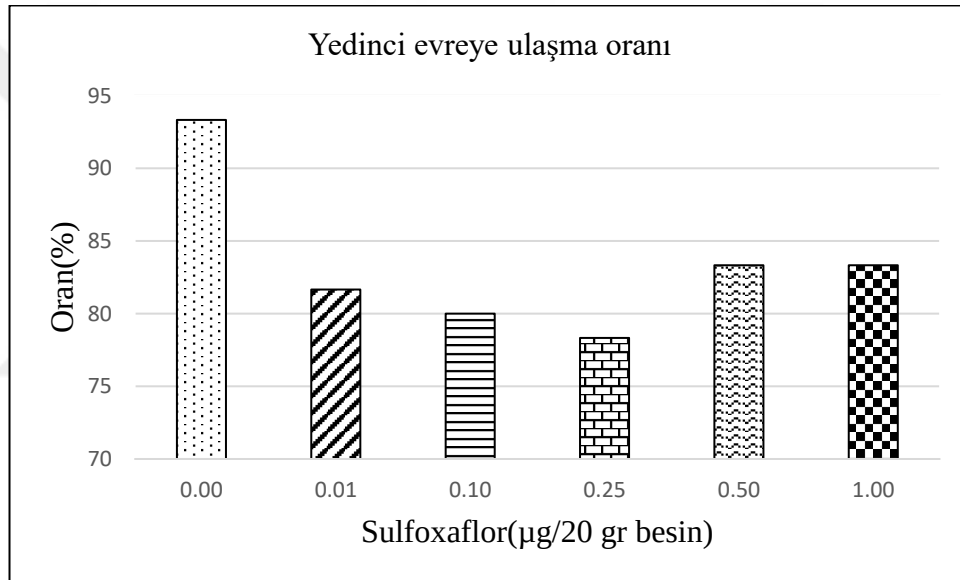
Şekil 4.19 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının pup olma süresine etkisi

Her bir grup için, her bir larvanın son dönem larval evreden pup evreye geçtiği süreler belirlendi. İlgili veriler Tablo 4.7 ve şekil 4.19'de verilmiştir. Sulfoxaflor eklenen besin ile beslenen *G. mellonella* larvalarından elde edilen pupal gelişim sürelerine bakıldığında gruplar arasında farkın anlamlı olmadığı fakat kontrol ile karşılaştırıldığında pup olma süresinin uzadığı görülmüştür.



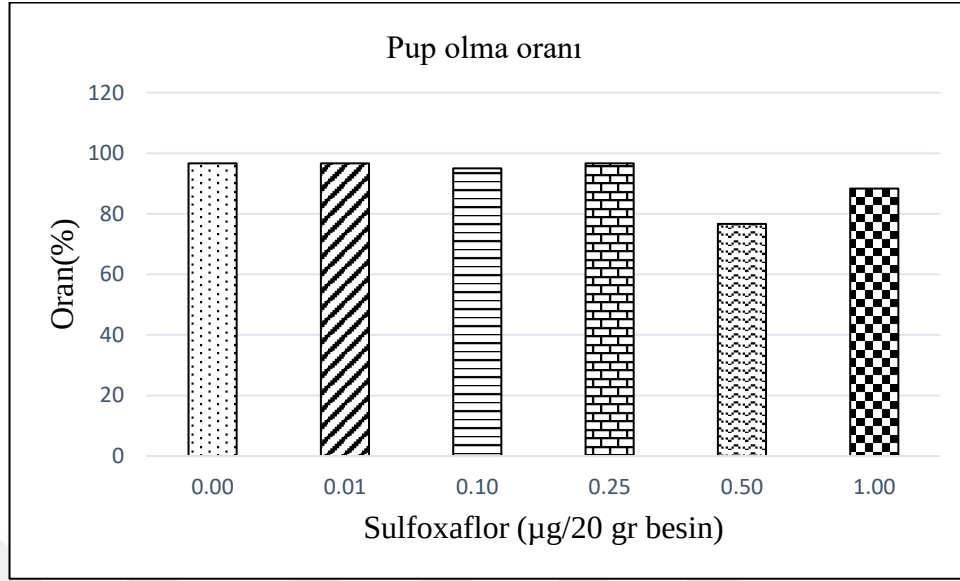
Şekil 4.20 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının ergin olma süresine etkisi

Kontrol grubunda ve farklı dozlarda sulfoxaflor ile beslenen deney gruplarına ait larvaların, pup olduğu andan, ergin olana kadar geçen süreler (gün) olarak gösterilmiştir. Tablo 4.7 ve şekil 4.20 ergin olma sürelerini göstermektedir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda; gruplar arasında farkın anlamlı olmadığı anlaşılmıştır. Kontrol ile 0.01 µg karşılaştırıldığında ergin olma süresinin uzadığı istatistiksel anlamda fark olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Kontrol ile diğer gruplar arasında önemli bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda, daha önce de belirtildiği üzere larval gelişim süresi ve pup olma süresinin uzadığı ve bu duruma paralel olarak, en düşük dozda *G. mellonella*'nın ergin olma süresinin de uzun olduğu görülmüştür.



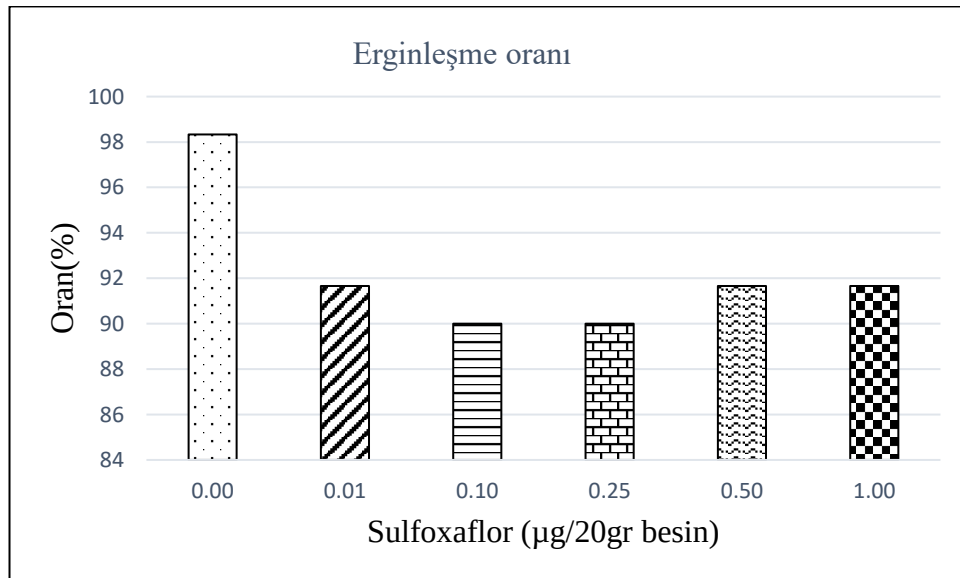
Şekil 4.21 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının Son larval evreye ulaşma oranına etkisi

Sulfoxaflor'un denenen tüm konsantrasyonları kontrol grubuyla ile karşılaştırıldığında *G. mellonella* larvalarının Son larval evreye ulaşma oranında azalma olduğu fakat konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında bir fark olmadığı görülmüştür. Tablo 4.7 ile şekil 4.21'da *G. mellonella* larvalarının son larval evreye ulaşma oranları verilmiştir.



Şekil 4.22 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının pup olma oranına etkisi

Sulfoxaflor'un eklendiği besin ile beslenen *G. mellonella* larvalarının pup olma oranlarına bakıldığında kontrol ile 0.01, 0.10, 0.25 µg konsantrasyonları ile arasında bir fark olmadığı görülmüştür. 0.50 ve 1.00 µg arasında ve aynı zamanda kontrolle de aralarında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Pupa olma oranının 0.50 µg da içeren besinde en düşük seviyede olduğu görülmüştür. *G. mellonella* larvalarının pup olma oranları Tablo 4.7 ile şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.23 Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının erginleşme oranına etkisi

Sulfoxaflor'un denenen tüm konsantrasyonlarında *G. mellonella* larvalarının erginleşme oranına etkisi olmadığı ortaya çıkmıştır. Kontrol ile konsantrasyonlar arasında bir fark olmadığı ve aynı zamanda konsantrasyonlarında kendi aralarında bir fark olmadığı görülmüştür. Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvalarının erginleşme oranına etkisi ile ilgili veriler Tablo 4.7 ve şekil 4.23 de verilmiştir.



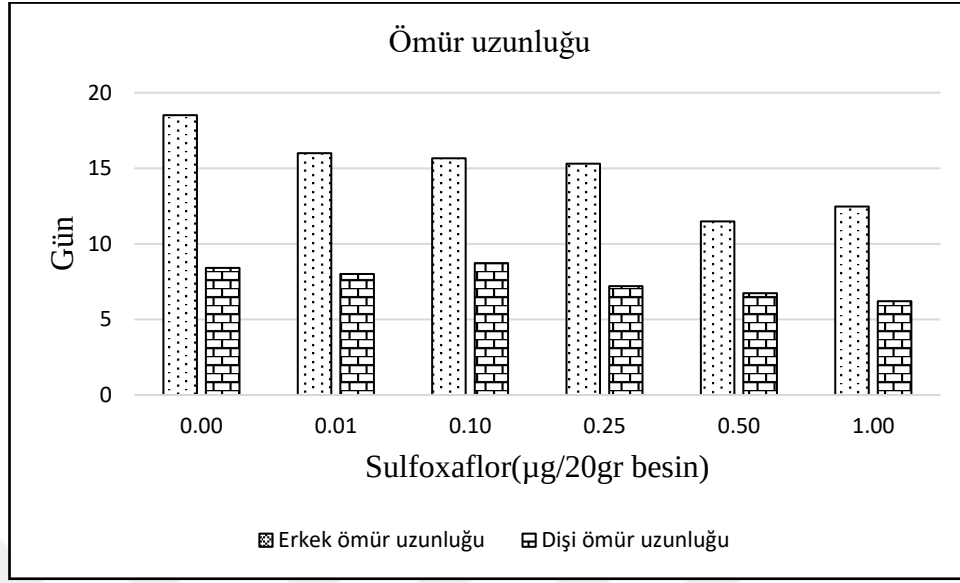
Tablo 4.8 Sulfoxaflor'un *G. mellonella*'nın erkek ve dişi bireylerinin ömür uzunluğuna etkisi

Sulfoxaflor ($\mu\text{g}/20 \text{ gr Besin}$)	Erkek ömür uzunluğu(gün) (ORT $\pm$ SH)*	Dişi ömür uzunluğu(gün) (ORT $\pm$ SH)*
0.00**	18.513 $\pm$ 0.721 a	8.402 $\pm$ 0.674 a
0.01	15.999 $\pm$ 0.300 b	8.004 $\pm$ 0.299 ab
0.10	15.661 $\pm$ 0.388 b	8.722 $\pm$ 0.535 a
0.25	15.304 $\pm$ 0.536 b	7.192 $\pm$ 0.321 abc
0.50	11.486 $\pm$ 0.593 c	6.740 $\pm$ 0.229 bc
1.00	12.469 $\pm$ 0.600 c	6.208 $\pm$ 0.237 c

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

(ORT $\pm$ SH)* Aritmetik ortalama $\pm$ Standart hata

** : Kontrol



Şekil 4.24 Sulfoxaflor'un *G. mellonella*'nın erkek ve dişi bireylerinin ömür uzunluğuna etkisi

Larva döneminde farklı Sulfoxaflor dozlarıyla beslenen *G.mellonella*'nın dişi ve erkek bireylerin ömür uzunluklarına etkisine bakıldığında erkek bireylerin kontrol grubuna kıyasla bütün konsantrasyonlarda ömür uzunluğunun azaldığı ancak 0.01, 0.10, 0.25 µg da grupların kendi arasında istatistiki fark olmadığı belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda düşüş artmıştır. Dişi bireylerin ömür uzunluğuna bakıldığında bütün konsantrasyonlarda ömür uzunluğu azalmış görünse de yüksek konsantrasyonlarda düşüş artmıştır. 0.01, 0.10, 0.25 µg dozlarda istatistik olarak kontrol ile aynı grup içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. Erkek ve dişi bireyler karşılaştırıldığında erkek bireylerin daha fazla yaşadığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Sunulan çalışmada sülfokamin grubu bir insektisit olan Sulfoxaflorun farklı konsantrasyonlarının (0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 µg/20 gr besin) potansiyel olumsuz etkilerinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması için hem *G. mellonella* larvalarının büyüme ve gelişimi hem de oksidatif stres ile ilgili parametreleri ölçülmüştür.

Insektisitler, tüm tarımsal ekosistemlerde modern tarım ve üretim süreçlerinin ayrılmaz bir bileşenidir. Bu sebeple dünya çapında bir veya daha fazla insektisit uygulanması zorunlu hale gelmiştir. Tarımda kullanılan insektisitlere karşı, zararlı böcekler direnç geliştirmişlerdir. Mevcut insektisitlere karşı direnç devam etmekte olan bir sorundur. Oluşan direnç nedeniyle, bitkisel kökenli, özgün ve yeni nesil insektisitlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu çalışma da kullanılan Sulfoxaflor ([N- [metiloksido [1- [6- (triflorometil) -3-piridinil] etil] -k4-sülfaniliden] siyanamid], yeni bir insektisit sınıfı olan sülfoksiminler grubunu temsil etmektedir. Sulfoxaflor, böceklerde asetilkolin yerine nikotinik asetilkolin reseptörlerinin (nAChR'ler) agonisti gibi davranır ve nAChR'lere etki eden diğer insektisitlerden farklı bir yere bağlanarak işlev görmektedir [70].

Biyolojik sistemlerde süperoksit anyon radikalleri, hidroksil radikalleri ve H₂O₂ gibi reaktif oksijen türleri, hücrelerdeki normal oksidatif işlemler sırasında oluşmakta ve fazla miktarda olduklarında oksidatif strese neden olmaktadır. Hem reaktif oksijen türlerinin artan üretimi hem de organizmanın antioksidan bariyerinin zayıflaması oksidatif stresi indükler. Başka bir deyişle, oksidatif stres, serbest radikallerin artışı ve onları ortadan kaldıran antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanabilir [71]. Radikaller oksidatif stres ile oluşan genotoksik etkiye, MDA oluşumuna dolayısıyla lipid peroksidasyonuna ve enzim inhibisyonlarına sebep olarak canlı yaşamını oldukça olumsuz etkilemektedir [72]. Lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi tüm biyomoleküller serbest radikaller tarafından saldırılara uğrayabilir, ancak aralarında lipidler bu duruma çok daha duyarlıdır. Özellikle, lipid peroksidasyonu önemli bir mekanizma olarak kabul edilir çünkü oksidatiflerin doku hasarına neden olabileceği bununla birlikte bozulmuş hücre fonksiyonu ve hücre zarlarının fizikokimyasal

özelliklerindeki değişiklikler hayati fonksiyonları bozmaktadır [19]. ROT tarafından oluşan hasara karşı koymak için organizmalarda çeşitli mekanizmalar vardır [71]. Birincil savunma, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar tarafından sunulmaktadır. Enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların ROT'ları ve serbest radikalleri temizlediği gösterilmiştir [73].

SOD ve CAT antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını oluşturan önemli antioksidan enzimler olarak bilinmektedirler [72]. SOD, süperoksitin H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümü katalize etmektedir. CAT ise H_2O_2 molekülünü suya ve oksijene dönüştürür [16]. Sunulan çalışmada Sulfoxaflorun sadece yüksek konsantrasyonlarında (0.50 ve 1.00 μ g) CAT aktivitesi kontrole ve diğer konsantrasyonlara göre önemli bir artış göstermiştir. *G. mellonella* larvalarının SOD aktivitesi bütün konsantrasyonlar da (0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 μ g/20 gr besin) kontrole göre artış göstermiştir. 1.00 μ g 'da SOD aktivitesinin diğer konsantrasyonlara kıyasla arttığı gözlenmiştir. SOD enzim aktivitesindeki artışın sebebi Sulfoxaflorun etkisiyle süperoksit radikalinin artmasına karşı bir savunma yanıtı olduğunu düşündürmektedir. Bu yanıtın hem süperoksitin doğrudan hem de reaksiyonlar sonucunda hidroksil radikale dönüşümüne bağlı olarak hücrede oluşturacağı zararlı etkilerine karşı hücresel yapı ve bileşenlerin korumasında önemli olabileceği öngörülmektedir Çalışmamızda özellikle yüksek konsantrasyonlarda SOD ve CAT enzimlerinin aktivitesinin artışı ortamdaki süperoksit radikallerini parçalamak için SOD enzim aktivitesinin artmış olabileceği ve yan ürün olarak oluşan H_2O_2 'i CAT'ın daha zayıf ürünlere dönüştürerek etkisiz kıldığı düşünülmektedir. CAT, H_2O_2 'i hızla suya ve oksijene dönüştürür. CAT, yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 leri etkisiz hale getirmekte başarılıdır. Düşük konsantrasyonlarda CAT ın değişmemiş olmasını ortamda az miktarda bulunan H_2O_2 leri yok etmek için askorbat peroksidazların görev aldığını ya da enzimin yüksek bir K_m değerine sahip olmasından dolayı bu radikalın uzaklaştırılmasında yetersiz kalmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum çalışmamızda denenmiş tüm Sulfoxaflor konsantrasyonlarında APX aktivitesinin kontrole göre arttığı gösterilmiştir. Konsantrasyonlar kendi arasında karşılaştırıldığı ise 1.00 μ g da en düşük APX aktivitesi gözlenmiştir. APX aktivitesinin 1.00 μ g da diğer konsantrasyonlara nazaran azalması APX' in inhibe olmasından

kaynaklandığını düşündürmektedir. H_2O_2 'in yok edilmesinde görevli diğer bir enzim ise APX enzimidir. Ancak APX, CAT tarafından normal olarak temizlenmeyen düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 'yi temizlemektedir [74]. APX H_2O_2 'yi aynı anda askorbat oksidasyonu ile azaltmaktadır yani askorbatı oksitleyerek lipid peroksitleri azaltmak için güçlü bir antioksidan görevi görmesi ve ROT tarafından doku hasarının önlenmesindeki rolü keşfedilmiştir. Glutasyon eksikliği olan hayvanlarda glutasyonu koruyup antioksidan havuzunu en üst düzeye çıkardığı bilinmektedir [75]. *Spodoptera littoralis* larvalarında tannik asitin (TA) oluşturduğu oksidatif stres ve antioksidan savunma sisteminin araştırıldığı çalışma ile bulgularımızdan benzer sonuçlar elde edilmiştir. SOD, CAT, APX aktivitelerinde genelde artış olduğu bu durumun yüksek enzimatik faaliyetlerin açıkça oksidatif stres seviyesini azaltmaya yönelik olabileceğini bildirmişlerdir [76]. o-dihidroksifenollerin yaprak biti *Sitobion avenae* ve yulaf yaprak biti *Rhopalosiphum padi* dokuları üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada APX aktivitesinin arttığı ortaya çıkmıştır [23].

Yapılan bir çalışmada kadmiyumun [77], malathionun [78], borik asidin [76] *G. mellonella* larvalarının bazı parametrelerine etkisi araştırılmış SOD aktivitesini artırdığı ve SOD enzim aktivitesinin artması ortamda süperoksit radikallerinin arttığını ve dokularda biriken MDA miktarıyla birlikte oksidatif stresin ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Çalışmamızla benzerlik gösteren bu durum oksidatif strese neden olan süperoksit radikallerini daha az etkili ürünlere dönüştürmek için gerçekleştirdiği belirtilmektedir. DDVP 'in *G. mellonella* larvalarının enzim aktiviteleri üzerine yapılan bir çalışmada ise SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artış görülmüştür. [80]. Başka bir çalışmada organofosforlu insektisit fenthionun değişen konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarında antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyonuna etkisi araştırılmıştır. Fenthion MDA miktarında, CAT enziminin aktivitesinde bir artışa sebep olmuştur. Fenthionun düşük dozları ise SOD aktivitesini artırmıştır. Buradan yola çıkarak fenthionun oksidatif strese neden olduğu CAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde değişimlere neden olduğu belirtilmiştir [81]. Bununla birlikte SOD ve CAT ile ilgili omurgalı canlılar üzerinde yapılan birtakım çalışmalarda mevcuttur. Bu durumu örneklendirmek gerekirse, İçel' de bulunan tarım alanlarında çalışmış ve sürekli pestisitlere maruz kalmış çifçilerden alınan kan örneklerinden elde

edilen eritrositlerde enzimatik antioksidan enzimlerinden SOD ve CAT aktivitelerinin yüksek olduğu görülmüştür [82]. Benzer olarak Alfa-sipermetrinin balıklar üzerindeki etkisine bakıldığında SOD aktivitesinde meydana gelen artışın alfa sipermetrin uygulamasının sebep olduğu süperoksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırmak için olduğu düşünülmektedir. [83]. Çalışmamızın aksine yapılan bir çalışmada ise ikinci nesil bir neonikotinoid olan tiyametoksamın *G. mellonella* larvalarına etkilerinin incelenmesi sonucu yüksek konsantrasyonlarda aşırı ROT birikimi nedeniyle SOD ve CAT aktivitelerinin düştüğünü kaydetmişlerdir. SOD aktivitesinin inhibisyonu sonucu ortamda H₂O₂ azalmış ve CAT etkinliği de doğrudan engellenmiş olabileceğini vurgulamışlardır [84].

GST'ler, omurgasızlarda ve omurgalılarda daha az toksik alt tabakalar üreten bileşiklere indirgenmiş glutasyonu (GSH) konjuge ederek elektrofilik substratların veya ksenobiyotiklerin toksik etkilerini nötralize eden bir grup fonksiyonel detoksifikasyon enzimidir. Ayrıca mikrozomal oksidasyon ile oluşan reaktif metabolitlerin faz II detoksifikasyon sisteminde [74], [85] ve doku hasarını önlenmesinde etkilidir [86]. Sunulan çalışmada denenen Sulfoxafloor konsantrasyonlarının verildiği *G. mellonella* larvalarında GST aktivitesi kontrole göre artmış fakat en yüksek konsantrasyonda gerek kontrole gerekse diğer konsantrasyonlara göre GST aktivitesi önemli ölçüde düşmüştür. Bu durumda GST enzimi aktivitesinin artması sonucu lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın böceğe zarar verecek düzeye ulaşması önlenmiş olur ya da metabolizma ürünlerini detoksifiye etmek için artmış olabileceği düşünülmektedir. Organizmalarda fizyolojik bir tepki olarak, GST'nin hücreleri, peroksit lipidler gibi endojen kaynaklı bileşiklerini detoksifiye ederek koruduğu bilinmektedir. Bu nedenle, GST aktivitesi ve MDA seviyesi arasında yakın bir ilişki olması gerekir. Sulfoxafloorun yüksek konsantrasyonda GST aktivitesini düşürmesi serbest radikallerin aşırı şekilde üretilmesinden ileri geliyor olabilir ve GST aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği söylenebilir. Aynı zamanda GST'nin düşmesini glutatyonun azalmasına da bağlayabiliriz. İnsektisit, CDNB'ye karşı GST aktivitesinin rekabetçi bir inhibitörü gibi davranıp enzimin aktif bölgesine bağlanmış olabilir. Büyükgüzel ve Kayaoğlu tarafından Niklozamidin *G. mellonella* larvalarına etkisinin araştırıldığı çalışmada

%0,10'luk niklozamid konsantrasyonunda MDA miktarı 4 katına, GST aktivitesi ise 2 katına çıktığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu durum ise insektisite maruz kalınmasına bağlı olarak oluşan toksik etkiyi ortadan kaldırmak için birçok böcekte GST aktivitesini arttırdığını ortaya çıkarmıştır [32]. *G. mellonella* larvaları üzerinde entomopatojenik bir mantar olan *Purpureocillium lilacinum*'un toksikolojik etkileri araştırılmıştır. Fungal etkilerine bağlı olarak enfeksiyon geliştiği ve bunun sonucunda oluşan oksidatif strese bağlı GST enzim aktivitesinin belirlenen süre içerisinde artış gösterdiğine dikkat çekmişlerdir [85] *T. absoluta*'nın iki popülasyonunun indoxacarb, spinosad, azadirachtin, chlorantraniliprol ve metaflumizon'a karşı oluşan dirence bağlı olarak [87] ve *Tenebrio molitor*'un piretroid insektisitine karşı [86] detoksifikasyon mekanizması gösterdiği ve yeni bir neonikotinoid insektisit olan Guadipyr'in *Daphnia magna* 'da GST enzim aktivitesi arttırdığı belirlenmiştir [88]. Burdan yola çıkarak bu sonuçların çalışmamızla benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Sulfoxaflorun denenen tüm konsantrasyonlarında *G. mellonella* larvalarının hemolenflerinde PO enzimi aktivitesinin kontrole göre düştüğü ortaya çıkmıştır. Konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiki fark görülmemiştir. Böceklerde savunma mekanizması hücresel ve humoral bağışıklık olarak kendini göstermektedir. Omurgasızlarda olduğu gibi böceklerde de doğal olarak bulunan bu önemli savunma sistemi humoral immün tepkisi olan PO enzimi patojenlerin ve hasarlı dokuların melanizasyonundan sorumludur [22]. Çalışmamızı destekleyen ve *Hypericum perforatum* ekstratının ve % 0.10, % 0.25, % 0.50 , % 1.00 oranında *Olive europaea* yaprağı ekstraktı % 40 DMSO çözeltisinde çözülerek [89] *G. mellonella* larvalarına verilmesiyle PO enzimi aktivitesine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda hemolenfte PO enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmış sonuçlara göre PO aktivitesinin zamanla azaldığı görülmüştür. Hemolenfte hidroksibenzen oksidaz formundaki lenf serin proteaz ve hidrolizin spesifik kademeli reaksiyonunun ile aktive olmaktadır fakat enzimin inhibe olmasıyla reaksiyon gerçekleşmediği düşünülmektedir [90]. Farklı İndol-3-Asetik asitin konsantrasyonlarının *G. mellonella* son evre larvalarına uygulanması sonucu bireylerden elde edilen hemolenfte PO aktivitesinin kontrole göre azaldığı belirlendi ve bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [91]. Bprofezin ve pyriproksifen maddelerinin, *Spodoptera littoralis*

üzerinde PO enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiştir [92]. Bir insektisit olan Terpinen-4-ol maddesinin de *Mythimna separata* 'nın 5. larval evresinde PO' ı inhibe ettiği görülmüştür. Melanin pigmentinin anahtar enzimi olan PO, serin proteazın spesifik kademeli reaksiyonu ve hidrolizi ile reaksiyon zincirinin geliştiği belirtilmiştir [93]. Tüm bu çalışmalarda PO enzimi aktivitesinin azaldığı veya inhibe edildiği dolayısıyla da immün sistemin etkilendiği ve baskılandığı sonucu bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerle de uyum içindedir. Aynı zamanda PO'ın yeni pestisit çalışmalarının hedeflerinden biri haline geldiği düşünülmektedir.

İnsektisit etkisinde meydana gelen lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA hücre zarında hasar oluştuğunu gösteren önemli bir belirteçtir. [72]. Oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan MDA miktarı, Sulfoxaflorun tüm konsantrasyonların da kontrole kıyasla artmıştır. Bu çalışmada MDA düzeyinin artması, dokularda ROT oluşumunun bir göstergesidir. ROT' u ortadan kaldırmak için SOD ve CAT'ın yetersiz kalması MDA 'nın yükselmiş olmasından kaynaklandığı düşündürmektedir. Bu araştırmanın bulgularına benzer olarak klorpirifosa maruz kalan *Triticum aestivum*'da [94], Borik asit [79] ve Kadmiyuma maruz kalan *Galleria mellonella* larvalarında [77] Methidathionun etkisinde *Lymantria dispar* larvalarının ortabağırsak dokularında [58] insektisit uygulamasının ROT birikimini teşvik etmesi sonucu lipid peroksidasyonu meydana getirmesi ve antioksidan dengeyi bozması ile ilişkilendirmiştir [94]. Sonuçlarımızla benzerlik gösteren ve omurgalı canlılar üzerine yapılan çalışmalarda, Diazinonun sıçan kalp dokusundaki malondialdehit düzeylerinin diazinon ile muamele edilmiş gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Artan serbest radikallerin doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonunun varlığı artan MDA ile kanıtlanmıştır [94]. Thiamethoxam'un *O. niloticus*'da oksidatif stres oluşturduğu ve oluşan MDA'nın bağırsak dokularında hasar oluşturduğu ortaya çıkarılmıştır [72]. Sonuçlarının çalışmamızla paralellik göstermesi önemli bir bulgudur.

Canlılar normal yaşamını sürdürebilmesi için organik ve inorganik moleküllere ihtiyaç duymaktadırlar. Düzenleyici olarak birçok fonksiyonu bulunan protein, hücre zarının yapısal bütünlüğüne katkıda bulunan, yağ doku ve gerektiğinde

enerji olarak kullanılabilen lipid ve gerek direkt gerekse depo edilerek canlıların enerji ihtiyacında kullanılan karbonhidratlar canlılar için en önemli organik makro moleküllerdir. Diğer canlı grupları gibi; böcekler de büyüme, gelişme ve üreme faaliyetlerini devam ettirebilmek için protein, karbonhidrat ve lipid gibi temel besin maddelerine ihtiyaç duymaktadırlar [29]. Lipidler böceklerin metabolizmasında önemli bir rol oynarken besin ve enerji rezervleri deposu olarak bilinmektedir. Gerek açlık ve metamorfoz dönemlerinde hayatta kalmak için gerekse yumurta üretimi ve eşeyssel olgunluğa ulaşmak için birçok böcek türünün lipidlere ihtiyaç duyduğu bilinmektedir [95]. Böcekler gereksinim duydukları bu besin bileşenlerini, besinlerinden doğrudan alabildikleri gibi vücutta depo edilmiş protein ve karbonhidrat kaynaklarını kullanarak da sentezleyebilirler [28]. Sulfoxaflor'un farklı konsantrasyonlarının verildiği *G. mellonella* larvalarında lipid miktarının etkilendiği ve kontrole göre azaldığı görülmüştür. Aynı durum protein ve karbonhidrat için de söz konusu olduğu görülmüştür. Sulfoxaflor bütün konsantrasyonlarında protein ve karbonhidrat miktarı önemli ölçüde kontrole göre azalmıştır. Protein ve lipid içeriğinin azalması, hücre ve doku organellerinde hasarın onarımı için kullanılacak bir lipoprotein oluşumu mekanizmasından kaynaklanıyor olabilir. Hayvanlar stres koşulları altında yüksek enerjiye ihtiyaç duyarlar ve protein katabolizması uyarılmaktadır [96]. Kadmiyumun toplam lipid içeriği *G. mellonella* üzerindeki etkilerine bakıldığında lipidin, Cd'un farklı konsantrasyonlarına maruz kalan *G. mellonella*'nın lipid miktarında bir azalma olduğu bildirilmiştir. Bunun sebebi olarak canlının enerji kaynağı olan lipidlerin okside olmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır [57].

Böcekler için karbonhidrat önemli bir makro moleküldür. Doğada böceklerin kullandığı nektar, bal özü gibi şeker kaynakları metabolik ihtiyaçların kullanılması için hemen kullanılabileceği gibi glikojene ya da trehaloza çevrilerek, sonra kullanmak üzere depolanabilir [97]. *P. turionellae* larvaları, sipermetrine maruz kaldığında lipid ve protein içeriğinin büyük ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Radikallerin oluşturduğu stres nedeniyle enerji metabolizmasında lipid ve protein katabolizması gerçekleştiğini savunmuşlardır [96]. Vücut içinde, toksik maddeler detoksifikasyon mekanizmalarını tetiklediği ve biyotransformasyon yoluyla detoksifikasyona uğramakta olduğu

savunulmuştur. Detoksifikasyon enzimleri üretmek için yüksek enerji gerekir ve bu süreçte ısı şoku proteinleri rol oynar. Selenyumun *G. mellonella*'da oksidatif stres parametrelerini, enerji rezervlerini ve toplam hemosit sayısını değiştirdiğini gösteren çalışmada bu değişikliklerin, selenyum kaynaklı oksidatif strese karşı fizyolojik bir adaptasyon olabileceği ve E vitamininin selenyum toksisitesinde koruyucu bir rol oynayabileceği düşünülmüştür [98]. Lipid peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonları ile birtakım enzimlerin yapısına giren organik moleküllerin hasar gördüğünü bilinmektedir [30]. Kayış ve Altun (2019) Tiyaetoksam (TMX) verilen *G. mellonella* larvalarının tüm TMX dozları (10 µg hariç) için lipid ve karbonhidrata doza bağlı azalmaya neden olduğu ve bu durumun azalmış lipid ve karbonhidrat seviyeleri detoksifikasyon enzimlerinin sentezi ile ilgili olabilir veya ROT tarafından lipid ve karbonhidrat hasarı meydana geldiğini düşündürmüşlerdir [84]. Benzer şekilde Piretrumun neden olduğu stres altında *Corcyra Cephalonica (St.)*'ın gelişimi sırasında karbonhidrat, protein ve lipid düzeylerinin seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir [99]. Bu duruma dair bulgular çalışmamızın sonuçlarını da desteklemektedir.

Böcekler doğal bağışıklık sistemine sahiptir ve edinilmiş bağışıklık sisteminden yoksundurlar. Herhangi bir enfeksiyon ya da kimyasal ajan ile karşılaştıklarında vücutlarında iki tip savunma sistemi harekete geçmektedir. Bunlar hızlı bir şekilde etki ederler. Hücresel ve humoral yanıtlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Humoral savunma yanıtı melanizasyon ve pıhtılaşmayı içermektedir [100]. Farklı Sulfoxaflor konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısına etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda toplam hemosit sayısı denenen konsantrasyonlarda (0.01, 0.10, 0.25 µg) kontrol ile karşılaştırıldığında artmıştır fakat yüksek konsantrasyonlarda (0.50, 1.00 µg) kontrole göre önemli ölçüde azalma görülmüştür. Toplam hemosit sayılarında ortaya çıkardığı değişimler maddenin endokrin sisteme etkisi sonucu olabileceği gibi hücre ölümü ile sonuçlanan otofajik ve apoptotik yolların tetiklenmesi sonucu da olabilir. Azadirachtinin en yaygın ticari formülasyonu olan Neem Azal topikal aplikasyon yöntemiyle *G. mellonella*'ya tatbik edilerek maddenin hücresel bağışıklığa etkilerinin ilk kez ortaya konulduğu bir çalışmada azadirachtin uygulamasında, dolaşımdaki toplam hemosit sayıları kontrol

gruplarına göre keskin bir düşüş göstermiş ancak farklı tipteki hemosit sayıları üzerindeki etki toplam hemosit sayılarına nazaran daha az oranda gerçekleştiği görülmüştür [101]. Sak 2004, Cypermethrin'in *Pimpla turionellae*'nin hemositlerine olan etkilerini araştırmış ve son evre larvalara 20, 50, 100 ve 150 ppm doz değerlerini uygulamıştır. Cypermethrin uygulamasına bağlı olarak, doz artışıyla beraber, hemositlerde mitotik aktivitede azalma ve apoptotik hemosit sayılarında kontrole göre büyük artış meydana gelmiştir [102]. Piripoksifen'in *G. mellonella*'nın son instar larvalarına topikal olarak uygulandığı benzer bir çalışmada hemosit sayısının azaldığını belirtmişlerdir. Hemositlerin hem bağışıklık hem de endokrin sistemlerinin birbirine bağlı olduğunu ve bağışıklık sinyaline aracılık edebileceğini bildirmişlerdir. Piripoksifen'in endokrin bezleri üzerindeki toksik etkisi ve ayrıca toksik etkinin hemositlerin plazma zarının tahrip olması nekrotik sonuçlara neden olduğunu kaydetmişlerdir [56]. Yüksek deltamethrin konsantrasyonlarına maruz kalan *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısındaki düşüş, endokrin bezlerin inhibisyonu ve nodül oluşumu ile ilişkilendirilmiştir [103]. İnsektisitlerde yapılan çalışmaların yanında ağır metallerle yapılan çalışmalara bakıldığında Zn ve Cu' ın tek başına ve karışım halinde *G. mellonella* larvalarının total hemosit sayısında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Toplam hemosit sayısındaki bu azalmanın sebebi ağır metallerden etkilenecek değişiklik gösterdiği savunulmuştur [100].

Farklı Sulfoxafloor konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemositlerinde mikronükleus oluşumuna etkilerini araştırdığımız çalışmamızda düşük konsantrasyonlarda değişim olmadığı fakat yüksek konsantrasyonlar olan 0.50 ve 1.00 µg içeren besinle beslenen böceklerde kontrole kıyasla artışın önemli miktarlarda olduğu görülmüştür. Bu durumda *G. mellonella* larvalarında, yüksek dozlar genotoksik etki gösterirken düşük dozların genotoksik etki olmadığı düşünülebilir. Deltamethrin'nin *G. mellonella* larvaları üzerinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda mikronükleuslu hücre sayıları deltametrine maruz kalma süresine bağlı olarak önemli derecede artış göstermiştir. Bu durum deltametrinin *G. mellonella* hemositlerinde meydana gelen mikronükleus oluşumunu indüklediğini ve genotoksik etkisini açıkça göstermektedir [103]. Benzer olarak tiyametoksam *G. mellonella* larvalarında MN sayısı, TMX ile yapılan uygulamadan sonra kontrol ile karşılaştırıldığında önemli

ölçüde arttığı bunun da *G. mellonella*'da genotoksisiteye neden olduğunu belirtmişlerdir [84]. Cypermethrin'in *Odontophrynus americanus* larvalarının eritrositleri üzerinde yapılan MN testi sonucu MN oluşumunun nispeten düşük olmasına rağmen (1-3 MN / 1000 hücre), kontrole göre arttığı bu durumun apoptotik hücrelerdeki artışın MN'nin artışı ile pozitif korelasyonlu olduğunu, elde edilen sonuçların genotoksik olduğunu bildirmişlerdir [104]. Trifluralin, Treflan ve Etil Metan Sülfonatın *Oreochromis niloticus*'ta oluşturduğu genotoksik hasar üzerine Askorbik asitin antigenotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmada trifluralin, treflan ve etil metan sülfonat uygulamalarının balık eritrositlerinde genotoksik hasarı yükselttiğini göstermiştir Askorbik asitin ise herbisitlerin oluşturduğu genotoksik hasarı düzenleyici etkisi ortaya çıkarılmıştır [105]. Asetamiprid neonikotinoid grubunun bir üyesidir böceklerde nikotinik reseptörleri için seçici agonistler olarak görev yapmaktadır. Asetamiprid'in insan CaCo-2 hücrelerinde asetamipridin'in muamelesi sonucunda önemli ölçüde sitokinlerde MN oluşumları görülmüştür. Çalışmada asetamipridin, in vitro sitotoksisitesini ve genotoksisitesinin varlığını açıkça göstermiştir. Asetamipridin çift veya tek iplikçikli DNA ile etkileşimli olmayan bir şekilde etkileşime girmiş olabileceğini ayrıca DNA hasarı oluşumu bu tür bileşikler tarafından ROT üretilmesine bağlı olduğu belirtilmiştir [106]. İnsan lenfosit hücrelerine Klorda'nın farklı dozlarda yapılan uygulamaları sonucu doz artışına bağlı olarak MN frekansının arttığı ve bu böcek ilacının insanlarda genotoksik etkili olduğu belirlenmiştir [107]. Görüldüğü üzere omurgalılar ile yapılan çalışmalarda sonuçlarımızı desteklemektedir.

Sulfoxaflor'un *G. mellonella* larvaları üzerinde denenen tüm konsantrasyonlarında comet analizi sonucu DNA hasarı oluşturduğu ve bu durumun sebebi cometin kuyruk uzunluğundan kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Düşük konsantrasyonlar (0.01, 0.10, 0.25 µg) kontrol ile karşılaştırıldığında kuyruk uzunluğunda artış görülse de istatistiki fark görülmemiştir. Kuyruk uzunluğunun en fazla olduğu durum konsantrasyon 0.50 µg'da ortaya çıkmıştır. 1.00 µg'da ise kontrole ve düşük konsantrasyonlara kıyasla kuyruk uzunluğu artmış fakat 0.50 µg a kıyasla düşük kalmıştır. Bu sonuçlar MN oluşumunun meydana geldiği konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonlarda hem MN oluştuğu hem de comet

kuyruk uzunluğu tespit edilmiştir. Bu durumun yüksek konsantrasyonlar için Sulfoxaflor'un genotoksik olduğu sonucuna varabiliriz. Sonuçlarımızla benzerlik gösteren bir çalışmada azadirachtin'in subletal dozlarda bile *G. mellonella* larval genomunda önemli oranda hasara neden olduğunu ve larval hemositlerinde azadirachtin'in genotoksitesinin *in vivo* değerlendirilmesinde comet analizinin kullanışlı olduğunu göstermiştir. *G. mellonella* larvaları üzerindeki genotoksitesi, otofajik veya apoptotik oluşumun indüksiyonu ile açıklanmıştır [39]. *G. mellonella* larvalarında juglonun neden olduğu oksidatif ve genotoksik stres değişikliklerini araştırmayı amaçlayan bir çalışmada böcek hemositlerinin genomunda önemli DNA ve kromozom hasarı meydana gelmiştir. Larvaların DNA'sında hasar artışı juglona bağımlı oksidatif stresin meydana geldiğini göstermiştir [51].

Organofosforlu insektisitlerden kloropirifos ve asefatın fare lökositlerinde doz artışına bağlı olarak comet analizi sonucu kuyruk uzunluğunun artması DNA'ya zarar verme yeteneğine sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır. DNA parçalanmasında DNA bazlarının alkilasyonu doğrudan veya dolaylı olarak protein alkilasyonu yoluyla oluştuğu vurgulanmıştır [49]. Cypermethrinin albino farelerinde doza bağımlı olarak değerlendirilen tüm organlarda DNA hasarında artış gözlenmiştir. Bu durum ROT'un tek zincirde kırıklara yol açabilecek DNA hasarına neden olabileceği sonucuna varmışlardır [108].

Çalışmamızda Sulfoxaflor'un denenen düşük konsantrasyonları (0.01 ve 0.10µg) kontrol ile karşılaştırıldığında *G. mellonella* erginlerinin bıraktıkları toplam yumurta sayısında azalmalar olduğu görülmüştür. En yüksek düşüş 0.50 µg da görülmüştür. Sulfoxaflor'un denenen en yüksek konsantrasyonunda (1.00 µg) ise 0.10 ve 0.25 µg a kıyasla bırakılan yumurta sayısı düşmüş fakat bu düşüşün 0.50 µg ile karşılaştırıldığında daha az olduğu görülmüştür. Sulfoxaflor'un denenen tüm konsantrasyonlarında kontrole göre açılan yumurta sayısında önemli bir azalma olduğu görülmüştür. *G. mellonella* ile yaptığımız çalışmada yumurta açılımının konsantrasyon artışına bağlı olarak azalması, sulfoxaflor'un yumurtanın embriyonik gelişiminde daha çok etkili olmasını neden olarak gösterebiliriz. Sulfoxaflor'un toksik özelliği ile larvaların beslenmesini engelleyerek besin alma davranışını doza bağlı olarak azaltması yetersiz beslenme nedeniyle embriyonik gelişiminin uzamasına

neden olmuş olabilir. Daha önemli bir sebep olarak Jüvenil hormonunu gösterebiliriz. Jüvenil hormonunun ergin evredeki dişilerin yumurtlaması üzerine etkileri bilinmektedir. *G. mellonella* erginlerinin sağlıklı yumurtalarının azalması sulfoxaflor'un sinir ve endokrin sisteme etki ederek carpus allotumdan salınan juvenil hormonunun sentezini engellemesiyle üreme dokularını doğrudan etkilemiş olabilir. Sonuç olarak böcekde ovaryumlardaki yumurta verimini jüvenil hormon ve ovaryum ekdisteroidlerinin seviyesini değiştirmek suretiyle etkilediği ileri sürülebilir. Sonuçlarımıza benzer olarak Sulfoxoflor'a maruz kalan *Bemisia tabaci* ve *Trialeurodes vaporariorum*'un ergin evresindeki olumsuz etkisi sonucunda yumurtlama aktivitesinde azalma meydana gelmiştir [5]. Azadirachtin 'e maruz kalan *Tetranychus cinnabarinus*'un ergin bireylerinin bıraktıkları toplam yumurta sayısının kontrole göre azaldığı görülmüştür [109]. *Pimpla turionellae* erginleriyle Azadirachta indica ekstraktının yumurta verimi, yumurta açılımı ve yaşam süresi üzerine etkilerine bakıldığında konsantrasyon arttıkça yaşam süresi, yumurta verimi ve yumurta açılımının önemli seviyede azaldığı gözlenmiştir [110]. Bu durum neticesinde subletal dozda kullanılan insektisitlerin böceklerde ölüm oranını, üreme yeteneğini ve yeni jenerasyon bireylerinin genetik yapısını değiştirerek, onların yumurta bırakmalarını ve yumurta açılım oranları üzerinde de etki gösterdiği belirtilmiştir [110]. Çalışmamızın aksine pestisitlerin yüksek uygulanan dozları canlılar üzerinde olumsuz etki yaparken sublethal dozlar ise bazı biyolojik parametreler üzerinde olumlu etki yapabilmektedir. Buna örnek olarak birçok zararlıya karşı kullanılan imidacloprid etken maddesinin sublethal dozlarının akar *Panonychus ulmi* ve predatörü *Neoseiulus californicus*'un yumurtlama sürelerini uzattığı ve dişi başına bırakılan yumurta sayılarını arttırdığı belirtilmiştir [111]. Çalışmamızın aksine başka bir çalışmada ise deltamethrin, sipermethrin, imidakloprid ve thiacloprid insektisitlerinin tarla uygulama dozu (T) ve tarla uygulama dozunun yarısı (T/2)'nin uygulandığı *Tetranychus urticae* erginlerinde thiacloprid ve cypermethrin'in her iki dozunun da *T. urticae*'nin yumurta verimine bir etkisi olmamıştır. Buna karşın imidakloprid ve deltamethrin'in T dozlarının *T. urticae*'nin yumurta verimine bir etkisi olmazken, imidakloprid T/2 dozu dişi başına ortalama yumurta veriminde artışa neden olmuştur. Deltamethrin'in T/2 dozu ise yumurta veriminde azalmaya neden

olmuştur. İnsektisitlerin böcek bünyesine alındığında enzimler yoluyla inaktive edilip stres faktörlerine bağlı olarak böcek ve akarlarda yumurta verimini artırabileceği düşünülmüştür [106].

Sulfoxaflor ile beslenen *G. mellonella* larvalarından yedinci evreye ulaşan larva gelişim sürelerine bakıldığında gruplar arasında (sadece 0.10, 0.25 ve 0.50 µg arasında anlamlı fark yoktur) farkın anlamlı olduğu ve sulfoxaflor uygulamasına bağlı olarak, larval gelişim süresinin, kontrol grubuna kıyasla uzadığı görülmüştür. Juvenil hormonunun larval dönemde gelişimin devamlılığını sağladığı gözönüne alındığında Sulfoxaflor'un juvenil hormonunu etkileyerek larvaların pupa evresine geçmesini engellediği ve larval dönemde daha uzun süre kalmalarına neden olduğunu düşündürmektedir. *G. mellonella*'nın Vinclozolin uygulanan bireylerinde artan konsantrasyonla birlikte erginleşme süresinin uzadığı, erginleşme yüzdesinin ise azaldığı ortaya çıkmıştır. Canlılar stres koşullarına girince, mücadele edebilmek için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Yapılan çalışmada vinclozolinin doz artışına bağlı olarak gelişimin gecikmesi, alınan kimyasalın vücuttan atılması için *G. mellonella*'nın karbonhidrat ve yağları kullanmasından dolayı enerji depolarında bir azalmanın meydana gelmiş olabileceği şeklinde açıklanmıştır [48]. Cypermethrin'nin farklı dozlarının verildiği *G. mellonella* larvalarının larval gelişiminin ve puplaşma süresinin geciktiği, puplaşma yüzdesinin azaldığı ve ölüm oranının arttığı görülmüştür. Cypermethrinin sublethal konsantrasyonunun *G. mellonella* larvalarının gelişiminin uzamasına sebep olarak puplaşma süresini uzatması, puplaşma yüzdesini düşürmesi, bu insektisit *G. mellonella* üzerinde toksik etkilerinin olduğunu ve bu etkinin doza bağlı olarak değişiklik gösterdiğini açıkça göstermektedir. [112].

Benzer olarak *Apis mellifera* pestisit içeren kuluçka taraklarında yetiştirilmiştir. Arılarda özellikle işçi arının erken safhalarında gecikmeli gelişme gözlenmiştir. Kontamine kuluçka taraklarında pestisit kalıntılarına maruz kalan arılarda yetişkinlerin ömrü 4 gün azalmıştır. Gecikmiş larva ve ergin gelişimi erişkin ömrünün kısalması, kuluçkada artış, yiyecek arama etkinliğinin azalması dahil ölümcül etkiler ortaya çıkmıştır. Tersine, pestisit kalıntıları oluştuğunda çoklu kuluçka döngülerinden sonra tedavi tarağında yetiştirilen arılardaki hayatta kalma oranı artmıştır [113]. Başka bir çalışmada ise zararlı böceklerle mücadele için besinlere

eklenen borik asit ve sodyum tetraborat'ın gelişmeyi geciktirdiği, yumurta verimini ve açılımını azalttığı, larva ve pup bireylerinin gelişimini tamamlamadan ölmesine neden olduğu belirlenmiştir [112]. Görüldüğü üzere hem *G. mellonella* hem de diğer canlılar ile yapılan çalışmaların sonuçları çalışmamızla örtüşmektedir.

Sunulan çalışmada Sulfoxaflor eklenen besin ile beslenen *G. mellonella* larvalarından elde edilen pupal gelişim sürelerine bakıldığında gruplar arasında farkın anlamlı olmadığı fakat kontrol ile karşılaştırıldığında pup olma süresinin uzadığı görülmüştür. Juvenil hormonun deri değiştirmeyi sağladığı ve ekdizon hormonunun ise metamorfoz sırasında evreden evreye geçişi kontrol ettiği bilinmektedir. Gelişim dönemlerinde bu tarz etkilerin görülmesi böceğin gelişiminde önemli rol oynayan juvenil hormonunda gerçekleşen değişimlerden ve ekdizon hormonunun baskılanması sonucu metamorfozun engellendiği düşünülebilir. Bununla birlikte canlılar oksidatif stres durumunda mücadele edebilmek için enerji rezervlerini kullanırlar. Bu sebeple *G. mellonella*'nın da bu stres durumundan kurtulabilmek için enerji harcamaları pupanın gelişimini uzatarak puplaşma süresini geciktirmiş olabilir. Normalde böceğimizin yumurta üretmek için kullandığı enerjiyi larva ve pup dönemlerini uzatmak için kullandıklarını yani gelişmeyi ve daha uzun süre yaşamayı üremelerinin azalması pahasına tercih ettiklerini varsayabiliriz. Çalışmamızın sonuçlarıyla paralelik gösteren bir çalışmada, *G. mellonella*'nın son evre larvalarına farklı azadirachtin konsantrasyonlarının (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 3000 ve 10000 ppm) uygulanması, bireylerin puplaşma süresinde kontrole göre artmaya neden olmuştur. Ardından yine farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 50 ve 100 ppm) azadirachtin uygulanan son evre larvaların pup oluşturma süreleri kontrol gruplarına göre önemli oranlarda artış göstermiştir [101].

Çalışmamızın *G. mellonella* puplarından ergin olma süresi üzerine yapılan istatistiksel analiz sonucunda; gruplar arasında farkın anlamlı olmadığı anlaşılmıştır. Kontrol ile 0.01 µg karşılaştırıldığında önemli bir fark olduğu ve kontrol ile diğer gruplar arasında ergin olma süresi uzadığı fakat istatistiksel anlamda fark olmadığı görülmüştür. Sulfoxaflor'un ergin olma süresini düşük dozlarda etkileyip uygulanan daha yüksek dozlarda anlamlı etkilememesi maddenin hormesis etkisinin bir

göstergesi olabilir. Literatürde, çeşitli insektisit ve toksik maddelere maruz kalan farklı böcek türlerinde hormesis etkisinin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur [101].

Sulfoxaflor'un eklendiği besin ile beslenen *G. mellonella* larvalarının pup olma oranlarına bakıldığında kontrol ile 0.01, 0.10, 0.25 µg konsantrasyonları arasında bir fark olmadığı görülmüştür. 0.50 ve 1.00 µg arasında ve kontrolle aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olduğu belirtilmiştir. Pup olma oranının 0.50 µg da en düşük seviyeyi bulduğu görülmüştür. Sulfoxaflor'un denenen tüm konsantrasyonlarında *G. mellonella* larvalarının erginleşme oranına etkisi olmadığı ortaya çıkmıştır. Kontrol ile konsantrasyonlar arasında bir fark olmadığı ve aynı zamanda konsantrasyonlarında kendi aralarında bir fark olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda puştan ergin evreye geçiş süresinin Sulfoxaflor konsantrasyonlarından anlamlı olarak etkilenmemesini böceğin pupal evrede iken vücuda alınmış kimyasalları atabilmesinden ve bir sonraki evreye geçişi etkilememesinden kaynaklandığını düşünebiliriz.

G. mellonella'nın dişi ve erkek bireylerin ömür uzunluklarına bakıldığında erkeklerin kontrol grubuna kıyasla bütün konsantrasyonlarda ömür uzunluğunun azaldığı ve 0.01, 0.10, 0.25 µg arasında istatistiki fark görülmemiştir. Yüksek konsantrasyonlarda düşüş artmıştır. Dişi bireylere bakıldığında kontrole kıyasla bütün konsantrasyonlarda ömür uzunluğu azalmış görünse de 0.01, 0.10, 0.25 µg ile kontrol arasında istatistiki fark görülmemiştir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda düşüş artmıştır. Erkek ve dişi bireyler karşılaştırıldığında erkek bireylerin daha fazla yaşadığı görülmüştür. Bireyde meydana gelen oksidatif stres ömür uzunluğu üzerinde kısıtlayıcı bir faktör ortaya çıkarmış olabilir. Çalışmamız sulfaxoflor'un oluşturduğu stresten dolayı ömür uzunluğunu kısalttığı ve bunun sebebi olarak *G. mellonella*'nın da stres durumundan kurtulabilmek için enerji rezervlerini tüketmelerinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Çalışmamızı destekleyen bir araştırmada Sulfoxaflor'a maruz kalan *Bombus terrestris* larvalarından, ortaya çıkan erkek ve kraliçe arıların, maruz kalmayan arılara kıyasla sağlıklı olduğu ve kraliçe arı larvalarının ergin döneme dönüşmesinin daha uzun sürdüğü ortaya çıkmıştır. Buna ek olarak özellikle kraliçe arı larvalarının sulfoxaflor maruziyetine karşı işçi ve erkek arı larvalarından daha hassas olduğu ve

ölüm oranlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir [114]. Yakın zamanda tescil edilmiş iki etken maddesi sulfoxaflor ve Flupiradifuron insektisitlerine maruz kalan bal arılarında oksidatif stresi arttığı ve sulfoxaflor'a maruz kalan bal arılarının çoğunun altı saat içinde öldüğü, bu da sulfoxaflor'un arılar üzerindeki ciddi toksisitesini göstermektedir [111]. Sulfoxaflor konsantrasyonlarına (15 µg / ml'den başlayarak 5 ve 1.00 µg / ml'ye kadar) 15 gün boyunca oral yoldan maruz kalan yaban arısı *Bombus terrestris* 'in hayatta kalma süresini kısalttığı ve diğer canlılar üzerinde potansiyel davranışları etkilediği tespit edilmiştir [115]. Yaprak daldırma yöntemiyle Sulfoxaflor'un 0.059 mg / litre LC50 ile *M. persicae*'ye karşı yüksek toksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir. *M. persicae* neslinin sublethal dozlardaki Sulfoxaflor'a maruz bırakılması, ilk neslinde gelişim süresinin uzamasına neden olmuştur [115]. *G. mellonella* larvaları antihelmintik antibiyotik olan niklozamidin böceğin yaşama, gelişme, ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu, yumurta verimi, açılma oranı gibi biyolojik özellikleri üzerine etkisi laboratuvar şartlarında incelenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında denenen tüm konsantrasyonların yaşama oranını azalttığı, pup olma oranını ve ergin olma oranını da önemli oranda azaltmıştır. Denenen en yüksek konsantrasyonu erkek ömür uzunluğunu uzatırken, dişi ömür uzunluğunu ise etkilememiştir [32].

Thiacloprid, neonikotinoid bileşenler sınıfına ait dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir pestisittir. Thiacloprid etken maddeli insektisit *Apis mellifera anatoliaca* ve *Apis mellifera caucasica* doz ile yaşam süresi arasındaki ilişki oldukça yüksek bulunmuştur. Uygulanan doz arttıkça yaşam süresinde azalma görülmüştür. Kontrol grubu arılar pestisit püskürtülen arılara göre daha fazla yaşamışlardır [117]. Klorda'nın *Drosophila melanogaster*'in ♀ ve ♂ bireylerinin ömür uzunluğu üzerine etkileri in vivo olarak çalışılmıştır. Yapılan uygulamalarda erkek ve dişi bireylerde ömür uzunluğunun önemli derecede kısaldığı gözlenmiştir ve artan klordan'ın artan dozuna bağlı olarak her iki popülasyonda maksimum ömür uzunluğunun gerilediği ortaya çıkarılmıştır [107]. Bu sonuçlar insektisitlerin ömür uzunluğu üzerine olumsuz etkisi olduğunu göstermektedir ve bu durum çalışmamızı desteklemektedir. Benzer olarak *D. melanogaster*'in ömür uzunluğu üzerine neonikotinoid insektisitlerden İmidakloprid ve Asetamiprid' in toksik etkileri araştırılmıştır. Her iki insektisit dörd

farklı konsantrasyonları besine ilave edilmiştir. *D. melanogaster*'in erkek ve dişi bireyleri İmidakloprid ve Asetamiprid insektisitlerine maruz bırakılmıştır. Hem dişi hem de erkek popülasyonlarında insektisitlerin artan konsantrasyonuna bağlı olarak ömür uzunluğunun kısaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, insektisitler geri dönüşü olmayan bir şekilde asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmektedir. Organizmalarda asetilkolinesterazın inhibisyonu sinir sisteminin aşırı uyarılmasına neden olur ve solunum aktivitesinin durması ve sonunda ölüme yol açmaktadır. Bulgulara göre, IMI ve ACE'nin, çok düşük dozları, *D. melanogaster* dişi ve erkek popülasyonlarında yaşam süresini kısalttığı uzun ömürlülük ve tüm yaşam aktivitelerinin azaltılması, gelişim özellikleri ve yumurta üretimini olumsuz etkilediği bildirilmiştir [118].

Çalışmamızda elde edilen bulgulardan yola çıkarak Sulfoxaflor'un *G. mellonella*'nın gelişimini ve biyoparametrelerini olumsuz etkilediği ortaya çıkmıştır. Netice olarak hedef olmayan canlılarında bu insektisitten olumsuz etkileneceğini ve bu sebeple bilinçli kullanılması gerektiği bilinmelidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sulfoxaflor' un *G. mellonella*'nın gelişimine ve bazı biyokimyasal parametrelerine etkisi araştırdığımız çalışmada parametreler olumsuz etkilenmiştir.

Sulfaxoflor'un SOD, CAT, APX, GST ve PO aktivitesini değiştirerek hücrelerde peroksidasyona yol açarak toksik olarak etkilediği düşünülebilir.

Çalışmamızda göze çarpan sonuçlardan biri canlının yumurta verimi ve açılımını düşürmesi, larvanın gelişim süresini uzatması olmuştur. Elde ettiğimiz bulguların ışığında, şöyle bir görüş ortaya atabiliriz; kullandığımız insektisit *G. mellonella*'nın en çok zarar verdiği larva evresinde daha uzun süre kalmasına yol açarak zararlı türlerin doğada larva gelişimlerini uzatması ekonomik kaybı artıracaklarını bu nedenle, böcek ilacı kullanırken / çalışırken gerekli önlemlerin alınması gerektiğini öneriyoruz. Ayrıca *G. mellonella*'nın büyüme ve gelişmesiyle ilgili Sulfoxaflor kaynaklı hormon değişimlerini açıklamak için üreme ile ilişkili hormon seviyelerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Aynı zamanda ekonomik olarak zarara sebep olan böceklerin yumurta sayısının azalması böceklerin kontrolünde önemlidir.

G.mellonella larvalarının hemolenfinde toplam hemosit sayılarında meydana gelen azalmalar çevre kirliliği düzeylerini ekolojik olarak değerlendirmede kullanılabilirliğini ve başka türler üzerinde de yapılacak immünolojik çalışmalara yol gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda comet analizi ve MN testi yapılmış olup yüksek konsantrasyonlarda DNA hasarı olduğu sonucuna varılmıştır.MN testinin maliyetinin düşük ve pratik olması açısından diğer metodlara göre genotoksisite araştırmalarında sıkça tercih edilen bir metod olabileceği söylenebilir. Comet analizinin insektisitlerin neden olduğu genotoksisitenin saptanması için hassas bir tahlil olduğu sonucuna varılabilir. Yapılan comet analiziyle *G. mellonella*'nın bu çalışma için uygulanabilirliği gösterilmiştir.

G. mellonella'nın model organizma olması sulfoxaflor'un omurgalı canlılar üzerinde de benzer etkiler göstermesi açısından çalışmamızın önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *G. mellonella*'nın hedef olmayan canlılar için kirleticilerin etkilerini göstermek amacıyla biyoindikatör olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] H. Kizilet ve H. Uysal, “Neonikotinoidler ile İnsan Lenfositlerinde Genotoksisitenin Uyarılması”, *Cumhuriyet Science Journal*, vol. 39, no. 1, pp. 201-210, 2018.
- [2] M. N. Kartal, “Neonikotinoid pestisit uygulamalarının bir sonucu olarak; kontamine ballar ve arılar”, *Türkiye Halk Sağlığı Dergisi*, vol. 17, no. 1, pp. 88-91, 2019.
- [3] S. Ünver ve H. Uysal, “Neonikotinoid İnsektisitlere Bağlı Olarak *Drosophila melanogaster*’in AChE Aktivitesinde Meydana Gelen Değişikliklerin Bitkisel Ekstraktlar ile Giderilmesi Üzerine Araştırmalar”, *Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, vol. 35, no. 4, pp. 107-116, 2014.
- [4] Q. Tang, M. Xiang, H. Hu, C. An ve X. Gao “Evaluation of Sublethal Effects of Sulfoxaflor on the Green Peach Aphid (Hemiptera: Aphididae) Using Life Table Parameters”. *Journal of Economic Entomology*, vol. 108, no. 6, pp. 2720-2728, 2015.
- [5] L. Bacci, S. Convertini ve B. Rossaro “A review of sulfoxaflor, a derivative of biological acting substances as a class of insecticides with a broad range of action against many insect pests”, *Journal of Entomological and Acarological Research*, vol. 50, no. 3, pp. 7836, 2018.
- [6] X. Liao, R. Jin, X. Zhang, E. Ali, K. Mao, P. Xu, J. Li ve H. Wan, “Characterization of sulfoxaflor resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål)”, *Pest Management Science*, vol. 75, no. 6, pp. 1646–1654, 2019.
- [7] H. Siviter, M.J F Brown ve E. Leadbeater “Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success”, *National Library of Medicine*, vol. 561, pp.109-120, 2018.
- [8] J. M. Babcock, C. B. Gerwick, J. X. Huang, M. R. Loso, G. Nakamura, S. P Nolting, R. B Rogers, T. C Sparks, J. Thomas, G. B Watson ve Y. Zhu “Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide”, *Pest Management Science*, vol. 67, no. 3, pp 328–334, 2011.

- [9] X. Wang, A. Anadon, Q. Wu, F. Qiao, I. Ares, M-R Martínez-Larrañaga, Z. Yuan ve M. Martínez “Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism”, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 6, no. 58, pp. 471–507, 2018.
- [10] V. Lushchak, “Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification”, *Chemico-Biological Interactions*, vol.5, no. 224, pp. 164-175, 2014.
- [11] D. Kodrík, A. Bednarova, M. Zemanová ve N. Krishnan “Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects—An Update”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol.16, no. 10, pp. 25788-25816, 2015.
- [12] H. Simon, A. Haj-Yehia ve F. Levi-Schaffer “Role of reactive oxygen species (ROT) in apoptosis induction”, *Apoptosis*, vol. 5, no. 5, pp. 415–418, 2000.
- [13] K. Gubory, P. Fowler ve C. Garrel “The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in premancy outcomes”, *The International journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol.42, no. 10, pp. 1634-1650, 2010.
- [14] H. Karabulut ve M. Ş. Gülay, “Antioksidanlar”, *Mehmet Akif Ersoy Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, vol. 1, no. 1, pp. 1, 2016.
- [15] K. Lalitha, S. Karthi, G. Vengateswari, R. Karthikraja, P. Perumal ve M. S Shivakumar “Effect of entomopathogenic nematode of *Heterorhabditis indica* infection on immune and antioxidant system in lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)”, *Indian Society for Parasitology*, vol. 42, no. 2, pp. 204–211, 2018.
- [16] B. Bakır, D. Erdağ, Y. S. Eliş, S. E. Karadağ, H. Asker ve M. Sözmen “Immunohistochemical examination on the effects of malathion and *Onosma nigricaula* (Boraginaceae) on the catalase (CAT) and superoxide dismutase-2 (Mn-SOD) in renal tissues of mice”, *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, vol. 64, no. 4, pp. 125-130, 2017.
- [17] B. Balakrishnan, S. Su, C. Zhang ve M. Chen “Identification and Functional Characterization of Two Sigma Glutathione S-Transferase Genes From Bird Cherry-Oat Aphid (Hemiptera: Aphididae)”, *Journal of Economic Entomology*, vol. 112, no. 1, pp. 416–424, 2019.

- [18]S. Yorulmaz ve R. Ay, “Akar ve Böceklerde Pestisitlerin Detoksifikasyonunda Rol Oynayan Enzimler”, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, vol. 24, no. 2, pp. 137-148, 2010.
- [19]C. Barata, I. Varo, J. C Navarrob, S. Arun ve C. Porte “Antioxidan enzym activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 140, no. 2, pp. 175-186, 2005.
- [20]P. Lewis, N. Stefanovic, J. Pete, A. C Calkin, S. Giunti, V. Thallas-Bonke, K. A Jandeleit-Dahm, T. J Allen, I. Kola, M. E Cooper ve J. B de Haan “Lack of the Antioxidant Enzyme Glutathione Peroxidase-1 Accelerates Atherosclerosis in Diabetic Apolipoprotein E-Deficient Mice”, *Circulation*, vol.115, no. 16, pp. 2178-2187, 2007.
- [21]D. Satoh, A. Horii, M. Ochiai ve M. Ashida “Prophenoloxidase-activating Enzyme of the Silkworm, *Bombyx mori*”, *The journal of biological chemistry*, vol. 274, No. 11, pp. 7441–7453, 1999.
- [22]L. Cerenius ve K. Soderhall, “The prophenoloxidase-activating system in invertebrates”, *Immunological Reviews*, vol. 198, pp. 116–126, 2004.
- [23]I. Lukasik, S. lawska ve A. Wójcicka “Antioxidant defense mechanisms of cereal aphids based on ascorbate and ascorbate peroxidase”, *Biologia*, vol. 64, no. 5, pp. 994—998, 2009.
- [24]J. Franco, T. Posser, P. R Dunkley, P. W Dickson, J. J Mattos, R. Martins, A. C D Bairy, M. R Marques, A. L Dafre ve M. Farina “Methylmercury neurotoxicity is associaed with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase”, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 4, pp. 449-457, 2009.
- [25]I. Chodakowska, A. Witkowska ve M. E. Zujko “Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body”, *Advances in Medical Sciences*, vol. 63, pp. 68-78,2018.
- [26]P. Ahmad, C. Jaleel, M. A. Salem, G. Nabi ve S. Sharma “Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress”, *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 30, no. 3, pp. 161–175, 2010.

- [27]M. Akpınar, N. Akpınar, K. Metin, A. E. Akpınar ve S. Görgün “*Gryllus campestris* L. (Orthoptera: Gryllidae)’ nin çeşitli gelişim Evrelerinde Glikojen Seviyesindeki Değişimler”, *Fen Bilimleri Dergisi*, vol. 31, no. 2,2010.
- [28]B. Firidin, O. Yanar ve H. Yılmaz “Herbivor Böceklerin Besin Dengeleme Mekanizmaları Food Balancing Mechanisms of Herbivore Insects”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, vol. 6, no. 2, pp. 103-105, 2013.
- [29]H. Avan Aksoy, C. Bahadıroğlu ve R. Kayabaşı “X-ışınının *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae)’nın Pupalarında Toplam Protein, Karbonhidrat ve Lipid Miktarına Etkileri Üzerine Araştırmalar”, *Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, vol. 5, no. 1, pp. 14-23, 2015.
- [30]H. Kızılet ve H. Uysal, “Neonikotinoidler ile İnsan Lenfositlerinde Genotoksisitenin Uyarılması”, *Cumhuriyet Science Journal*, vol. 39, no. 1, pp. 201-210, 2018.
- [31]D. Grotto, L. Maria, J. Valentini ve C. Paniz “Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification”, *Química Nova*, vol. 32, no. 1, 169-174, 2009.
- [32]E. Büyükgüzel ve S. Kayaoğlu, “Niklozamidin *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)’nın bazı biyolojik ve fizyolojik özelliklerine etkisi”, *Türkiye Entomoloji Dergisi.*, vol. 38, no. 1, pp. 83-99,2014.
- [33]M. Ligeza-Žuber, “Mechanisms of *Galleria mellonella* cellular immune response after infection with entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*”, *Annals of Parasitology*, vol. 58, no. 4, pp. 227–228, 2018.
- [34]H. Altuntaş, A. Y. Kılıç, F. Uçkan ve E. Ergin “Effects of Gibberellic Acid on Hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)”, *Environmental Entomoloji Dergisi*, vol. 41, no. 3, pp. 688-696, 2012.
- [35]M. Fenech, “The in vitro micronucleus technique”, *Mutation Research*, vol. 455, pp. 81–95, 2000.
- [36]M. Fenech, “Cytokinesis-block micronucleus cytome assay”, *Nature protocols*, vol. 2, pp .5, 2007.

- [37]D. Kurt ve T. Kayış, “Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*”, *Turkish Journal of Zoology*, vol. 39, pp. 452-457, 2015.
- [38]M. Dikilitaş ve A. Koçyiğit, “Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile dna hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi”, *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, vol.14, no. 2, pp. 77- 89, 2010.
- [39]A. N. Jha, “Ecotoxicological applications and significance of the comet assay”, *Mutagenesis*, vol. 23, no. 3, pp. 207–221, 2008.
- [40]A. R. Collins, “The Comet Assay for DNA Damage and Repair”, *Molecular Biotechnology*, vol. 26, 2004.
- [41]A.F. Fidan, “DNA Hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi”, *AKU-Journal of Science*, vol. 8, no. 1, 2008.
- [42]C. A. Kwadha, G. O. Ong’amo, P. N Ndegwa, S. K Raina ve A. T Fombong “The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*”, *Insects*, vol.8, no. 2, pp.61, 2017.
- [43]E. Mikulak, A. Gliniewicz, M. Przygodzka ve J. Solecka “*Galleria mellonella* l. as model organism used in biomedical and other studies”, *Przegl Epidemioloji*, vol. 72, no. 1, pp. 57-73, 2018.
- [44]M. Avan ve A. Uğur, “Farklı Yapay Besin Ortamlarının *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Galleriidae)’nın Gelişimine Etkisi”, *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, vol. 7, no. 1, 2009.
- [45]Ö. Önen, P. Aksu Kılıçle, Y. Adalı ve H. Beşeren “Neonikotinoid pestisitlerin histopatolojik ve genotoksik etkileri” *Bozok Tıp Dergisi*, vol. 8, no. 1, pp. 139-147, 2018.
- [46]T. Sparks, G. B. Watson, M. R. Loso, C. Geng, J. M Babcock ve J. D Thomas “Sulfoxoflor and the sulfoximine insecticides: chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 107, no. 1, pp. 1-7, 2013.
- [47]R. M. Johnson, M. D. Ellis, C. A. Mullin ve M. Frazier “Pesticides and honey bee toxicity – USA”, *Apidologie*, vol. 41, pp. 312–331, 2010.

- [48] R. Öztürk ve Y. Akdoğan, “Vinclozolin’ in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)’ nın Erginleşme Süresi ve Eşey Oranı Üzerine Etkisi”, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, vol. 7, pp. 24-31, 2018.
- [49] M. F. Rahman, M. Mahboob, K. Danadevi, B. S. Banu ve P. Grover “Assessment of genotoxic effects of chloropyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes”, *Mutation Research*, vol. 516, pp. 139–147, 2002.
- [50] E. Duman ve H. Altuntaş, “Genotoxicity of azadirachtin on *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)”, *Biological Diversity and Conservation*, vol. 11, no. 3, pp. 24-30, 2018.
- [51] H. Altuntaş ve E. Duman, “Juglone induced oxidative and genotoxic stress in the model insect *Galleria mellonella* L. (Pyralidae: Lepidoptera)”, *Infection and Immunity*, vol. 75, pp. 175–183, 2007.
- [52] I. Emre, T. Kayış, M. Coşkun, O. Dursun ve H. Yeter Cogun “Changes in Antioxidative Enzyme Activity, Glycogen, Lipid, Protein, and Malondialdehyde Content in Cadmium-Treated *Galleria mellonella* Larvae”, *Annals of the Entomological Society of America*, vol.106, no.3, pp. 371-377, 2013.
- [53] T. Kayış, M. Coşkun, I. Emre ve O. Dursun “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*, vol.108, no. 4, pp. 570–574, 2015.
- [54] E. V. Grizanov, A. D. Semenova, D. A Komarov, E. A Chertkova, I. A. Slepneva ve I. M Dubovskiy “Maintenance of redox balance by antioxidants in hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* larvae during encapsulation response”, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol.98, no. 5, pp. 21460, 2018.
- [55] R. Gwokyalaya ve H. Altuntaş, “Boric acid-induced immunotoxicity and genotoxicity in model insect *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)”, *Insect Biochemistry Physiology*, vol. 101, pp. 21588, 2019.
- [56] B. S. Tunçsoy ve P. Özalp, “Effects of pyriproxyfen on hemocyte count and morphology of *Galleria mellonella*”, *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 24, No. 2a, 2015.

- [57]S. B. Sik, R. N. Choi ve L. Choong-Un “Effects of Cadmium on Total Lipid Content and Fatty Acids of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*”, *The Korean Journal of Ecology*, vol. 24, no. 6, pp. 349-352, 2001.
- [58]A. Aslanturk, S. Kalender, M. Uzunhisarcıklı ve Y. Kalender, “Effects of Methidathion on Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde Level in Midgut Tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae”, *Journal Entomology Research Socience*, vol.13, no.3, pp. 27-38, 2011.
- [59]H. Sevgili, “İki çalı çekirgesi üzerinde doğal bağışıklık parametrelerinden fenoloksidaz aktivitesi ile litik aktivitenin ve hemolimfteki protein konsantrasyonunun yöntemsel olarak belirlenmesi”, *Akademik Ziraat Dergisi*, vol. 5, no. 1, pp. 51-62, 2016.
- [60]D. Kurt ve T. Kayış, “Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*”, *Turkish Journal Zoology*, vol. 39, pp. 452-457, 2015.
- [61]Y. Sun, L.W. Oberley ve Y. Li, “A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase”, *Clinical Chemistry*, vol. 34, no. 3, pp. 497–500, 1988.
- [62]H. Aebi, “Catalase *in vitro* Methods”, *Enzymology.*, 105, pp. 121–126, 1984.
- [63]W. H. Habig, “Glutathione S- transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, pp. 7130-7139, 1974.
- [64]Y. Nakano, K. Asada, “Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts”, *Plant Cell Physiology*, vol. 21, pp. 1295-1307, 1981.
- [65]M. Ashida, “Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of silkworm *Bombyx mori* “, *Tissue Cell*, vol. 20, pp. 599- 610, 1988.
- [66]O. H. Lowry, “Protein Measurement with the Folin Phenol”, *Journal Biology. Chemistry*, vol. 193, pp. 265, 1951.
- [67]E. Van Handel, “Rapid determination of total lipids in mosquitoes”, *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 1, pp. 302–304, 1985b.
- [68]E. Van Handel, “ Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes ”, *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 1, pp. 299–301, 1985a.

- [69]P. Venier ve S. Maron, “Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo(a)pyrene”, *Mutation Research*, vol. 390, sayı. 1-2, pp. 33-44, 1997.
- [70]C. T. Sparks, G. B. Watson, M. R. Loso, C. Geng, J. M. Babcock ve J. D. Thomas “Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects”, *Pesticide Biochemistry and physiology*, vol. 107, no. 1, pp. 1-7, 2013.
- [71]A. Lukaszewicz-Hussain, “Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity-Short review”, *Pesticide Biochemistry and physiology*, vol.98, no. 2, pp. 145-150, 2010.
- [72]Ö. Fırat ve T. Aytekin, “Neonikotinoid insektisit thiamethoxamın *Oreochromis niloticus*’ta oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi”, *BAUN Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol. 20, no. 2, pp 224-234, 2018.
- [73]K. S. EL-Gendy, N. Aly, F. H. Mahmoud, A. Kenawy, A. Khalek ve H. El-Sebae “The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid”, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, pp. 215-221, 2010.
- [74]E. Büyükgüzel, “Eicosanoids mediate hemolymph antioxidative response in larvae of *Galleria mellonella* L.” *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, vol. 156, pp.176-183, 2010.
- [75]M. C. Mathews, C. B. Summers ve G W. Felton “Ascorbate Peroxidase: A Novel Antioxidant Enzyme in Insects”, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 34, no. 1, pp. 57–68, 1997.
- [76]N. Krishnan ve F. Sehnal, “Compartmentalization of Oxidative Stress and Antioxidant Defense in the Larval Gut of *Spodoptera littoralis*”, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 63, no. 1, pp. 1-10, 2006.
- [77]I. Emre, T. Kayış, M. Coşkun, O. Dursun ve H.Yeter Çogun “Changes in Antioxidative Enzyme Activity, Glycogen, Lipid, Protein, and Malondialdehyde Content in Cadmium-Treated *Galleria mellonella* Larvae”, *Entomological Society of America*, vol. 106, no.3, 2020.

- [78] E. Büyükgüzel, “Evidence of Oxidative and Antioxidative Responses by *Galleria mellonella* Larvae to Malathion”, *Journal Econ Entomology*, vol. 102, no. 1, pp. 152-159, 2009.
- [79] E. Büyükgüzel ve K. Büyükgüzel, “Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*”, *Cell Biology Toxicology*, vol. 29, pp. 117–129, 2013.
- [80] T. Kayış, M. Coşkun, O. Dursun ve I. Emre “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*, vol. 108, no. 4, pp. 570–574, 2015.
- [81] E. Alp ve M. Coskun, Effects of the organophosphate insecticide fenthion on the antioxidant defense system and lipid peroxidation of *Galleria mellonella* L., *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 27, sayı. 12, pp. 8280-8285, 2018
- [82] Ü. Çömelekoğlu ve B. Mazmancı, “Pestisidlerin Kronik Etkisine Maruz Kalan Tarım İşçilerinde Eritrosit Süperoksit Dismutaz ve Katalaz Aktiviteleri”, *Turkish Journal of Biology*, vol. 24, pp. 483–488, 2000.
- [83] V. Parlak, M. Atamanalp, G. Alak ve A. Uçar, “Alfa Sipermetrinin Gökkuşığı Alabalığı Solungaç Dokusunda Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi”, *ISAS 2018-Winter*, Samsun, 2018, pp. 322-323.
- [84] T. Kayış, M. Altun ve M. Coskun, “Thiamethoxam-mediated alteration in multi-biomarkers of a model organism, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 26, pp. 36623–36633, 2019.
- [85] H. Altuntaş ve E. Duman, “Toxicological effects of the entomopathogenic *Purpureocillium lilacinus* on the model organism, *Galleria mellonella*”, *Biological Diversity and Conservation*, vol. 10, no. 1, pp. 153-159, 2017.
- [86] I. Kostaropoulos, A. I. Papadopoulos, A. Metaxakis, E. Boukouvala ve E. Papadopoulou-Mourkidou, “Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects”, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 31, pp. 313–319, 2001.

- [87] M. Yalçın ve S. Mermer, L. D Kozacı ve C. Turgut, "Insecticide resistance in two populations of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) from Turkey", *Turkish Entomology Dergisi*, vol. 39, no. 2, pp.137-145, 2015.
- [88] S. Qi, C. Wang, Z. Qin, X. Li ve C. Wang "Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 98, pp. 339–344, 2013.
- [89] S. Kaya, Ç. Çakaloğlu ve B. Gündüz, "Effects of olive leaf extract on *Galleria mellonella* Phenoloxidase activity", *International Symposium on Biodiversity Research*, vol. 7, no. 3, pp. 631, 2019.
- [90] S. Kaya, S. Yerlikaya, G. Idrizoglou ve B. Gündüz, "Effects of Hypericum perforatum extract on Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*) Phenoloxidase activity", *International Symposium On Biodiversity Research*, pp. 632, 2019.
- [91] G. B. Aksan, "İndol-3-asetik asitin konak *Galleria mellonella* l. ve endoparazitoiti *Pimpla turionellae* l.'nin hemolitik ve fenoloksidaz aktivitesine etkileri", Yüksek lisans tezi, Kocaeli Üniversitesi, 2019.
- [92] H. M. Nasr, M .E. I. Badawy ve E. I. Rabea "Toxicity and biochemical study of two insect growth regulators, buprofezin and pyriproxyfen, on cotton leafworm *Spodoptera littoralis*", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 98, pp. 198-205, 2010.
- [93] Z. Max, İ. L. Han, J.T Fen, G. Z Lix ve İ. Zhang "Effects of Terpinen-4-ol on Four Metabolic Enzymes and Polyphenol Oxidase (PPO) in *Mythimna separata* Walker", *Agricultural Sciences in China*, vol. 7, no. 6, pp. 726-730, 2008.
- [94] A. Armağan, "Eş Zamanlı Uygulanan İnsektisit ve Tuz Streslerinin Biber Bitkisinde (*Capsicum annuum* L.) Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri", *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Journal of Science and Technology*, vol. 12, no. 3, pp. 1601-1612, 2019.
- [95] E. L. Arrese ve J. L. Soulages, "Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation", *Annual Review of Entomology*, vol. 55, pp. 207–25, 2010.

- [96] O. Sak, F. Uçkan ve E. Ergin, "Effects of Cypermethrin on Total Body Weight, Glycogen, Protein, and Lipid Contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae)", *Belgian Journal Zoology*, vol. 136, no. 1, pp. 53-58, 2006.
- [97] Y. Koç ve A. Gülel, "Aydınlık başlangıç zamanının değişik yaştaki *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) erginlerinin karbonhidrat miktarı üzerine etkisi", *Uludağ Arıcılık Dergisi*, vol. 13, no. 1, pp. 3-15, 2013.
- [98] M. Coşkun, T. Kayış, E. Gulsu ve E. Alp., " Effects of Selenium and Vitamin E on Enzymatic, Biochemical, and Immunological Biomarkers in *Galleria mellonella* L", *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, 2020.
- [99] D. Mandal ve D. K. Chaudhuri., "Studies on carbohydrate, protein and lipid levels in normal and stress conditions in fat body and integument as compared to whole body during development of rice moth, *Corcyra cephalonica* (St.)", *International Journal of Tropical Insect Science*, vol. 13, no. 1, pp. 121-128, 2011.
- [100] A. Kara, B. Tunçsoy ve P. Özalp, "Cu, Zn ve Karışımlarının *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Hemosit Tipleri ve Sayıları Üzerine Etkileri", *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, vol.5, no. 1, pp. 45-51, 2020.
- [101] D. Taşkiran, " Azadirachtin'in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: pyralidae)'da hemositler üzerine etkileri", Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi, 2016. [102] F. Uçkan ve O. Sak, "Cytotoxic Effect of Cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Larval Hemocytes", *Ekoloji*, vol. 75, pp. 20-26, 2010.
- [103] D. Kurt ve Tamer Kayış, "Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*", *Turk Journal Zoology*, vol.39, pp. 452-457, 2015.
- [104] M. C. Cabagna, R. C. Lajmanovich, P.M Peltzer, A. M. Attademo ve E. Ale "Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin", *Toxicological and Environ Chemistry*, vol. 88, no.4, pp. 729-737, 2007.
- [105] S. Könen-Adıgüzel ve T. Çavaş, "Trifluralin, Treflan ve Etil Metan Sülfonatın *Oreochromis niloticus*'ta Oluşturduğu Genotoksik Hasar Üzerine Askorbik Asitin

- Antigenotoksik Etkisi”, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, vol. 6, no. 1, pp. 10-19, 2017.
- [106] T. Çavaş ve N. Çinkılıç, Ö. Vatan, D. Yılmaz ve M. Coskun “In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronukleus, comet and and $^3\text{H2AX}$ foci assays”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 104, no. 3, pp. 212–217, 2012.
- [107] E. Özyurt, H. Kızılet ve H. Uysal “Bio-Interaction of Chlordane on Non-Target Organisms”, *Commagene journal biology*, vol. 2, no. 1, pp. 48-54, 2018.
- [108] S. Patel, A K. Pandey, M. Bajpayee, D. Parmar ve A. Dhawan “Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay”. *Mutation Research*, vol. 607, pp. 176-183, 2006.
- [109] N. Topakçı ve H. Göçmen, “Pamuk kırmızı örümceği *Tetranychus cinnabarinus* (Boisd.) (Acari: Tetranychidae)’a karşı Azadirachtin’in etkinliği üzerine bir araştırma”, *Bitki Koruma Bülteni*, vol. 48, sayı.4, pp. 9-18, 2008.
- [110] S. İnıkaya, “Farklı azadirachtin oranlarının *Pimpla turionellae* l. erginlerinde yaşam süresi ve yumurta verimine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 2011.
- [111] S. Yorulmaz, C. Keskin, B. Bal ve M O. Dönmez “Imidacloprid’in Farklı Dozlarının *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae) ve Predatörü *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari:Phytoseiidae)’un Yaşam Çizelgesi Üzerine Etkileri”, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol.10, sayı. 2. 159-165, 2019.
- [112] J. Y. Wu, C. M. Anelli ve W. S Sheppard “Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Combon Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity”, *Plos one*, vol.6, no. 2, 2011.
- [113] J. C. Gore, L. Zurek, R. Santangelo, S M. Stringham, D. Wes Watson ve C. Schal “Water Solutions of Boric Acid and Sugar for Management of German Cockroach Populations in Livestock Production Systems”, *Journal Econ Entomology*, vol. 97, no.2, pp. 715-720, 2004.
- [114] Q. Tang, M. Xiang, H. Hu, C. An ve X. Gao “Evaluation of Sublethal Effects of Sulfoxaflor on the Green Peach Aphid (Hemiptera: Aphididae) Using Life

- Table Parameters”, *Journal Economi Entomology*, vol. 108, no. 6, pp. 2720–2728, 2015.
- [115] H. Siviter, A. J Folly, M J F. Brown, E. Leadbeater ve AJ. Folly., "Individual and combined impacts of sulfoxafloor and *Nosema bombi* on bumblebee (*Bombus terrestris*) larval growth" *The Royal society B*, vol. 287, pp 287, 2020.
- [116] P.Chakrabarti, E. Carlson, H. M Lucas , A. P Melathopoulo ve R. R Sagili." Field rates of Sivanto™ (flupyradifurone) and Transform® (sulfoxafloor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (*Apis mellifera* L.)" *PLos one.*, vol.15, sayı. 5, 2019.
- [117] A. Karahan, İ. Karaca ve M. A. Kutlu, "Thiacloprid'in, Anadolu Bal Arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) ve Kafkas Bal Arısı (*Apis mellifera caucasica*)'nın Yaşam Sürelerine Etkileri", *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, vol. 5, sayı. 3, pp. 245–252, 2018.
- [118] H. Uysal, H. Kızılet ve S. Unver, "The Effects of Neonicotinoids on the Longevity of the Male and Female Populations of *Drosophila melanogaster*", *Ekoloji*, vol. 24, vol. 96, pp. 57-63, 2015.