

T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PİRETROİT GRUBU İNSEKTİSİT DELTAMETRİNİN *Galleria mellonella*
L'NİN HEMOSİTLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

DENİZ KURT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2013

**T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PİRETROİT GRUBU İNSEKTİSİT DELTAMETRİNİN *Galleria mellonella*
L'NİN HEMOSİTLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Deniz KURT

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 10/09/2013 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından
oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**Yrd. Doç. Dr. Tamer KAYIŞ
BAŞKAN (DANIŞMAN)**

**Yrd. Doç. Dr. Mustafa COŞKUN
ÜYE**

**Yrd. Doç. Dr. Ahmet GENÇ
ÜYE**

**Doç. Dr. Mustafa ÖZDEN
Enstitü Müdürü**

**Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından desteklenmiştir.**

Proje No: FEFYL/2013-0001

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PİRETROİT GRUBU İNSEKTİSİT DELTAMETRİNİN *Galleria mellonella* L'NİN HEMOSİTLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Deniz KURT

Adıyaman Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Tamer KAYIŞ
Yıl: 2013, Sayfa sayısı: 51
Jüri : Yrd. Doç. Dr. Tamer KAYIŞ
: Yrd. Doç. Dr. Mustafa COŞKUN
: Yrd. Doç. Dr. Ahmet GENÇ

Sunulan çalışmada farklı deltametrin konsantrasyonlarının (5, 20, 50,100 ve 150 µl) *Galleria mellonella*' nin hemositleri üzerine olan etkileri 24, 48, 72 ve 96 saatlik periyotlarda araştırılmıştır.

G. mellonella' da prohemosit, plazmatosit, granülosit, önosit ve sferülositler olmak üzere beş çeşit hemosit tanımlanmıştır. Toplam hemosit sayısı (THS) deltametrinden önemli ölçüde etkilenmiştir. İlk 72 saatlik periyotta yüksek deltametrin konsantrasyonlarında (50, 100 ve 150 µl) kontrole göre önemli ölçüde azalırken, 96. saatte en yüksek konsantrasyonlar olan 100 ve 150 µl' da önemli ölçüde artmıştır.

G. mellonella hemositlerindeki mikronükleus oluşumu deltametrinden önemli ölçüde etkilenmiş ve özellikle yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 150 µl) tüm gruplarda önemli ölçüde artmıştır.

Sonuç olarak deltametrin *G. mellonella*' nin immün sisteminini etkilemiş ve genotoksik hasarlara neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Deltametrin, *Galleria mellonella*, hemosit, mikronükleus

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF THE PHYRETROIDS INSECTICIDE DELTAMETHRIN ON HEMOCYTES OF *Galleria mellonella* L.

Deniz KURT

Adiyaman University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Tamer KAYIŞ

Year: 2013, Number of Pages:51

Jury : Asst. Prof. Dr. Tamer KAYIŞ

: Asst. Prof. Dr. Mustafa COŞKUN

: Asst. Prof. Dr. Ahmet GENÇ

In the present study, effects of different concentrations of deltamethrin (5, 20, 50, 100 and 150 µl) on hemocytes of *Galleria mellonella* were investigated at 24, 48, 72, and 96 hour periods.

Five types hemocyte were defined in *G. mellonella*, prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes and onocytes. Total hemocyte counts (THC) was significantly affected by deltamethrin. In a first 72-hour period, THC significantly decreased compare to control at high deltamethrin concentrations (50, 100 and 150 µl), but at 96 th hours THC significantly increased in the concentrations of 100 and 150 µl deltamethrin.

Micronuclei formation was significantly affected by deltamethrin and particularly high concentrations of deltamethrin (100 and 150 µl) caused an increase in micronuclei formation in all groups.

Consequently, deltamethrin effected the immune system of *G. mellonella* and caused genotoxic damages.

Key Words: Deltamethrin, *Galleria mellonella*, hemocyte, mikronuclei

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince değerli bilgilerini, yardımlarını esirgemeyen, insani ve ahlaki değerleri ile örnek olan, sabrı ve hoşgörüsü ile beni cesaretlendiren kıymetli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Tamer Kayış'a,

Tezimin deney aşamasında değerli bilgilerinden ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Eyyüp Rencüzoğulları'na ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Coşkun'a;

Yüksek lisansa başlama konusunda beni cesaretlendiren ve tezimin yazım aşamasında bilgisiyle bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Dr. Özlem Demirci Turgunbayer'e;

Adıyaman'da bulunduğum süreçte hem kendisinin, hem de ailesinin tüm yardım ve desteği için arkadaşım Murat Tak'a;

Çalışmam süresince beni koşulsuz ve sabırla destekleyen aileme,

Ayrıca, yardımlarını ve hoşgörülerini esirgemeyen arkadaşlarım; Murat Satık, Keziban Berent, Zafer Balcı ve Felat Sert'e,

Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin FEFYL-2013-0001 sayılı projesi olarak destekleyen Adıyaman Üniversitesi'ne teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGE VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çevresel Kirleticiler	1
1.2. Pestisitler	1
1.2.1. Pestisitlerin sınıflandırılması	2
1.3. İnsektisitler	3
1.3.1. Piretroitler	3
1.3.1.1. Deltametrin	4
1.4. Böceklerde Bağışıklık Sistemi	5
1.4.1. Böceklerde humoral bağışıklık.....	5
1.4.2. Böceklerde hücrel bağışıklık.....	7
1.4.2.1. Böceklerde hemosit tipleri	7
1.4.2.1.(a). Prohemositler	7
1.4.2.1.(b). Plazmatositler	8
1.4.2.1.(c). Granülositler	8
1.4.2.1.(d). Önositoidler	9
1.4.2.1.(e). Sferülositler.....	9
1.4.3. Hemosit aracılıklı bağışıklık tepkileri	10
1.4.3.1. Fagositoz	10
1.4.3.2. Nodül oluşumu.....	10
1.4.3.3. Enkapsülasyon	11
1.5. Mikronukleus Testi.....	12
1.6. <i>Galleria mellonella</i> Linnaeus, (1758) Büyük Balmumu Güvesi	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15

3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kimyasal maddeler	19
3.1.2. Cihazlar ve gereçler	19
3.1.3. Stok kültürün hazırlanması ve deney böceklerinin elde edilmesi	20
3.1.4. Kontrol grupları ve deltametrin içeren besinlerin hazırlanması	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Böceklerin hemosit tiplerinin belirlenmesi.....	21
3.2.2. Toplam hemosit miktarının tayini	22
3.2.3. Toplam hemosit miktarının hesaplanması	22
3.2.4. Mikronükleus sayılarının belirlenmesi	24
3.2.5. Verilerin değerlendirilmesi	24
4. BULGULAR	25
4.1. <i>Galleria mellonella</i> 'da Hemosit Tipleri	25
4.1.1. Prohemositler	25
4.1.2. Plazmatositler	26
4.1.3. Granülositler	26
4.1.4. Sferülositler.....	27
4.1.5. Önositoidler	27
4.1.6. Adipohemositler ve veriform hücreler.....	28
4.2. Deltametrin Konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın Toplam Hemosit Sayısına Etkileri	28
4.3. Deltametrinin <i>G. mellonella</i> 'nın Hemositlerinde Mikronükleus Oluşumuna Etkileri	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Hedef organizmaya göre pestisitlerin sınıflandırılması	2
Çizelge 3.1. <i>Galleria mellonella</i> yarı sentetik besini (Bronskill 1961)	20
Çizelge 3.2. Deney gruplarının besin içerikleri	21
Çizelge 4.1. Farklı deltametrin konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam hemosit sayısına etkileri.....	29
Çizelge 4.2. Farklı deltametrin konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam hemosit sayısına zamana bağlı etkileri	30
Çizelge 4.3. Farklı deltametrin konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın hemositlerinde mikronükleus oluşumuna etkileri.....	33
Çizelge 4.4. Farklı deltametrin konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın hemositlerindeki mikronükleus oluşumuna zaman bağlı etkileri	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Deltametrinin kimyasal yapısı (Arbjörk 2004).....	4
Şekil 3.1. Neubauer hemositometre lamı	23
Şekil 4.1. Prohemositlerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri	25
Şekil 4.2. Çeşitli şekillerde plazmatositlerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri	26
Şekil 4.3. Granülositlerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.....	26
Şekil 4.4. Sferülositlerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri	27
Şekil 4.5. Önositoidlerin ışık mikroskobu altındaki genel görüntüleri	27
Şekil 4.6. A-Veriform hücre, B-Adipohemosit'in ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	28
Şekil 4.7. Farklı deltametrin konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam hemosit sayısına etkileri	29
Şekil 4.8. Farklı deltametrin konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam hemosit sayısına zamana bağlı etkileri	31
Şekil 4.9. Mikronukleuslu hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	32
Şekil 4.10. Farklı deltametrin konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın hemositlerinde mikronükleus oluşumuna etkileri.....	33
Şekil 4.11. Farklı deltametrin konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın hemositlerindeki mikronükleus oluşumuna zaman bağlı etkileri	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

DDT	: Dikloro Difenol Trikloro ethan
DNA	: Deoksiribonükleikasit
EPA	: U.S. Environmental Protection Agency
g	: gram
L	: Litre
LC50	: Letal Konsatrasyon %50
ml	: mililitre
mm	: mimimetre
MN	: mikronukleus
ppm	: Milyonda bir birim
RNA	: Ribonükleikasit
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
THS	: Toplam hemosit sayısı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre

1. GİRİŞ

1.1. Çevresel Kirleticiler

Kirlilik ekosistemde, fiziksel sistemde ve canlılarda düzensizlik, kararsızlık, hasar ve bozulmaya neden olan kontaminantların çevredeki varlığı olarak tanımlanabilir. Kirlilik kimyasal maddeler, ses, sıcaklıktan veya ışıktan kaynaklanabilmektedir. Kirleticiler kirliliğin bileşenleridir ve yabancı maddeler olabildiği gibi doğada da olabilmektedir. Doğal kirleticiler doğal maddelerin çevrede aşırı miktarda bulunmalarından kaynaklanabilmektedir (Velasquez 2011).

Kimya endüstrisinin hızla gelişimi sonucunda günlük yaşantımızda, tarımda ve endüstride birçok kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddelerin faydaları yanında, çeşitli nedenlerle doğrudan maruz kalma ya da kullanımları sonucu çevreye yayılarak insanlara ve tüm ekosisteme zararları olabilmektedir.

Her yıl yüzlerce yeni kimyasal satışa sunulmakta ve neticede çevreye verilmektedir. Bu yeni ve eski kimyasal bileşiklerin çoğu biyosfer için toksik etkiye sahiptir. Özellikle pestisitler gibi çevreye büyük miktarda ve bilinçli olarak bırakılan kimyasallar kaygı vericidir. Pestisitler işlevleri gereği en azından biyosferin bir kısmı için toksik olmak zorundadır. Ancak bir bileşiğin çevresel toksisitesi çok daha geniş boyutlardadır ve bu devamlılık genel olarak ciddi bir kaygıya neden olmaktadır (Fernández-Alba vd. 2002).

Pestisitlerin tarım alanında yaygın kullanımı ekosisteme bol miktarda yayılmalarına neden olmaktadır (Mouchet vd. 2006).

1.2. Pestisitler

Geçmişten bu yana tarımsal uygulamalarda tarım ürünlerinin depolanması ve korunmasında, hayvancılıkta hayvanların parazitlere karşı korunmasında, çeşitli hastalık ve zararlılara karşı kimyasal ilaçların kullanılması, uygulanmasının kolay, pratik, ucuz ve etkili bir yöntem olması nedeniyle pestisit kullanımı sürekli olarak artmaktadır.

Pestisitler, genel olarak zararlılarla mücadelede kullanılan kimyasal ve biyolojik maddelerdir. Doğada kimyasal kirlenmeye neden olan bu maddeler, canlılar arasındaki besin zincirini yoluyla veya direkt kontaminasyon yolu ile insan sağlığını tehdit etmektedir (Ekebas ve ark., 2000).

Zirai mücadelede istenmeyen organizmaları yok etmek için kullanılan pestisitler doğada birikerek çevre kirliliğine neden olmakta, bunun yanında insanlar da dâhil tüm canlılarda akut ve kronik zehirlenmelere, sinir sisteminde tahribata, enzim faaliyetlerinde bozulmalara, hücre membran yapısında değişmelere neden olmaktadır. Ayrıca bu tür kimyasalların aşırı ve bilinçsiz kullanımı çevreye faydalı birçok türün yok olmasına veya zararlı populasyonlarında bağışıklık mekanizmasının gelişmesine neden olmaktadır (Çakır ve Yamanel, 2005).

1.2.1. Pestisitlerin Sınıflandırması

Pestisitlerin sınıflandırılması farklı şekillerde yapılabilmektedir. Bunlardan başlıcaları ve en çok kabul göreni hedef organizma grubuna göre yapılan sınıflandırmadır.

Çizelge 1.1 Hedef organizmaya göre pestisitlerin sınıflandırılması (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

Pestisit Türü	Etkilediği Canlı Grubu
İnsektisitler	Böcekler
Akarisitler	Akarlar
Nematisit	Nematodlar
Mollussit	Yumuşakçalar
Rodentisit	Kemirgenler
Avisit	Kuşları
Afisit	Yaprakbitleri
Fungisit	Mantarlar
Bakterisit	Bakteriler
Herbisit	Otlar
Algisit	Algler

1.3. İnektisitler

Zararlı böceklerle mücadelede 4 temel inektisit grubu yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar; (a) Organoklorinler (Organik Klorlular), (b) Piretroidler, (c) Karbamatlar ve (d) Organofosfatlar (Organik Fosforlular) olarak gruplandırılabilir (Ishaaya, 2000).

Kimyasal inektisitlerin hepsi nörotoksikan olup, hedef organizmaların sinir sistemlerine toksik etki gösterirler. Böceklerin merkezi sinir sistemleri (MSS) çok gelişmiş olup, memelilerinkine benzer. Aynı şekilde perifer sinir sistemleri (PSS) de benzerlik gösterir. Bu nedenle inektisitlerin toksik etki mekanizmaları ve hedef aldıkları organlar bütün türlerde aynıdır. Ancak bu toksik etki şiddetli dozla (maruziyet süresi ve düzeyi, biyotransformasyon hızı, absorpsiyon yoluna bağlı olarak) ilgilidir. Sinir sisteminde sodyum, potasyum, klorür iyonlarının membran iletimine etki ederek (organik klorlular, piretroidler gibi); spesifik enzimleri inhibe ederek; veya sinir uçlarındaki kimyasal nörotransmitterleri etkileyerek (organik fosforlular, karbamatlar gibi) etkilerini gösterirler (Vural 2005).

1.3.1. Piretroidler

İlk sentetik piretroidler olan alletrin ve sikletrin ilk kez 1949'da sentez edilmişlerdir. Bu ilk sentez ürünleri ışığa dayanıksız ve inektisit aktiviteleri doğal olanlara göre daha düşük olduğundan araştırmalara devam edilmiştir (Vural 2005). Piretroidler 1970'lerden itibaren hem tarımsal hem de kentsel alanlarda zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanılan bir sentetik inektisit sınıfıdır (Soderlund vd 2002).

Piretrum; krizantem (*Chrysanthemum cinerariifolium*) içeren inektisidal özütünden elde edilen toz, Piretrinler; piretrum özellikteki kimyasallar ve Piretroidler; kimyasal yapısı ve toksisite mekanizması piretrumla benzeyen sentetik kimyasallardır. Piretrum 6 adet piretrin esterinin karışımından oluşmaktadır. Bu esterler; piretrin I ve II, sinerin I ve II ve yasmoli I ve II'dir (Soderlund vd. 2002).

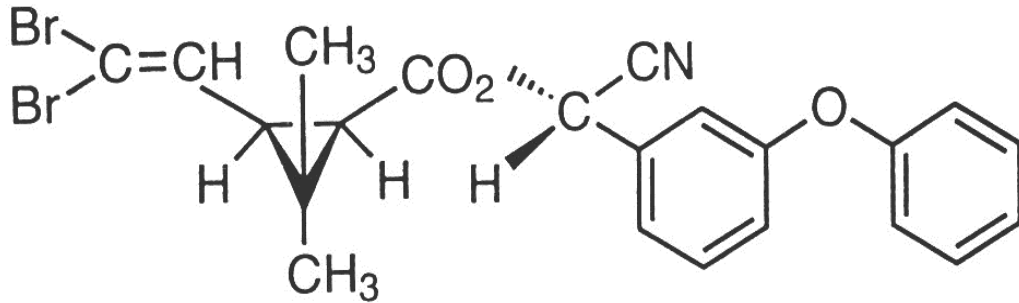
Piretrinlerin inektisit potansiyelleri antik Çin ve İran'da keşfedilmiştir. Piretrum su ve güneş ışığında kolay bir şekilde hidroliz ve fotolize uğradığı için kendiliğinden parçalanır ve hızlı bir şekilde bozular. Bu nedenle sentetik analogları olan piretroidler geliştirilmiştir. (Klaassen 2001).

Piretroid düşük konsantrasyonlarda bile oldukça etkili oldukları halde kuşlar ve memeliler için az toksik olduğu düşünülmektedir (Tuzmen vd 2008). Fakat son yıllarda piretroidlerin memeli mitokondrilerinde solunum zinciri enzimlerinin aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (El-Gohary vd 1999).

1.3.1.1. Deltametrin

Parazitlere karşı yüksek düzeyde etkinliğe sahip piretroidlerin bir üyesi olan Deltametrin [(S) - a - cyano - 3 - phenoxybenzyl- (1R) – cis - 3 - (2,2-dibromovinyl) - 2,2 -dimethylcyclopropane carboxylate] bu grubun genel özelliklerini taşıyan sentetik dibromo-piretroid yapısında çok etkili bir bileşik olarak tanımlanmaktadır. Deltametrin'in tarım, halk sağlığı koruma programları, çiftlik ve ev hayvanları başta olmak üzere geniş bir kullanım alanı vardır (Özkan ve Üstüner 2012).

Kimyasal Formülü: $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$



Şekil 1.1 Deltametrinin kimyasal yapısı (Arbjörk 2004)

Deltametrin tip II piretroiddir. Deltametrinin moleküler olarak çalışma şekli sodyum kanalı kinetiğinin modifikasyonunu sağlayarak sinir sisteminin aşırı uyarılmasına neden olmaktadır (Decourtye vd. 2004).

Deltametrin en aktif piretroid pestisitlerden biri olup geniş bir etkinlik alanına sahiptir. Deltametrin suda zor çözünür, ancak etanolde iyi bir şekilde çözünebilir. Deltametrin, yüksek molekül ağırlığına ve düşük uçuculuğa sahip lipofilik bir bileşiktir. Böceklerden büyük bir gruba temas ve mide yolu ile etki eden kuvvetli bir insektisittir.

Meyve sebze ve tarla bitkilerindeki birçok böceğe karşı kullanılmaktadır. Rezidüel etkisi oldukça yüksektir. Deltametrin ayrıca su ürünleri yetiştiriciliğinde dezenfektan olarak kullanılan bir antibiyotik türüdür. Dış parazit, mantarlarla (fungisit) mücadelede ve antiseptik amaçlarla da kullanılmaktadır (Kaymak 2011).

1.4. Böceklerde Bağışıklık Sistemi

Böcekler hastalık oluşturan mikroorganizmalara karşı genellikle kan hücrelerinin oluşturduğu ve hücreler olarak bilinen iki temel aktif bağışıklık sistemi geliştirirler. Bunlar hücresel humoral (antibakteriyal protein) ve bağışıklık olarak adlandırılır (Gupta 1985).

1.4.1. Böceklerde Humoral Bağışıklık

Humoral savunma sürecinde melanizasyon, hemolenfin pıhtılaşması ve antimikrobiyal peptidlerin sentezi olmak üzere üç tip reaksiyon gerçekleşmektedir (Vilmos ve Kurucz 1998).

Siyah pigment yani melanin oluşumunu serin proteazlarla aktif hale geçen fenoloksidaz enzimi ile gerçekleşir (Ashida ve Brey 1998). İnaktif bir proenzim olan profenoloksidaz hemositlerde sentezlenir ve hücrelerin patlamasıyla ortama salındıktan sonra kutikulaya gönderilir. Kutikulaya ulaşan enzim yara bölgesinin etrafında ya da enkapsüle olmuş bakterilerin etrafında toplanır. Aktif fenolik substratlardan kinonlar oluşturur ve kinonlar bu bölgelerde oligomerleşip melanin olarak birikirler (Vilmos ve Kurucz 1998). Birçok araştırmacı, fenoloksidazın böcek savunma sisteminde, pıhtılaşma ve yara iyileşme sürecinde mükemmel bir enzim olduğunu düşünmektedir (Gupta 1988).

Omurgalı ve omurgasız hayvanlar arasındaki en temel farklardan bir tanesi omurgalılarda kan ve lenfatik sıvılar kapalı damarlar içerisinde dolaşırken, omurgasızların bunun tersine açık bir sisteme sahip olmasıdır. Bu nedenle patojen bakterilerin vücut boşluğuna girip yayılmasını engellemek için omurgasızlarda hemolenfin pıhtılaşma mekanizması bulunur (Theopold vd. 2002). Böceklerde hemolenfin pıhtılaşmasında proteinlerin polimerizasyonu, hemositlerden salgılanan Ca^{2+}

bağımlı transglutaminaz tarafından katalizlenir (Bohn ve Barwing 1984). Bu mekanizmada ilk olarak hemositlerin degranülasyonu ile hücre dışı agregatların oluşmasını sağlar. Bu agregatlar yara bölgesini kaplayarak primer veya yumuşak pıhtı denen yapıyı oluşturur. İkinci olarak profenoloksidazın aktivasyon basamakları ve transglutaminaz ardışık olarak pıhtıda çapraz bağlar oluşmasını sağlar ve pıhtı kalınlaşır. Üçüncü olarak plazmatositler bu bölgeye çekilerek pıhtının etrafını sararlar ve kabuklaşarak vücut boşluğundan ayırırlar. Son olarak yara bölgesinde epidermin rejenerasyonu gerçekleşir ve kabuğun yerini alır (Theopold vd. 2004).

Böceklerde enfeksiyonlara karşı geliştirilen humoral reaksiyonların üçüncü tipi ise böcek vücudunda lizozomlar, sekropinler, attasinler, dipterin ve difensinler gibi antimikrobiyal peptidlerin sentezidir (Tunaz 2004, Schmidt 2001, Lavine ve Strand 2002). Bu sitotoksik moleküller temel olarak yağ dokuda sentezlenmektedir (Vilmos ve Kurucz 1998). Ancak yapılan çalışmalarda epidermis hücrelerinde, orta bağırsakta, tükrük bezlerinde, üreme sisteminde ve hemositlerde de sentezlendikleri gösterilmiştir (Kylsten vd. 1992, Lee ve Brey 1995, Rosetto vd. 1996, Russel ve Dunn, 1996, Gillespie vd. 1997).

Bu antibakteriyel peptitler ve proteinler omurgalıların ürettiği antikorların aksine çok sayıda bakteri türüne karşı etkilidir. Lizozomlar bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasındaki β 1-4 glikozit bağlarını hidrolize ederek etki gösterirler (Dunn 1986, Tunaz 2004).

Antibakteriyel proteinden oluşan sekropinler; küçük peptitler olup yaklaşık 33 amino asitten oluşur ve bakteri hücre zarını eritir. Sekropinler voltaj bağımlı iyon kanallarını oluşturan lipit membranlar ile etkileşerek hem Gram (-) hem de Gram (+) bakteriler üzerine etkilidirler (Tunaz 2004). Diğer önemli bir antibakteriyel protein olan attasinlerde büyük proteinler olup (yaklaşık moleküler ağırlığı 21-22 kDa) sadece Gram (-) organizmalara karşı antibakteriyel aktivite göstermektedirler ve dış membran proteinin sentezini inhibe ederek hücre bölünmesini etkilerler (Tunaz 2004). Dipterinler ve difensinler günümüze kadar çeşitli dipter türlerinden elde edilmiştir. Difensinler, attasinlerin tersine Gram (+) bakteriler üzerine etkilidirler ve sitoplazmik zarlar üzerinde etkili olup membran kanalları oluşumuyla hücrelerin lizisine neden olurlar (Rosetto vd. 1996, Tunaz 2004).

1.4.2. Böceklerde Hücresel Bağışıklık

Böceklerde ve açık dolaşım sistemine sahip diğer hayvanlarda, omurgalılarda olduğu gibi kan ve lenfatik sıvıların ayrımı olmadığından böcek dolaşım sıvısı hemolenf olarak adlandırılır. Hemolenf içerisinde serbest halde bulunan kan hücrelerine de hemosit adı verilir. Böceklerde humoral bağışıklığın yanı sıra hemositlerin morfolojik ve yapısal değişiklikleri sonucu hemosit aracılı gerçekleştirilen hücresel bağışıklık tepkileri de ortaya çıkmaktadır (Lavine ve Strand 2002, Strand 2008, Gupta 1985). Bunun yanında humoral ve hücresel bağışıklıkta rol alan hemositler ve humoral biomoleküller birbirinden bağımsız çalışmamaktadır. Birçok humoral faktör hemosit işlevlerini etkileyebildiği gibi, hemositlerde humoral moleküllerin sentezinde önemli yere sahiptir (Lavine ve Strand 2002, Ribeiro ve Brehelin 2006).

Hemosit bağımlı hücresel bağışıklık tepkileri ise fagositoz, enkapsülasyon ve nodül oluşumudur. Böcek hemositleri türden türe tip, sayı ve morfolojik olarak değişiklik gösterir ve tanımlanmalarını kolaylaştırmak amacıyla sınıflandırma şemaları literatürde mevcuttur (Lavine ve Strand 2002, Gupta 1985).

1.4.2.1. Böceklerde Hemosit Tipleri

Morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel karakterlerine göre Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Collembola gibi çeşitli takımlarda tanımlanan en temel hemosit tipleri prohemositler, granülositler, plazmatositler, sferülositler ve önositoidlerdir (Lavine ve Strand 2002, Ribeiro ve Brehelin 2006).

1.4.2.1.(a) Prohemositler

Prohemositler hemolenfte bulunan en küçük hücrelerdir. Yuvarlak, oval şekilde olup, büyüklükleri 4-12µm kadardır. Prohemositler plazmayı neredeyse tamamen dolduran, oldukça büyük bir çekirdeğe sahip olup, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve mitokondri gibi organelleri az olan hücre tipleridir. Sentioller ve aktif mikrotübüller

içerdiklerinden dolayı bunların aktif mitotik hücreler olduğu ve diğer hemosit tiplerinin öncüleri olduğu savunulmaktadır (Er 2011, Levin 2007, Gupta 1985). Prohemositlerin dolaşımdaki oranları böceğin fizyolojik ve gelişim durumuna göre değişiklik göstermektedir ve bu oran %5 i geçmez (Er 2011).

1.4.2.1.(b) Plazmatositler

Plazmatositler, hemositler içerisinde şekilleri en fazla değişiklik gösteren polimorf hücrelerdir. Yuvarlak, oval, yıldız veya mekik şeklinde olabilirler ve boyları 3µm'den 40 µm'ye kadar ulaşabilir. Çekirdekleri merkezde bulunur ve plazmatositin şekline göre yuvarlak, oval veya uzun olabilirler. Plazmatositler tek tek yada grup halinde bulunabilirler. Farklı böcek türlerinde dolaşımdaki sayıları toplam hemositlerin %30-60'ını oluştururlar. Yayma preparatlarda inkibasyondan birkaç dakika sonra cam üzerine yapışıp, yalancı ayaklar ile yayılabilme ve karakteristik ince ve uzun fibroblast benzeri özellikleriyle diğer hemosit tiplerinden kolayca ayrılırlar. Plazmatositler fagosite edilemeyecek kadar büyük yabancı cisimlerin, bakteri topluluklarının ve nekrotik melanize olmuş materyallerin etrafında kapsüller ve nodüller oluşturabilirler (Er 2011, Lavine ve Strand 2002, Gupta 1985).

1.4.2.1.(c) Granülositler

Granülositler genel olarak yuvarlak ve oval şekilli, büyüklükleri 4-45µm arasında değişen hücrelerdir. En karakteristik özellikleri stoplazmalarında membrana bağlı çok sayıda granül içermeleridir ve küçük bir çekirdeğe sahip olmalarıdır. Çekirdek yuvarlak veya uzamış merkezi yerleşimlidir. Farklı böcek türlerinde granülositlerin sayısı, toplam hemosit sayılarının %30-60'ını oluşturmaktadırlar. Granülositlerin, plazmatositler gibi yabancı yüzeylere yapışma özelliği vardır ve yara iyileştirme ile bağışıklık tepkilerinde çok önemli rolleri oldukları bilinmektedir (Chapman 1998, Gupta 1985, Rowley ve Ratcliffe, 1981). Granüllü hemositlerin en önemli özelliği fagositik özelliğe sahip olmalarıdır. Bu özelliklerinin yanısıra nodulasyon ve kapsül oluşumu sırasında yabancı cisimlerle ilk temas kuran ve granüler içeriğini dışarı veren hücreler oldukları da tespit edilmiştir. Birçok araştırmacı bu şekilde meydana gelen ekzositoz ile plazmatositlerin o

bölgeye çekilmesine yardımcı olduklarını düşünmektedirler. Böylece kapsül ve nodül oluşumunda plazmatositlere yardımcı olduğu düşünülmektedir (Ribeiro ve Brehelin 2006, Pech ve Strand 1996).

1.4.2.1.(d) Önositoidler

Önositoidler, çapları 54µm'yi bulan, genel olarak oval veya yuvarlak şekilli, küçük bir çekirdeğe ve oldukça kompleks bir stoplazmaya sahip olan ve hemositler içerisinde en büyük olan hücrelerdir. Transmisyon elektron mikroskobu görüntüsüne göre stoplazmalarında birçok serbest ribozom içerirler, ancak diğer tipik stoplazmik organelleri az gelişmiştir. (Gupta 1985, Uçkan ve Sak 2010). Önositoidler toplam hemosit sayısının %1-2'sini oluştururlar. Lepidopterlerde bağışıklık sisteminde ve yara iyileştirmede oldukça önemli rol oynayan hemolenfin koyulaşmasından (melanizasyon) sorumlu olan fenoloksidaz enzimi bu hemositlerde mevcuttur (Er 2011, Kanost vd. 2004, Ribeiro vd. 1996).

1.4.2.1.(e) Sferülositler

Sferülositler genellikle yuvarlak veya oval şekilli hücreler olup büyüklükleri 5-25 µm kadardır. Hareketsiz hücrelerdir ve çekirdekleri genellikle hücrenin merkezinde bulunmaktadır. Bu hücreler, içlerindeki küresel yapıları (sferüller) ile kolayca tanınmaktadırlar. Sitoplazmasında çok sayıda tanecik bulunması nedeniyle çekirdeğin ışık mikroskobunda ayırt edilmesi zordur. Sferüllerin histokimyasal analizleri mukopolisakkarit ve glikomukoprotein içerikte olduklarını gösterilmiştir (Gupta 1985). Sitoplazma aynı zamanda ribozomlar, golgi, lizozomlar, mitokondri ve endoplazmik retikulum içermektedir (Levin 2007). Sferülositlerin ipek üretimi, melanizasyon, fagositoz ve pıhtılaşmanın düzenlenmesinde görev aldıkları belirtilmekle beraber sferülositlerin bağışıklık sistemideki fonksiyonları henüz net değildir (Er 2011, Chapman 1998, Gupta 1985).

1.4.3. Hemosit Aracılı Bağışıklık Tepkileri

Böceklerde hücrel savunma mekanizmalarında hemositler görev almaktadır. Hemositler fagositoz, nodül oluşumu ve enkapsülasyon gibi bağışıklık tepkilerinde rol oynarlar. Bu hücrel savunma tepkilerinde rol alan hemositler plazmatositler ve granülositlerdir, önositoidler ise daha önce bahsedildiği gibi melanizasyonda rol alır (Levine 2007).

1.4.3.1. Fagositoz

Fagositoz böceklerde bakteri, mantar ve virüslere karşı hemositler tarafından oluşturulan temel bağışıklık tepkisidir (Lavine ve Strand 2002, Gupta 1985, Ribeiro ve Brehelin 2006). Plazmatositler ve granülositler fagositozdan sorumlu başlıca hemositlerdir (Lavine ve Strand 2002, Gupta 1985).

Fagositozun başlaması, organizmanın dışarıdan vücuda giren yabancı maddeyi algılaması ile başlar (Gillespie vd. 1997, Gupta 1985). Yabancı maddenin hemositler tarafından algılanması yabancı organizma üzerindeki peptidoglikan, lipopolisakkarit ve 1.3-glukanlar gibi yüzey moleküllerinin tanınması veya örnek tanıma proteinleri (opsoninler) adı verilen ve fagosite edilecek partikülü hücrel saldırı için işaretleyen proteinler yardımı ile gerçekleşmektedir (Lavine ve Strand 2002). Yabancı organizmanın tanınmasını takiben fagositoz basamakları organizmaya yapışma ile başlar ve organizmanın içeri alınması için sinyal iletimin başlaması, yabancı ayakların oluşumu, yabancı maddenin içeri alınması ve fagozom denilen veziküller içerisinde ayrıştırılması ile tamamlanır (Lavine ve Strand 2002). Daha sonra sindirim enzimleri içeren lizozomlar fagozomlarla birleşerek içeri alınan yabancı partikülleri parçalarlar (Bayne 1990).

1.4.3.2. Nodül Oluşumu

Nodüller, fazla sayıda yabancı partikülün etrafında bulunan, genellikle melanize olmuş nekrotik bir merkeze sahip olan hücre dışı pıhtı ve hemosit agregatlarıdır

(Rowley ve Ratcliffe 1981, Gupta 1985). Böceklerde nodüller yüksek konsantrasyonlarda cansız maddelere karşı olabildiği gibi bakteri, fungal sporlar, maya hücreleri ve prortozonlara karşı da oluşabilmektedir. Çeşitli böceklerle yapılan çalışmalarda nodül oluşumunun ilk aşamasının hemosit ve mikroorganizma kümeleri oluşumu olduğu tespit edilmiştir (Ratcliffe ve Gagen 1977). Daha sonra granüositler içinde bulunan granüller şişmeye başlar, hücre dışına göç ederler ve bakterilerin tutunmasını sağlayan yapışkan bir maddeyi hemolenfe bırakırlar. Bu durum bakteri ve hemositlerin hücre dışı matrikste gömülmesini sağlar. Nodül genişledikçe granüositler degranülasyona devam ederler ve nodül sıkılaştıkça yakalanmış bakterilerin etrafında melanin birikimi olur. Nodül oluşumu başlamasını takiben 2-4 saat sonra plazmatositler nodülün etrafında toplanmaya başlar. Nodül oluşumu yaklaşık 24 saatte tamamlanır ve nodüllerin etrafı yassılaştırmış plazmatositlerle çevrilmiş olup, bakteriler ve granüosit kalıntıları içeren melanize olmuş bir merkeze sahiptirler (Ratcliffe ve Gagen 1977, Levin 2007). Nodül oluşumunda rol alan temel hemositler granüositler ve plazmatositlerdir. Ancak bazı araştırmacılar melanizasyonda rol oynayan profenolksidaz içermesi nedeniyle önositoidlerin de nodül oluşumunda rol aldıklarını savunmaktadırlar (Chapman 1998, Götz ve Boman 1985).

1.4.3.3. Enkapsülasyon

Hemosit aracılı enkapsülasyon böcek hemositlerinin kendilerinden daha iri yapıdaki yabancı maddelere karşı oluşturdukları bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından biridir (Gupta 1985, Richards ve Edwards 2002, Tunaz 2004). Bu tepki yabancı patojenin kendinden olmayan olarak algılanması, bunun etrafında çok yoğun yassılaştırmış hemosit tabakalarının oluşması ve hemosit tabakalarında ki kısmi veya tam melanizasyon sonucu patojenin öldürülmesi şeklinde tarif edilmektedir (Schmidt vd. 2001).

Enkapsülasyon hemositlerin rastgele hareketlerle veya doğrudan kemotaksisle yabancı objeye temas kurmasıyla başlar ve daha sonra granüositler yabancı objeye tutunarak degranülasyon başlatılır. Degranülasyon sonucu granüositlerden salgılanan granüller yabancı maddeye ve diğer hemositlere tutunur ve diğer granüositler ve plazmatositler enkapsülasyonun olduğu bölgeye çekilir. Çekilen plazmatositler kapsül

etrafında yassı bir hücre tabakası oluşturur, hücreler arası boşluklar doldurulur ve ilk yapışan granüler hücreler parçalanarak kapsülün etrafı ince bir granülosit tabakasıyla kaplanmış olur. En son olarak da kapsül melanize olur (Lavine ve Strand 2002, Lackie 1981).

1.5. Mikronükleus Testi

Mikronükleus (MN) oluşumu ilk olarak Howell ve arkadaşları tarafından eritrositlerde saptanmış ve Jolly tarafından mikronükleus olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle Howell-Jolly cisimciği adı da verilmektedir (Üstüner 2011).

Mikronükleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında oluşan, ana çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından meydana gelen oluşumlardır. Mikronükleus oluşumuna neden olan kromozom kırıkları, kendiliğinden veya mutajenik ajanlar nedeniyle oluşabileceği gibi, iyonize radyasyon veya DNA hasarına neden olan kimyasallardan (insektisitler gibi) da kaynaklanabilmektedir (Topaktaş ve Rencüzoğulları 2010).

MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom anormalliklerinin göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Günümüzde, artan endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etmede MN testi pratik ve ucuz olması açısından diğer metotlara göre genotoksisite araştırmalarında sıkça tercih edilen bir metoddur. (Minisi vd. 1996).

Hücrelerde mikronükleus varlığı ışık mikroskobu aracılığı ile kolaylıkla belirlenebilmektedir. Hücre içindeki bir yapının MN olarak adlandırılabilmesi için belirlenen yapının ana nükleustan küçük olması, ana nükleusla temas halinde olmaması ve ana nükleusla aynı tonda boyanması gerekmektedir. (Venier vd. 1997).

1.6. *Galleria mellonella* Linnaeus, (1758) Büyük Balmumu Güvesi

Büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* L. larval evrede arı kovanlarında önemli tahribata yol açan zararlı bir türdür.

Sistematikteki Yeri

Alem	:Animalia
Şube	:Arthropoda
Familya	:Insecta
Takım	:Lepidoptera
Üst Familya	:Pyralidea
Alt Familya	:Galleriinae
Cins	: <i>Galleria</i> Fabricius (1798)
Tür	: <i>Galleria mellonella</i> (Linnaeus 1758)

Galleria mellonella larvaları, yumurtadan çıktıktan sonra larval olarak 8 evre geçirirler ve son iki evrede maksimum büyüklüğe ulaşırlar. Olgunlaşan son evre larvaları çevrelerine koza örerek pupa devresine geçerler. Pupalardan da ergin kelebekler oluşur. Yumurta, larva, pupa ve ergin kelebek devrelerine sahip olan bu türün hayat döngüsü yumurtadan ergin devreye kadar yaklaşık 6 haftadır. *G. mellonella*, sıcak bölgelerde arı kovanlarında ve zayıf kolonilerde yaşamak için iyi adapte olmuştur. Ergin güveler yumurtalarını kovanlarda bal arılarının ulaşamayacağı ahşap kısımlardaki çatlaklara bırakırlar. Genç larvalar petekler içinde oyuklar açarak bal ve petekler ile beslenirler. Yaşlı larvalar, ördükleri ağlar ile petekleri birbirine yapıştırarak tamamen yerler (Ali ve ark. 1973).

Galleria mellonella'nın da dahil olduğu bazı zararlı Lepidopter türlerini laboratuvarda yetiştirmek amacıyla ilk defa Haydak (1936) tarafından yapay besin ortamı geliştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda Bronskill (1961) tarafından kepek, petek, bal, gliserin ve su karışımından oluşan yapay besin ile böceğin laboratuvar şartlarında kitleler halinde üretilmesi sağlanmıştır (Özer 1961).

Galleria mellonella birçok fizyolojik, biyokimyasal ve immunolojik çalışmalarda kullanılan model bir böcektir (Dubovski vd. 2011, Emre vd. 2013). Fakat bu

Çalışmaların çoğunluğu fungal ve bakteriyal patojenlerin, ağır metallerin etkileri üzerine olmuştur. nemli bir çevresel kirletici olan insektisitlerin böceklerde immunolojik ve genotoksik etkileri ile ilgili çalışmalar son derece sınırlıdır. Bu nedenle çalışmamızda zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanılan bir insektisit olan deltametrinin immunolojik ve genotoksik etkileri model bir organizma olan *G. mellonella*'da araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Al Hariri ve Anjum (2001) *Schistocerca gregaria* Forsk. ile yapmış oldukları çalışmada deltametrin ve lambda siyalotrinin etkilerini incelemişlerdir. Ergin *Schistocerca gregaria* (çöl çekirgesin) da insektisit uygulamasından sonra ilk 30 dk. da çekirgelerin toplan hemosit sayısında (THS) artış, 60 dk. sonrasında ise THS da azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışmanın genel sonucunda THS’da önemli artış olduğu tespit edilmiştir.

Arnold ve Hinks (1976), *Euxoa declarata* (Lepidoptera)’da beş tip hemosit bulmuşlardır. Bunlar prohemositler, plazmatositler, granüllü hemositler, sferül hücreler ve önositoitlerdir. Granüllü hemositlerin ve sferül hücrelerin sıkça bölünen tek sınıf olmalarının, onların sayılarındaki devamlı artışı açıklamaya yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Prohemositlerin sıkça bölündüklerini fakat sayılarının önemli derecede artmadığını ve onların, nadir olarak kendi kendilerine bölünen fakat larval evre boyunca sayılarındaki artışı devam eden plazmatositlerden ayrı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Prohemositlerin 4. evre sonrası mitotik indeksleri düştüğünde plazmatositlerin büyüklüklerinin ve sayılarının arttığını görmüşlerdir. Önositoitlerin asla bölünmediğini gözlemlemişlerdir.

Ashhurst ve Richards (1964), *G. mellonella* (Lepidoptera) larvalarında kan hücrelerinin reaksiyonlarını ve özelliklerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, *G.mellonella* larvalarının hemolenfinde beş tip kan hücresinin bulunduğunu bildirmişler ve bunları prohemosit, adipohemosit, sferül hücre ve önositoit olarak isimlendirmişlerdir.

Beeman ve ark. (1983) *Plodia interpunctella* (Lepidoptera)’nın beşinci dönem larvalarının kan hücrelerinde yapmış oldukları araştırmalarda altı tip kan hücresi belirlemişlerdir. Bunları prohemosit, plazmatosit, granülosit, sferülosit, önositoit ve granülositofagus diye isimlendirmişlerdir. Araştırmacılar prohemositleri temel hücre olarak kabul etmişler ve plazmatositler ile prohemositler arasında birçok geçiş tipi hücreler gözlemişlerdir. Bu nedenle plazmatositlerin prohemositlerden meydana geldiğini aynı zamanda granülositlerin de plazmatositlerden meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Cai ve arkadaşları (2004) yılında yapmış oldukları bir çalışmada endoparazitoit *Pteromalus puparum* (L.) (Hymenoptera: Pteromalidae) tarafından parazitlenen *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae)'de zehir aktivitesinin sonucu olarak toplam hemosit sayısının azaldığını belirlemişlerdir.

Çalta ve Ural (2004) genç aynalı sazan balığı *Cyprinus carpio*'da sentetik piretroid olan deltametrinin akut toksik etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, yapmış oldukları çalışmada sazan balığı için 24, 48, 72 ve 96 saatlik periyotlar için kontrol ve yedi farklı doz (0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 16.00 µg/L) uygulaması ile LC₅₀ değerini (%95 güvenirlilikle), 24, 48, 72 ve 96 saat için sırasıyla 9.41 , 4.47 , 2.37 ve 1.65 µg/L olarak belirlemişlerdir.

George ve Ambrose (2004), *Rynocoris kumarii*'de monocrotophos, dimetioate, metilparathion ve quinalphosun toplam hemosit sayısını artırdığını göstermişlerdir.

Giulianini ve ark. (2003) *Cetonischema aeruginosa* (Coleoptera, Scarabaeidae) larvalarında 6 çeşit hemosit gözlemlemişlerdir. Bu hemositleri ışık ve taramalı elektron mikroskoplarında incelemişlerdir. Bu hemositler; prohemositler, granülositler, plazmatositler, koagülositler, önositoitler ve sferül hücrelerdir

Gupta (1985), böcek hemositlerini prohemosit, plazmatosit, granülosit, sferülosit, adipohemosit, önosit ve koagulosit (sitosit) olarak tanımlamıştır.

Gupta ve Sutherland (1968) yapmış oldukları çalışmada insektisit olan chlordan'ın sublethal dozlarına maruz bırakılan *Periplaneta americana* popülasyonunda toplam hemosit sayısının ve farklı hemosit sayılarının (plazmatosit, granülosit, koagulosit ve sferül hücre) arttığını bildirmişlerdir.16

Halawa vd. (2007), *Schistocera gregaria*'da toplam hemosit sayısının Chlorozan uygulaması sonucu %50 oranında, deltametrin uygulaması ile %18,3 oranında ve spinosad uygulaması ile %8,3 oranında azaldığını göstermiştir.

Jones (1970), böcek hemositleri üzerine yaptığı çalışmada böceklerde bulunan hemositleri prohemosit, plazmatosit, granülosit, sitosit, sferül hücreler, adipohemosit, podosit, önosit ve veriform hücreler şeklinde tanımlamıştır.

Köprücü vd. (2006), *Silurus glanis* (küçük Avrupa yayın balığı) için kontrol grubunu ve deltametrinin yedi farklı (0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 3, 4 µg/L) konsantrasyonunu 1, 24, 48, 72 ve 96 saat uygulayarak lethal dozun çeşitli aralıklarını incelemişlerdir. S.

glanis için LC₅₀ değeri her saat için sırasıyla 2.497, 1.446, 1.215, 0.866 ve 0.686 µg/L olarak belirlenmiştir.

Kumar ve arkadaşları (2002) yapmış oldukları çalışmada sarıhumma sivrisineğinin (*Aedes aegypti*) larvaları ve erişkinlerinin, deltametrin ve deltametrin ile bir kombinasyonu olan piperonil butoksidin sinerjistik etkisine karşı oluşturulan direnç potansiyelini incelemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada larva *A. aegypti* için deltametrinin LC₅₀ değerini 0,000118 ppm olarak bildirmişlerdir.

Li vd. (2011), Acetamiprid ve chlorphyrifosun *Pardosa asterigera*'da mikronükleus oluşumunu artırdığını göstermişlerdir.

Neuwirth (1973), *G. mellonella* larvalarının kan hücrelerini hem ışık, hem de elektron mikroskop ile çalışmıştır. Araştırmacı, larvaların son evresinden alınan örneklerini incelemiş ve bunlarda plazmatosit, granülosit, sferül hücre ve önositoit olmak üzere dört tip kan hücresi ayırt etmiş ve bunların histokimyasal özelliklerini incelemiştir.

Revankar ve Shyama (2009) organofosforlu insektisit olan monokrotofozun farklı konsantrasyonlarını, farklı zaman dilimlerinde Meretrix yumurtalarına uygulamışlardır. Doza bağlı olarak mikronükleus sayısında önemli artış olduğu belirlenmiştir.

Riberio ve Brehelin (2006), böceklerde hemosit sayı ve tiplerinin böceğin türüne ve gelişim evrelerine göre farklılıklar gösterdiğini belirtmiştir.

Richards ve Parkinson (2000) yapmış oldukları çalışmada *Pimpla hypocondriaca* (Retzius) (Hymenoptera: Ichneumonidae) zehirinin konak hemositleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu ve zehirin toplam hemosit sayısını azaltarak hemosit aracılı konak bağışıklık tepkilerini baskıladığı gösterilmiştir.

Saxena (1992), Lepidoptera takımından *Danaus chrysippus* (Nymphalidae), *Earias fabia* (Noctuidae) ve *Argina astrea* (Arctiidae) türlerinde ışık ve elektron mikroskobu kullanarak prohemositler, plazmatositler, granüllü hemositler, önositoitler, koagülositler, sferülositler ve adipohemositler olmak üzere yedi tip hemosit tanımlamıştır. Araştırmacı üç türde de hemositlerin esas şekil ve özelliklerinin benzer olduğunu bildirmiş, ama taramalı elektron mikroskobuyla (Scanning Electron Microscope = SEM) yaptığı çalışmada ise büyük farklılıklar gözlemlemiştir. Her üç türde de plazmatositlerin çok bol miktarda olduğunu saptamıştır.

Siu vd. (2008) polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), organoklorlu pestisitler (OC pestisit) ve klorlu bifenollerle (PCB)'de dahil olmak üzere organik kirleticilerle kirletilmiş olan sularda *Perna viridis*'in DNA ipliklerinde kırılmalara, oksidatif DNA hasarı ve mikronukleus (MN) oluşumlarını incelemiştir. İnceleme sonunda özellikle daha kirli bölgelerde MN oluşumunun bir bio-marker olarak etkili olduğu kanısına varmışlardır.

Teleb (2011) *Schistocerca gregaria*'ya bir çeşit insektisit olan nomoltun farklı dozlarını uygulayarak THS ve farklı hemosit sayıları üzerine etkisini incelemiştir. 1., 3. ve 5. Günlerde hem dişi hem de erkek bireylerde THS incelenmiştir. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, THS azaldığı sonucuna varılmıştır.

Uçkan ve Sak (2010) yapmış oldukları çalışmada pup parazitoidi olan *Pimpla turionella*'ya spermetrinin farklı doz uygulamasının ardından, hemositlerin mitoz, apoptozis ve mikronukleus değerleri incelenmiştir. Çalışma sonunda spermetrin uygulamasının doza bağlı olarak mitotik aktivitede azalmaya, apoptotik hücre sayısında artmaya ve mikronukleuslu hücre sayısında artmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

Yılayaz (2005) organofosforlu insektisit olan paratyon metilin *Barbus rajanurum* Mystaceus üzerindeki genotoksik etkisini incelemiştir. Paratyon metilin çeşitli dozlar (125, 150, 175, 200, 225 ppm) 96 saat süreyle hedef organizmaya uygulanmış ve sonuçta eritrositlerdeki mikronukleus (MN) frekansının en yüksek dozda en fazla olduğu tespit edilmiştir.

Zhu ve arkadaşları (2012) *Spodoptera litura* ile bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada hekzafloranın subletal dozlar (0.1, 0.5, ve 1.2 µg/ml) 3., 4., 5. ve 6. evre larvalarına uygulanmıştır. Hekzafloranın 5. Evre larvalarında 24 saat sonunda THS önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. 96 saatlik uygulamada subletal konsantrasyonların hemositlerde normal proliferasyonunun 24 saatlik uygulama ile aynı düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Deltamertin	[(S)-cyano-(3-phenoxyphenyl)-methyl] (1R,3R)-3-(2,2-dibromoethenyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane-1-carboxylate]	Hektaş
Dimetil sülfoksit	DMSO	Merck
Giemsa	Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat	KH ₂ PO ₄	Merck
Sodyum hidrojen fosfat	Na ₂ HPO ₄	Merck
Kristal viole		Merck
Asetik asit	CH ₃ COOH	Merck
Kalsiyum Klorür	CaCl ₂	Merck
Potasyum Klorür	KCl	Merck
Sodyum Klorür	NaCl	Merck
Etil Alkol	C ₂ H ₅ OH	Sigma
Metil Alkol	CH ₃ OH	Sigma

3.1.2. Cihazlar Ve Gereçler

Analitik Terazî	Ohaus
Farklı Ölçeklerde Otomatik Pipetler	Gilson
Vortex	LABART MVS-1
Etüv	Nüve EN 120
Saf Su Cihazı	Millipore Rios 8
Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı	Daihan Wisd MSH-20A
Mikroskop	Olympus CX21, Leica DM 750,
Neubauer Lamı	
Saf Su Cihazı	Millipore Rios 8
Otomatik pipetler	Ependof

3.1.3. Stok Kültürün Hazırlanması Ve Deney Böceklerinin Elde Edilmesi

Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemositleri üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan stok *G. mellonella* bireyleri 30 ± 2 °C ve $\%65\pm 5$ bağıl neme sahip, sürekli karanlık koşullara sahip laboratuvarında Bronskill (1961) tarafından geliştirilen ve Çizelge 3.1'de gösterilen besin ile yetiştirilen stok *G. mellonella* erginlerinin bıraktıkları yumurtaların aynı ortamda açılması ile oluşan larvalardan elde edildi.

Çizelge 3.1. *Galleria mellonella* yarı sentetik besini (Bronskill 1961)

Buğday kepeği	840 g
Bal mumu	51 g
Gliserin	320 ml
Bal	141 ml
Saf su	100 ml

3.1.4. Kontrol Grupları Ve Deltametrin İçeren Besinlerin Hazırlanması

Deneylerde yukarıda bahsedilen kontrol besinine Bronskill (1961), 100 gr besin içerisine 5, 20, 50, 100 ve 150 µg deltametrin ilave edilerek deney konsantrasyonları oluşturuldu. Deltametrinin [(S)-cyano-(3-phenoxyphenyl)-methyl] (1R,3R)-3-(2,2-dibromoethenyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane-1-carboxylate] (Hektaş % 96.4) su içerisinde çözünürlüğü sınırlı olduğu için dimetil sülfoksit (DMSO) çözücü kontrol olarak kullanıldı ve bu nedenle her tekrar için DMSO'nun etkilerinin ortaya çıkarılması için çözücü kontrol grubu hazırlandı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Deney gruplarının besin içerikleri

Besin bileşeni	Bal	Petek	Gliserin	Kepek	Saf su +DMSO	Deltametrin
Kontrol	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	-
Kontrol+DMSO	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	-
5µg deltametrin	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
20µg deltametrin	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
50µg deltametrin	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
100µg deltametrin	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
150µg deltametrin	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+

Deneyde kullanılan *G. mellonella* larvalarının beslenmesi için laboratuvar koşullarında besin hazırlandı. Deltametrin beslenme deneylerinde denenen konsantrasyonları µg /100 g besin olarak ifade edildi. 100 g besin için her kavanoza 58 g kepek, 3.5 g öğütülmüş petek, 22 g gliserin, 9.7 g süzme bal eklenerek karıştırıldı. Deltametrinin (% 96,4) suda çözünmesi zor olduğu için 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldükten sonra besinlere ilave edildi.

Her serinin her tekrarı için kavanozlara 20 şer böcek konuldu ve *G. mellonella* larvaları deltametrinin farklı miktarlarını içeren yapay besin ile 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca beslendi. Böcekler kısa inceleme periyodu hariç sürekli olarak karanlıkta tutuldu.

3.2. Yöntem

3.2.1. Böceklerin Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi

Galleri mellonella'da hemosit tiplerinin belirlenebilmesi amacıyla 150– 200 mg ağırlığında son evre larvaları kullanıldı. Hemolenf elde etme işlemi için larvalar -20 °C'de birkaç dakika bekletilerek hareketlerinin yavaşlaması sağlandı. Larvalar % 95'lik etanol ile silindikten sonra, larvalar birinci arka bacak üstünden, ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinip 5 µl hemolenf elde edildi. Hemolenf melanizasyona izin vermeden

hızlı bir şekilde daha önce alkolle temizlenmiş rodajlı lamalar üzerine alınarak yayıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Lamaların kurummasını takiben hemositlerin fiksasyonu için lamalar 5 dakika süre ile metanol içinde bekletildi ve metanol üzerlerinden akıtılarak kurumaya bırakıldı. Hemositlerin boyanabilmesi için taze olarak hazırlanan %5 lik Giemsa boyama çözeltisi kullanıldı.

Giemsa Boya çözeltisinin hazırlanabilmesi için, 5 ml Giemsa boya solüsyonu (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution), 5 ml KH_2PO_4 , 5 ml (Na_2HPO_4) karıştırıldı ve saf su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 10 dk bekletilerek kurutma kâğıdında süzüldü. Süzüntü şaleye alındı ve tespit işleminden sonra kurutulmuş lamalar Giemsa boyama çözeltisi içine alınarak boyanmaları sağlandı. Preparatlar Giemsa boya çözeltisi içinde 10 dakika bekletildikten sonra saf ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamalar entellan ile kapatılarak daimi preparatlar haline getirildi. Preparatlar Olympus CX21, Leica DM 750 ve Nikon Eclipse E 200 marka mikroskopta incelendi ve hemosit tipleri belirlenerek fotoğrafları çekildi.

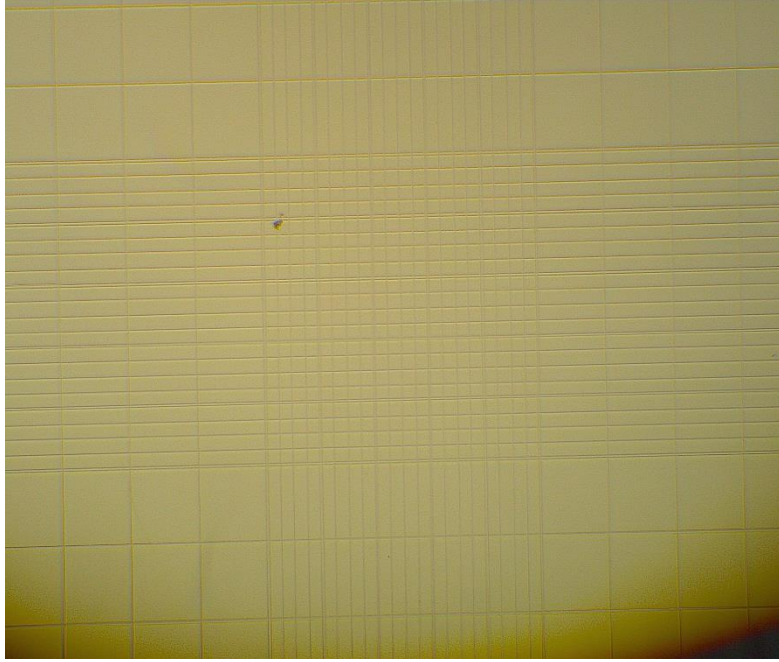
3.2.2. Toplam Hemosit Miktarının Tayini

G. mellonella'nın toplam hemosit sayılarının belirlenebilmesi için larvalar birinci arka bacak üzerinden ince uçlu iğneyle delindi ve 5 µl hemolenf buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 45 µl Tauber-Yeager çözeltisi (0.005 gr kristal viole, 0.12 ml asetik asit, 0.11 gr CaCl_2 , 0.15 gr KCl, ve 4.65 gr NaCl) bulunan ependorf tüplerine aktarıldı. 1: 10 oranında seyreltilmiş hücre süspansiyonu mikropipet yardımıyla birkaç kez çekilip bırakılmak suretiyle karıştırıldı ve hücre süspansiyonundan 10 µl mikropipet ile çekilerek 0,100 mm derinliğe sahip Neubauer hemositometresine (Improved Neubauer Hemocytometer; Superior, Germany) yüklendi. Hemositler Olympus CX21 marka mikroskobunda sayıldı.

3.2.3. Toplam Hemosit Miktarının Hesaplanması

Neubauer hemositometresi üzerinde iki farklı sayım alanı bulunan ve bu sayım alanlarının bir çukurlukla birbirinden ayrıldığı sayma lamasıdır. Her bir sayım alanında köşelerde dört tane 1 mm² 'lik bölümler (büyük kareler) bulunur. Bunlar 16 tane orta

büyükte kareye ayrılmıştır ($1/4 \times 1/4 = 1/16 \text{ mm}^2$). Ortada bulunan büyük kare ise 25 tane orta büyüklükte kareye ayrılmıştır. Orta büyüklükteki karelerin etrafı çift çizgi ile çevrilmiştir. Her bir orta kare de 16 küçük kareye bölünmüştür. Böylece, ortadaki alanda 25 tane orta kare, 400 tane küçük kare vardır. Bir küçük karenin alanı $1/20 \times 1/20 = 1/400 \text{ mm}^2$ 'dir. Sayım alanı dışında kalan kenarlar, sayım alanı yüzeyinden 0,1 mm yüksektir. Sayım alanı üzerine hemositometrenin lameli konulunca, lamel ile sayım alanı yüzeyi arasında 0,1 mm'lik bir boşluk kalır. Böylece lam ve lamel arasında kalan her karenin hacmi hesaplanabilir.



Şekil 3.1. Neubauer hemositometre lamı

Hesaplama işlemi aşağıdaki formüle göre yapılır.

En büyük (1mm^2 'lik) karenin hacmi = $1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3$ $0,1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml}$ 'dir.

Deney gruplarımızda hemositometre lamınındaki 1 mm^2 'lik büyük karenin tamamı sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi.

Mililitredeki toplam hemosit sayısının hesaplanması için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

Hücre sayısı / ml = Büyük karede sayılan hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x 10^4

3.2.4. Mikronükleus Sayılarının Belirlenmesi

Mikronükleus sayılarının belirlenmesi için giemsa ile boyanmış preparatlar Olympus CX21 marka mikroskoplar altında incelendi. İnceleme işleminde her bir konsantrasyonun her periyodunun her bir tekrarında 100'lük objektif altında 1000 hücre sayıldı ve mikronükleusa sahip hücre sayısı kaydedildi.

Mikronükleuslu hücrelerin belirlenmesinde Venier vd. (1997) tarafından gösterilmiş olan kriterler esas alındı. Buna göre nükleustan ayrı ve temas halinde olmayan, ana nükleustan küçük ve nükleusla aynı tonda boyanmış yapılar mikronükleus olarak değerlendirildi.

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Deneyler değişik zamanlarda üçer kez tekrar edildi. Bir deney serisinde elde edilen veriler kontrol, çözücü kontrol ve kendi aralarında karşılaştırılmak suretiyle ve zamana bağlı olarak değerlendirildi. Verilerin karşılaştırılmasında varyans analiz yöntemi, ortalamalar arası farkın önem kontrolünde ise Student Newman Keul's (SNK) testi, verilerin arasındaki ilişkinin ortaya konmasında Pearson korelasyonu analizi bilgisayarda SPSS 20.00 istatistik veri paketi kullanılarak uygulandı.

4. BULGULAR

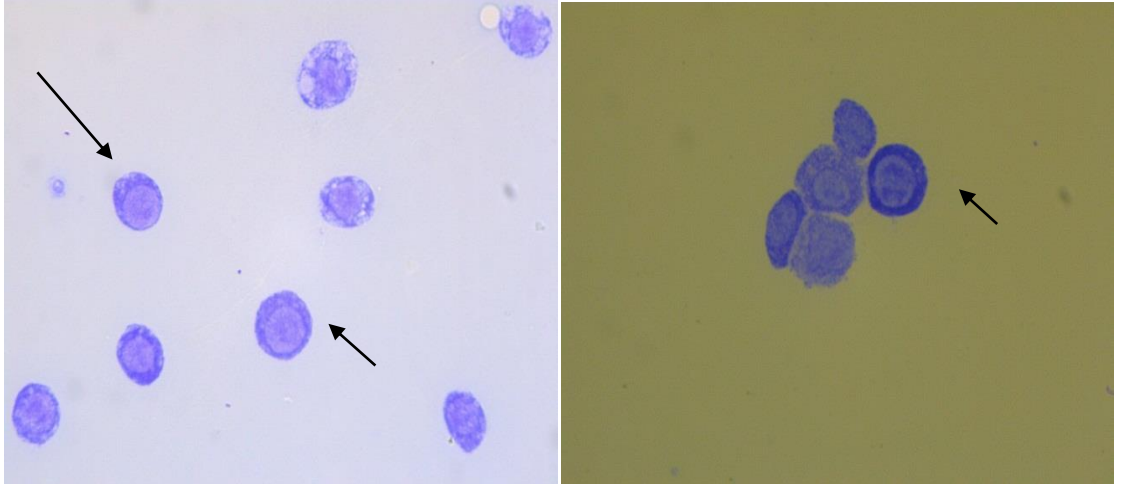
4.1. *Galleria mellonella*'da Hemosit Tipleri

Giemsa ile boyanarak hazırlanmış olan preparatların ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu hemosit tipleri belirlendi. Boyama sırasında hemositlerin çekirdeklerinin açık-koyu pembe, stoplazmalarının ise açık-koyu mavi-mor renkte boyandığı gözlemlendi.

Sunulan çalışmada *G. mellonella*'da hemositler morfolojik olarak incelendi ve larva hemolenfinde hemosit tiplerinin prohemositler, plazmatositler, granülositler, sferülositler, önositoidler, adipohemositler ve veriform hücreler olduğu belirlendi.

4.1.1. Prohemositler

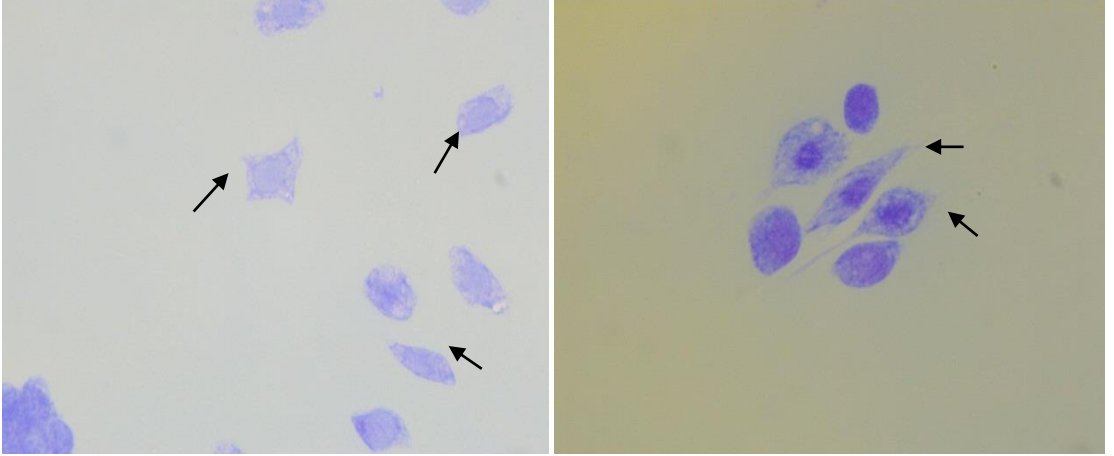
Prohemositler küçük, yuvarlak, oval veya elips şeklinde çeşitli büyüklükte hücreler olarak gözlemlendi. Plazma membranları genelde düz, hemen hemen hücreyi dolduran, merkeze yerleşmiş büyük bir çekirdeğe sahiptirler.



Şekil 4.1 Prohemositlerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri

4.1.2. Plazmatositler

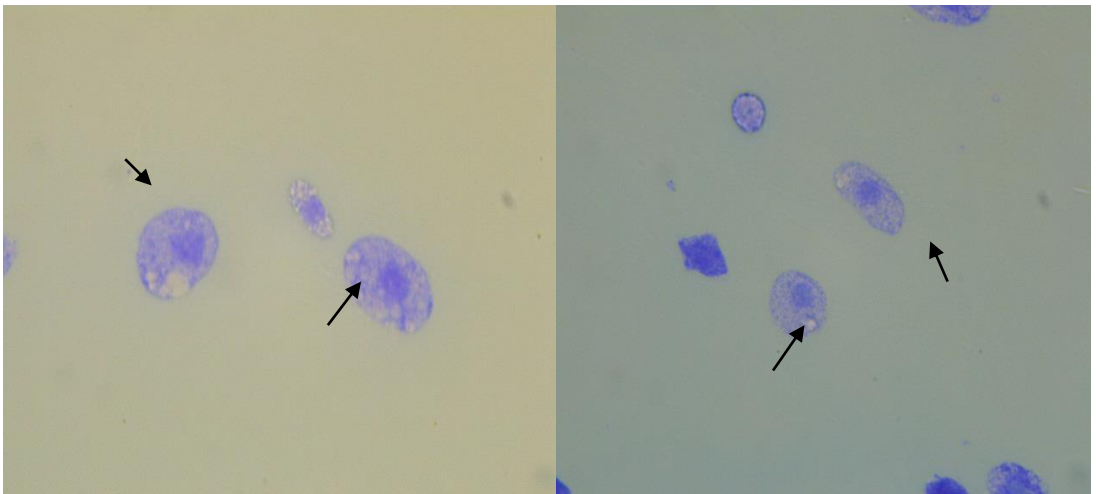
Plazmatositler farklı büyüklük gösteren çekirdekler genelde merkezi yerleşimli, yuvarlak veya uzamış durumda polimorf hücreler olarak gözlemlendi.



Şekil 4.2 Çeşitli şekillerde plazmatositlerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri

4.1.3. Granülositler

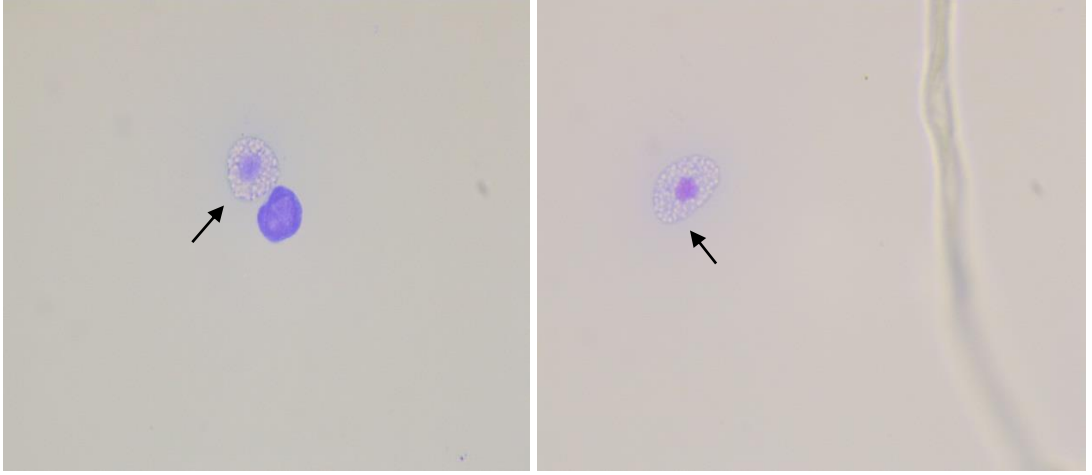
Granülositler sferik ya da oval biçiminde, çekirdekleri merkezi konumlu yuvarlak ya da ince uzun hücreler olarak gözlemlendi. Stoplazmalarında karakteristik olarak granüller yapı gözlemlendi.



Şekil 4.3 Granülositlerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri

4.1.4. Sferüositler

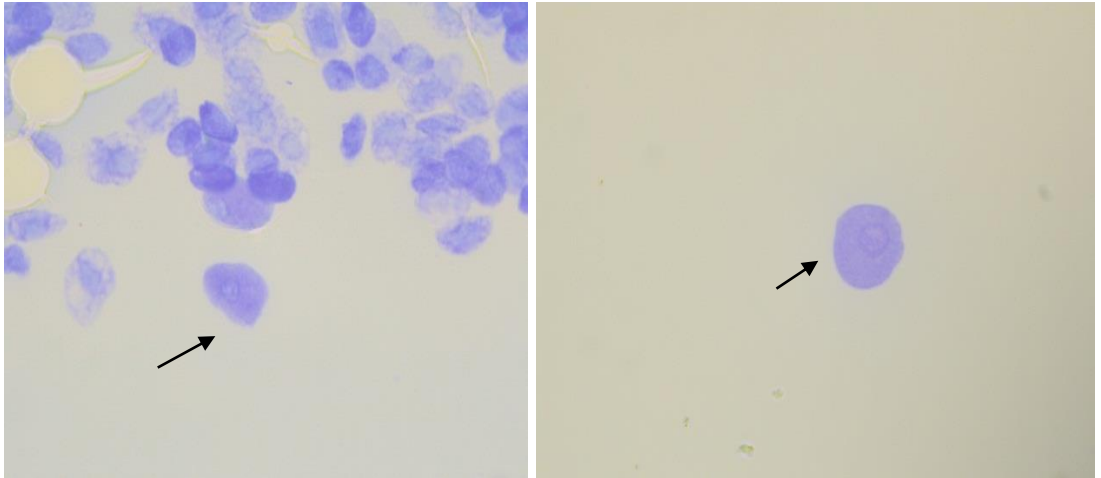
Sferüositler, yuvarlak veya oval yapılı, çekirdek merkezi veya merkeze yakın konumlu, genellikle granüositlerden daha büyüktürler şeklinde gözlemlendi. Sferüositlerin karakteristik özelliği çekirdek etrafında stoplazmalarını tamamen dolduran sferüller görüldü.



Şekil 4.4 Sferüositlerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri

4.1.5. Önositoidler

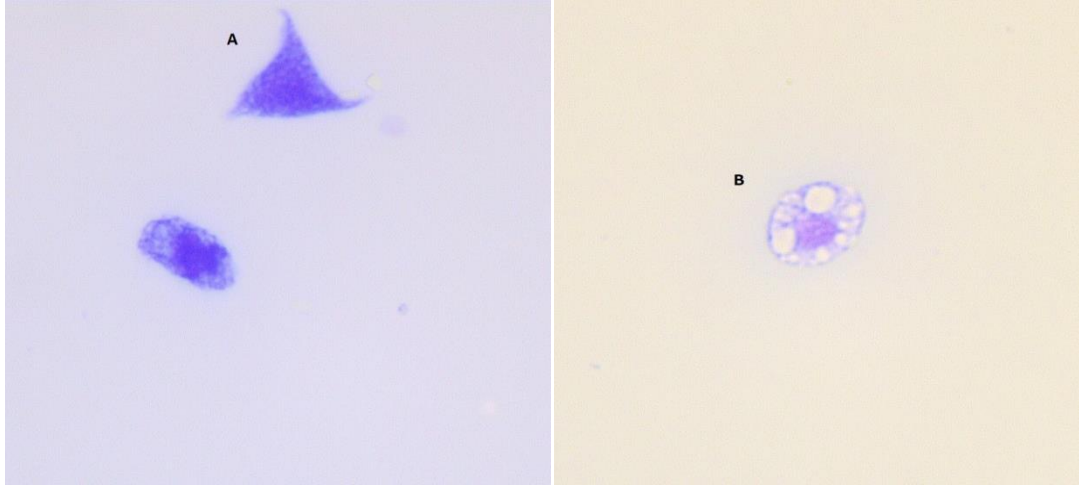
Önositoidler, genellikle yuvarlak ya da oval şekilli merkezi yerleşime sahip olmayan küçük, yuvarlak veya elips şeklinde çekirdekli, yoğun stoplazmalı hücreler şeklinde görüldü.



Şekil 4.5 Önositoidlerin ışık mikroskobu altındaki genel görüntüleri

4.1.6. Adipohemositler Ve Veriform Hücreler

Veriform hücreler değişken morfolojiye sahip, çeşitli büyüklüklerde hücreler olarak, adipohemositler ise granülosit benzeri, stoplazmasında boşluklar bulunan hücreler şeklinde gözlenmiştir.



Şekil 4.6 A-Veriform hücre, B-Adipohemosit'in ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

4.2. Deltametrin Konsantrasyonlarının *G. mellonella*' nın Toplam Hemosit Sayısına Etkileri

Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısına etkileri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.7' de gösterilmiştir.

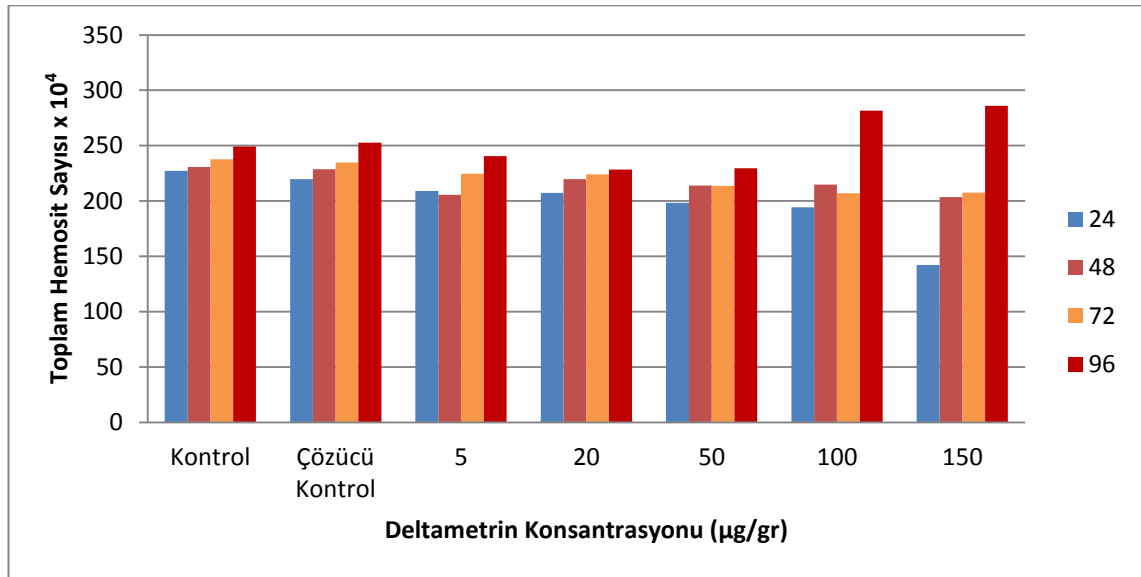
Yirmi dört saatlik deney periyodu sonunda kontrol grubunda 227.33×10^4 olan toplam hemosit sayısı denenen tüm konsantrasyonlarda ve çözücü kontrol grubunda kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır. Bu azalma konsantrasyon artışına paralel olarak gerçekleşmiş ve en yüksek konsantrasyon olan 150 μg da yaklaşık olarak % 39 azalarak 142.33×10^4 olarak gerçekleşmiştir.

Deney periyodunun 48. saatinde 5 μg , 50 μg , 100 μg ve 150 μg deltametrin içeren gruplarda kontrole göre önemli ölçüde azalırken, kontrol grubu ile çözücü kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir.

Çizelge 4.1 Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısına etkileri

	Toplam hemosit sayısı x 10 ⁴			
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	96 Saat
	(Ort±Std)	(Ort±Std)	(Ort±Std)	(Ort±Std)
Kontrol	227.33±3.71a	230.67±2.03a	237.67±3.38a	249.33±2.40bc
Çözücü Kontrol	219.67±1.76b	228.67±5.17a	234.67±2.40a	252.67±3.48b
5 µg	209.00±1.53c	205.67±2.96c	224.67±2.85b	240.67±2.40c
20 µg	207.33±3.71c	219.67±3.28ab	224.00±4.04b	228.33±3.38d
50 µg	198.33±0.88d	214.00±1.73bc	213.67±2.02c	229.67±4.05d
100 µg	194.33±1.20d	214.67±3.76bc	207.00±2.31c	281.67±1.76a
150 µg	142.33±2.96e	203.67±1.76c	207.67±0.67c	286.00±3.78a

*: a, b, c, d, e harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermek amacıyla kullanılmıştır. Aynı sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$) (Ort±Std): Üç tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.7 Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısına etkileri

Deney periyodunun 72. saatinde denenen tüm deltametrin konsantrasyonlarında toplam hemosit sayısı kontrol ve çözücü kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır. Kontrol grubunda 237.67×10^4 olan toplam hemosit sayısı en yüksek konsantrasyon olan 150 µg da %12 azalarak 207.67×10^4 olarak gerçekleşmiştir.

Kontrol grubunda 96. saatte 249.33×10^4 olan toplam hemosit sayısı çözücü kontrol grubunda artarak 252.67×10^4 olarak, en düşük konsantrasyon olan 5 µg deltametrin konsantrasyonunda ise azalarak 240.67×10^4 olarak gerçekleşmiştir. Fakat bahsi geçen gruplar ile kontrol grubu arasındaki bu artmalar ve azalmalar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Besinin 20 µg ve 50 µg deltametrin içermesi durumunda kontrole göre önemli ölçüde azalan toplam hemosit miktarı (228.33×10^4 ve 229.67×10^4) deltametrin konsantrasyonlarının fazla olduğu 100 µg ve 150 µg deltametrin konsantrasyonlarında kontrol ve denenen diğer gruplara oranla önemli ölçüde artarak 281.67×10^4 ve 286.00×10^4 olarak gerçekleşmiştir.

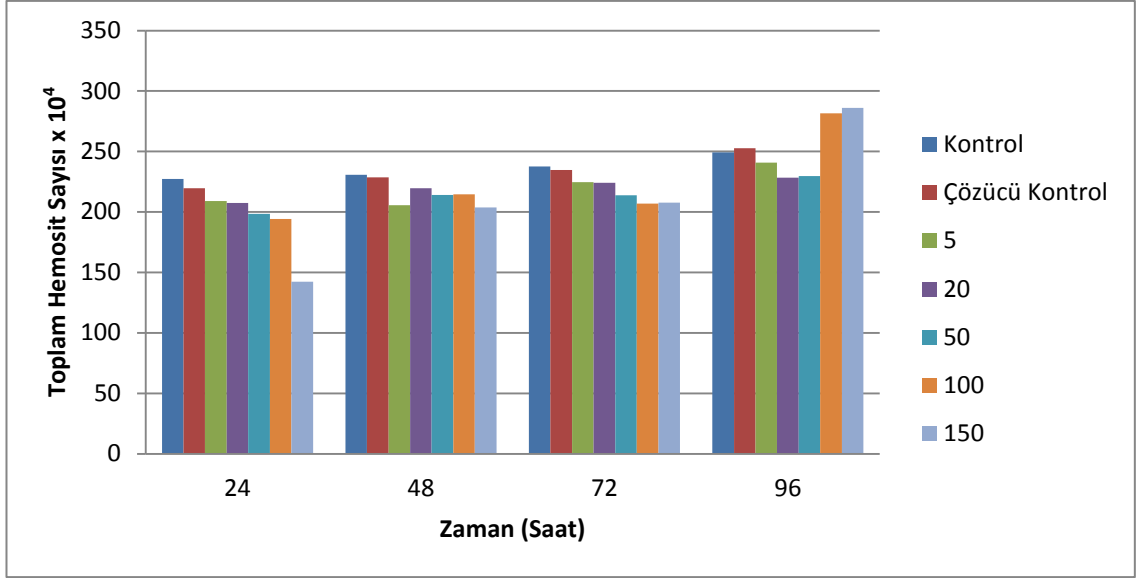
Farklı deltametrin konsantrasyonlarının uygulama süresine bağlı olarak *G. mellonella*'nın toplam hemosit miktarları üzerine olan etkileri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.8 de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda 24. saatte 227.33×10^4 olan toplam hemosit sayısı 48 ve 72. saatlerde artarak 230.67×10^4 ve 237.67×10^4 olarak gerçekleşmiş fakat bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Kontrol grubunda 96. saatte ise toplam hemosit sayısı önemli ölçüde artarak 249.33×10^4 olarak gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.2 Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısına zamana bağlı etkileri

Konsatrasyon	Toplam Hemosit Sayısı x 10 ⁴			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	227.33±3.71y	230.67±2.03y	237.67±3.38y	249.33±2.40x
Çözücü Kontrol	219.67±1.76z	228.67±5.17yz	234.67±2.40y	252.67±3.48x
5 µg	209.00±1.53z	205.67±2.96z	224.67±2.85y	240.67±2.40x
20 µg	207.33±3.71y	219.67±3.28x	224.00±4.04x	228.33±3.38x
50 µg	198.33±0.88z	214.00±1.73y	213.67±2.02y	229.67±4.05x
100 µg	194.33±1.20z	214.67±3.76y	207.00±2.31y	281.67±1.76x
150 µg	142.33±2.96z	203.67±1.76y	207.67±0.67y	286.00±3.78x

*: x, y, z harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermek amacıyla kullanılmıştır. Aynı satırdaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$) (Ort±Std): Üç tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.8 Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısına zamana bağlı etkileri

Çözücü kontrol grubunda toplam hemosit sayısı zamana bağlı olarak artmış fakat bu artış yalnızca 24 saat ile 72 ve 96. saatler arasında ve 48 ile 96. saatlerdeki veriler arasında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

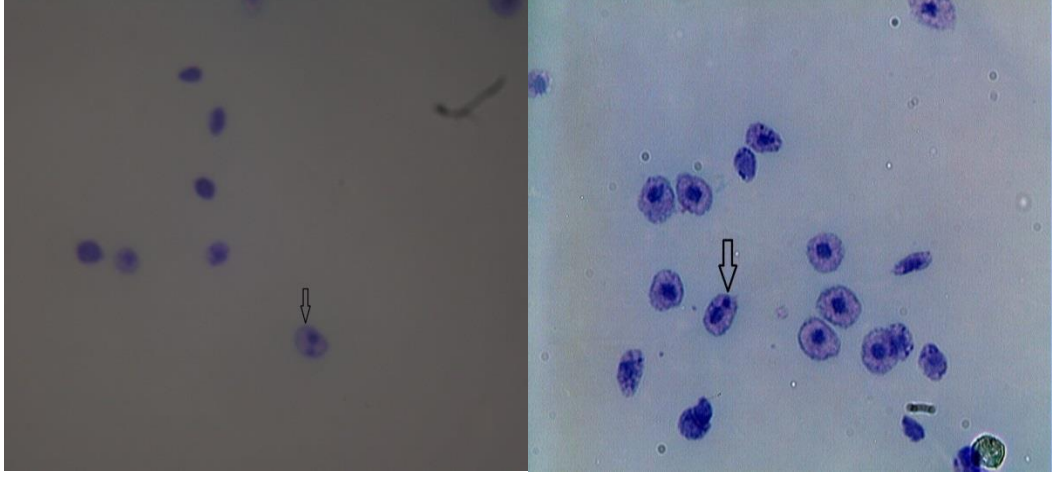
En düşük deltametrin konsantrasyonu olan 5 µg deltametrin içeren besinle beslenen böceklerde 72 ile 96. saatlerde 24 ve 48. saatlere göre toplam hemosit sayısı önemli ölçüde artmıştır.

Besinin 20 µg deltametrin içermesi durumunda 24. saatte 207.33×10^4 olan toplam hemosit sayısı daha sonraki günlerde önemli ölçüde artarak sırasıyla 219.67×10^4 , 224.00×10^4 ve 228.33×10^4 olarak gerçekleşmiştir.

Besinin 50 µg, 100 µg ve 150 µg deltametrin içermesi durumunda sırasıyla 24. saatte 198.33×10^4 , 194.33×10^4 ve 142.33×10^4 olan toplam hemosit sayısı maruz kalma süresine bağlı olarak önemli ölçüde artmış, 96. saatte ise yine 48. ve 72. saatlere göre önemli artışlar göstermiştir. 24 ve 96. Saatler arasındaki bu veriler incelendiğinde bahsi geçen iki gün arasındaki hemosit sayıları bakımından gözlenen artışlar 50 µg da yaklaşık olarak %16, 100 µg da yaklaşık olarak %45 ve en yüksek konsantrasyonda yaklaşık olarak %100 olarak gerçekleşmiştir.

4.3. Deltametrinin *G. mellonella*'nın Hemositlerinde Mikronükleus Oluşumuna Etkileri

G. mellonella'nın hemositlerindeki mikronükleuslu hücreler Şekil 4.9' da görülmektedir.



Şekil 4.9 Mikronükleuslu hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemositlerinde mikronükleus oluşumuna etkileri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.10 de verilmiştir.

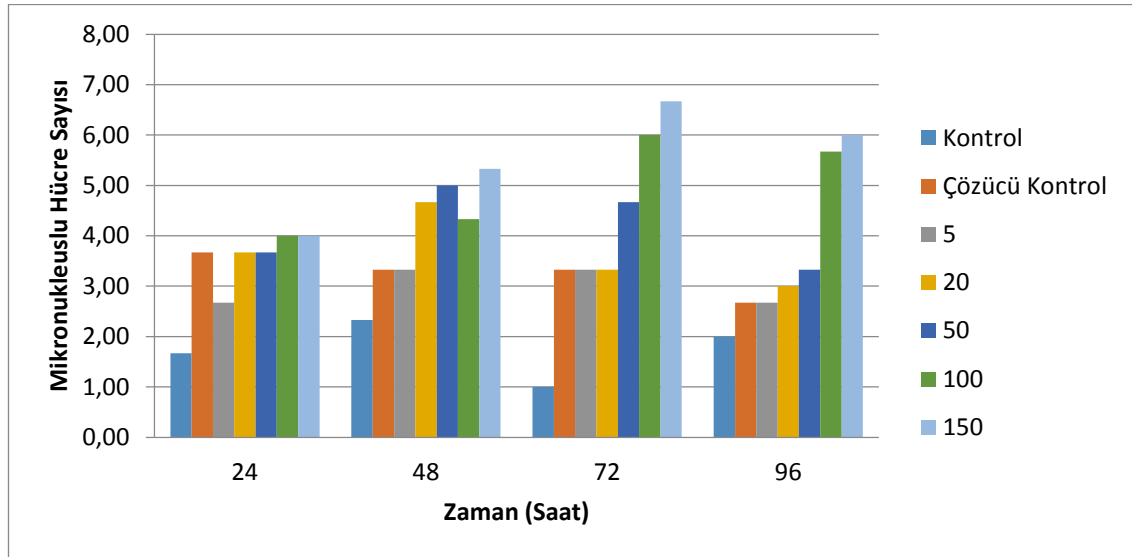
Deney periyodunun 24. saatinde kontrol grubunda 1.67 olan mikronükleuslu hücre sayısı çözücü kontrolde (DMSO) ve denenen tüm deltametrin konsantrasyonlarında artış göstermiştir. Bu artışlar yalnızca besinin en düşük konsantrasyon olan 5 µg deltametrin içermesi durumunda kontrole göre istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

48 saatlik veriler incelendiğinde besinin 50, 100 ve 150 µg deltametrin içermesi durumunda bununla beslenen böceklerde kontrol, çözücü kontrol ile 5 ve 20 µg deltametrin içeren besinle beslenen böceklere göre mikronükleuslu hücre sayılarında önemli artışların olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.3 Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemositlerinde mikronükleus oluşumuna etkileri

	Mikronukleuslu Hücre Sayısı ¥			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	1.67±0.33b	2.33±0.33c	1.00±0.00c	2.00±0.00b
Çözücü Kontrol	3.67±0.33a	3.33±0.33bc	3.33±0.33b	2.67±0.33b
5 µg	2.67±0.33ab	3.33±0.33bc	3.33±0.33b	2.67±0.33b
20 µg	3.67±0.33a	4.67±0.33bc	3.33±0.33b	3.00±0.58b
50 µg	3.67±0.67a	5.00±0.58a	4.67±0.33b	3.33±0.33b
100 µg	4.00±0.00a	4.33±0.33ab	6.00±0.58a	5.67±0.33a
150 µg	4.00±0.00a	5.33±0.33a	6.67±0.33a	6.00±0.00a

*: a, b, c harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermek amacıyla kullanılmıştır. Aynı sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$)
(Ort±Std): Üç tekrarın ortalaması±standart hata
¥: Her serinin her tekrarında 1000 hücre sayılmıştır



Şekil 4.10 Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemositlerinde mikronükleus oluşumuna etkileri

Deney periyodunun 72. saatinde kontrol grubunda 1.00 olan mikronükleuslu hücre sayısı çözücü kontrol grubunda ve deltametrin içeren diğer besinlerle beslenen gruptaki böceklerde önemli ölçüde artmıştır. Besinin 100 ve 150 µg deltametrin

içermesi durumunda mikronükleuslu hücre sayısı diğer deltametrin konsantrasyonlarına oranla önemli ölçüde artmış ve sırasıyla 6.00 ve 6.67 olarak gerçekleşmiştir.

Deney periyodununun 96. saatinde yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 150µg deltametrin) mikronükleuslu hücre sayısı önemli ölçüde artarak sırasıyla 5.67 ve 6.00 olarak gerçekleşmiştir.

Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemositlerindeki mikronükleus oluşumuna zaman bağlı etkileri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.11 de gösterilmiştir.

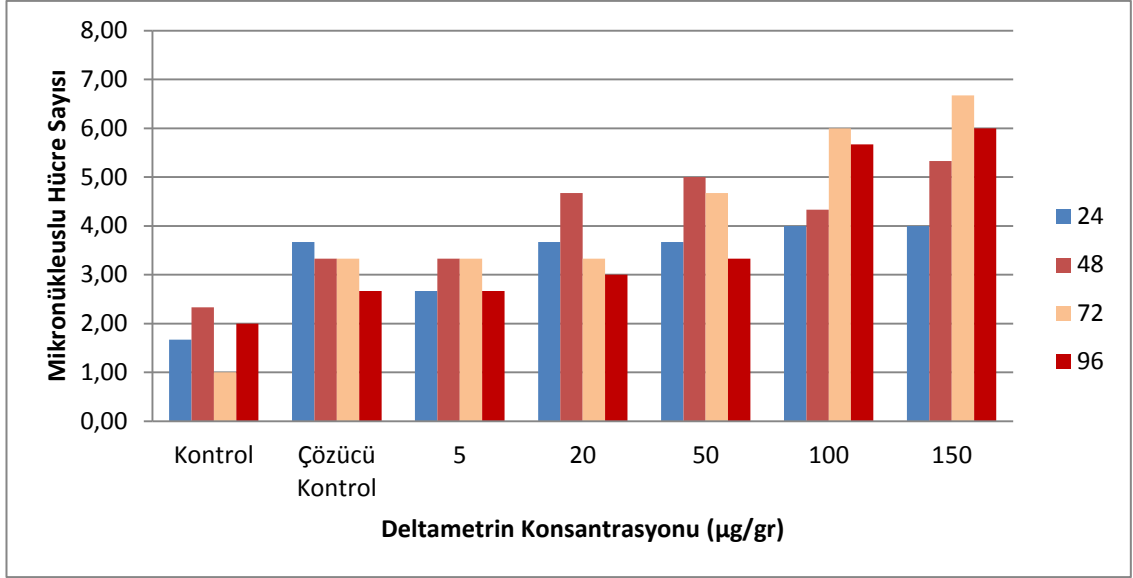
Çizelge 4.4 Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemositlerindeki mikronükleus oluşumuna zaman bağlı etkileri

Mikronukleuslu Hücre Sayısı ¥				
Deltametrin Oranı	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	1.67±0.33xy	2.33±0.33x	1.00±0.00y	2.00±0.00x
Çözücü Kontrol	3.67±0.33x	3.33±0.33x	3.33±0.33x	2.67±0.33x
5 µg	2.67±0.33x	3.33±0.33x	3.33±0.33x	2.67±0.33x
20 µg	3.67±0.33x	4.67±0.33x	3.33±0.33x	3.00±0.58x
50 µg	3.67±0.67x	5.00±0.58x	4.67±0.33x	3.33±0.33x
100 µg	4.00±0.00y	4.33±0.33y	6.00±0.58x	5.67±0.33x
150 µg	4.00±0.00z	5.33±0.33y	6.67±0.33x	6.00±0.00xy

*: x, y, z harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermek amacıyla kullanılmıştır. Aynı satırdaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$)

(Ort±Std): Üç tekrarın ortalaması±standart hata

¥: Her serinin her tekrarında 1000 hücre sayılmıştır



Şekil 4.11 Farklı deltametrin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın hemositlerindeki mikronükleus oluşumuna zaman bağlı etkileri

Kontrol grubunda 24. saatte 1.67 olan mikronükleuslu hücre sayısı 48 ve 96. Saatlerde artarak sırasıyla 2.33 ve 2.00 olarak gerçekleşmiştir. Yetmişikinci saatte ise 24. saate göre azalarak 1.00 olarak bulunmuştur. Fakat bu azalma istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Mikronükleuslu hücre sayısındaki bu artma ve azalmalar yalnızca 72. saat ile 48 ve 96. saatlerdeki veriler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Çözücü kontrol grubunda ve besinin 5, 20 ve 50 µg deltametrin içermesi durumunda *G. mellonella* hemositlerinde mikronükleus sayılarında zamana bağlı olarak önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

Besinin 100 µg deltametrin içermesi durumunda 24. saatte 4.00 olan mikronükleuslu hücre sayısı 48. saatte artarak 4.33 olmuştur. Fakat bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Deney periyodunun 72 ve 96. saatlerde mikronükleuslu hücre sayısı 24 ve 48. saatlere göre önemli ölçüde artarak sırasıyla 6.00 ve 5.67 olarak gerçekleşmiştir.

En yüksek konsantrasyon olan 150 µg deltametrin içeren besinle beslenen grupta 24. saatte 4.00 olan mikronükleuslu hücre sayısı ilerleyen günlerde önemli ölçüde artarak sırasıyla 5.33, 6.67 ve 6.00 olarak gerçekleşmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Böceklerde bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan hücresel bağışıklık tepkimeleri hemositler aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Böceklerde fagositoz, kapsül oluşumu, koagulasyon ve yaraların iyileştirilmesinde görev alan bu hemositlerin görevleri bir ölçüde bilinmekle beraber bunların oluşumu ve farklılaşması konusunda değişik görüşler ileri sürülmüştür (Demirsoy 2003). Bununla beraber hemositlerin oluşumları ve farklılaşması ile ilgili genel düşünce prohemositlerin ilk olarak plazmatositler şeklinde farklılaştığı, daha sonra dolaşıma giren plazmatositlerden diğer kan hücrelerinin oluştuğu şeklindedir (Strand 2008).

Böceklerde kan hücrelerinin sınıflandırılması ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Farklı böceklerde yapılan çalışmalarda bugüne kadar bu hücrelerin değişken yapılarından kaynaklanan ve değişik adlarda tanımlan 55 farklı hemosit tipi belirlenmiştir (Demirsoy 2003)

Böceklerin kan hücrelerinin sınıflandırılmasında bir çok araştırmacı tarafından kabul gören iki sınıflandırma Jones (1970) ve Gupta (1985) tarafından yapılan sınıflandırmalardır. Jones (1970) böcek hemositlerini prohemosit, plazmatosit, granülosit, sitosit, sferül hücreler, adipohemosit, podosit, önosit, ve veriform hücreler olarak adlandırmış, Gupta (1985) ise bunları ultrasütrüktürel yapılarını göz önüne alarak 7 ana tip altında toplamıştır. Bunlar prohemosit, plazmatosit, granülosit, sferülosit, adipohemosit, önosit ve koagulositlerdir (sitositler).

Sunulan çalışmada *G. mellonella*' da bulunan hemositler morfolojik olarak celenmiş ve prohemositler, plazmatositler, granülositler, sferülositler ve önositler olarak belirlenmiştir. Bunun yanında Jones (1970) çalışmasındakine benzer şekilde adipohemosit ve veriform hücreler olarak adlandırılabilen hücrelere de rastlamıştır (Şekil 4.9).

Benzer şekilde *G. mellonella* ile yapılan çalışmada temel hemosit tiplerinin prohemosit, plazmatosit, adipohemosit, sferül hücreler ve önositler olduğu gösterilmiştir (Ashhurst ve Richards 1964). Jones (1970) morfolojik yapılarının benzerliğinden dolayı prohemosit ve plazmatositleri plazmatositoit olarak adlandırmış, Neuwirth (1973) ise *G. mellonella*'da görülen ve daha önceleri adipohemosit olarak adlandırılan hücrelerin aslında granülositler olduğunu belirtmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda

morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel bakımdan Lepidopterlerdeki temel hemosit tiplerinin prohemositler, plazmatositler, granüositler, sferüositler ve önositler olduğu belirlenmiştir (Richards ve Edwards 1999, Lavine ve Strand 2002, Riberio ve Brehelin 2006).

Literatürlerde Jones (1970) tarafından yapılan sınıflandırmada belirttiği veriform hücreler ve adipohemositlere benzer hücreler çalışmamızda da görülmekle beraber (Şekil 4.9), bu hücrelerin daha sonra yapılan çalışmalara göre değişken yapısından dolayı plazmatosit ve granüosit olabileceği düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada elde edilen verilere göre *G. mellonella*'da belirlenen hücre tipleri, daha önce yapılan lepidopter türlerine ve *G. mellonella* ile ilgili çalışmalara benzerlik göstermektedir. Fakat hemosit tiplerinin belirlenmesi ile ilgili elektron mikroskobu ve faz kontrast mikroskobu gibi daha ayrıntılı inceleme yapılabilecek mikroskoplarla yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Böceklerde hemosit sayıları ve tipleri böceklerin türüne ve gelişme evrelerine göre farklılıklar göstermektedir (Riberio ve Brehelin 2006, Giglio vd. 2008). Bunun yanında daha önce yapılan çalışmalarda THS sayılarının ekzojen kaynaklı ksenobiyotiklerden (pestisitler, ağır metaller ve bakteriyal infeksiyonlar) ve fiziksel stresten (uçma, koşma vb.) etkilenerek değişebildikleri gösterilmiştir (Dubovskiy 2008, Ittrop vd. 2009, Adamo 2010, Mello vd. 2011).

Sunulan çalışmada *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısı (THS) deltametrinden önemli ölçüde etkilenmiştir. İlk 72 saatlik periyotta yüksek konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalma eğilimi göstermiştir. Mello vd. (2011), *Lihopenaesus vannaide* 'de permethrin etken maddeli Talcord ve pyrazosulfuron-ethyl etken maddeli Sirius'un etkilerini inceledikleri çalışmalarında Talcord'un THS'nı önemli ölçüde etkilemediği, Siriusun ise THS'nı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Halawa vd. (2007) bazı insektisitlerin çöl çekirgesi *Schistocera gregaria*'da THS etkilerini araştırdıkları çalışmalarında Chlorozan THS'nı kontrole göre %50 oranında, deltametrinin %18.3 oranında ve spinosad'ın %8.3 oranında azalttığı gösterilmiştir. Benzer sonuçlar George ve Ambrose (2004), Pandey vd. (2012), Sendi ve Salehi (2010) tarafından da gösterilmiştir. Araştırmacılar bu azalmanın insektisit doğrudan toksik etkisinden, endokrin bezlerin inhibisyonundan veya nodül oluşumu ve enkapsulasyon olaylarından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Sharma vd. 2003, Sabri ve Tariq

2004, Pandey vd. 2007). *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısındaki bu azalmaların yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı immun sistemindeki değişikliklerden kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında Al-Hariri ve Anjum (2001) çöl çekirgesi *Schistocera gregaria*'da THS'nın deltamethrin ve lambdacyalothrin'nin uygulamasının ardından arttığını, benzer şekilde atrazine ve hexachlorobenzen *Lymnaea palustris*'te (Russo ve Lagadic 2000), Hexaflumuron *Spodeoptera litura*'da (Zhu vd. 2012) ve monocrotophos, dimethoate, methylparathion ve quinalphos uygulamasından sonra *Rhynocoris kumarii*'de (George ve Ambrose 2004) toplam hemosit sayılarının arttığı gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar çalışmamızdaki 96. saatin sonunda yüksek deltametrin konsantrasyonlarında elde edilen verilerle paralellik göstermektedir. Toplam hemosit miktarı, denenen konsantrasyonların kendi içerisinde de zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Toplam hemosit sayısındaki bu artışlar artan pestisit konsantrasyonuna ve birikimine bağlı olarak hemosit detoksifikasyonuna karşı savunma reaksiyonu şeklinde yorumlanabilir (George, 1996).

Çalışmamızda deltametrinin çözdürüldüğü DMSO yağlar, karbohidratlar, boyalar, reçineler ve polimerlerin çözücüsü olarak kullanılmasının yanında birçok pestisid formülasyonuna çözücü amaçlı inert madde olarak da katılmaktadır (EPA 2006). Biyolojik sistemlerde OH ve hidroperoksil radikali (HOO.) oluşturarak protein oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna yol açan oksidan maddelere karşı DMSO, antioksidan özellik gösteren bir bileşiktir. Bunun yanında, içerdiği sülfidril grubu nedeniyle protein tiyollerin oksidasyonu yoluyla prooksidan özellik de gösterebilmektedir (Sanmartin-Suarez vd. 2011). Sunulan çalışmada DMSO yalnızca 24. saatte THS'nı kontrole göre azaltırken, zamana bağlı olarak THS'nı 72 ve 96. saatlerde artırmıştır. Gilot vd. (2002) sıçan ve fare hepatosit kültüründe DMSO' nun glutatyon-S-transferaz enzim (GST) ekspresyonunu artırarak apoptozu inhibe ettiğini belirtmiştir. Bu nedenle bu artma ve azalmaların DMSO'nun antioksidan ve aynı zamanda prooksidan özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Pestisitler canlı organizmalarda az ya da çok toksik etkiye sahip kimyasallardır. Bu kimyasalların yüksek dozlarda kullanımı kromozom anormalliklerine, DNA hasarlarına, kromozomlarda kırılmalara, mutasyonlara ve mikronükleus oluşumuna neden olmaktadır (Tosun vd. 2001).

Mikronükleus (MN) hücrelerde mitoz bölünmeler sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, kromozom hasarlarından kaynaklanan yapılardır. MN sayısındaki artış çeşitli ekzojen kaynaklı toksik, mutajenik ve karsinojenik maddelerin indirekt göstergesi olması bakımından önemlidir (Rencuzogullari ve Topaktaş 2000, Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Çalışmalar farklı türdeki kimyasalların canlılarda mikronükleus oluşumunu indüklediğini göstermektedir (Rencuzogullari ve Topaktaş 2000, Pinto-Silva vd 2003, Çelik vd. 2005, Uçkan ve Sak 2010).

Cypermethrin uygulanan *P. turionellae*'da doza bağlı olarak mikronükleuslu hücre sayısının arttığı gösterilmiştir (Uçkan ve Sak 2010). Benzer şekilde Li vd. (2011) acetamiprid ve chlorpyrifosun DNA hasarları üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada bu iki pestisit *Pardosa asterigera*'da mikronükleus oluşumunu artırdığını söylemişlerdir. Elde edilen veriler daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir, çalışmamızda özellikle yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 150 µg) mikronükleuslu hücre sayıları deltametrine maruz kalma süresine bağlı olarak önemli ölçüde artış göstermiştir. Sunulan çalışmada deltametrinin *G. mellonella* hemositlerinde mikronükleus oluşumunu önemli ölçüde arttırması deltametrinin *G. mellonella*'da genotoksik etkisini açıkça göstermektedir.

Çözücü kontrol olan DMSO 24 ve 72. saatlerde böcek hemositlerindeki mikronükleus sayısını arttırmıştır. Bu artışların DMSO'nun prooksidant özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. DMSO içeren grupta zamana bağlı olarak mikronükleus sayısında önemli bir değişiklik gözlenmemesi DMSO ya maruz kalma süresinin mikronükleus oluşumunda herhangi bir etkisinin olmadığını göstermesi bakımından ilgi çekicidir.

Çalışmamızda elde edilen bugular doğrultusunda zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanılan deltametrinin *G. mellonella*'nın toplam hemosit sayısını ve mikronükleus oluşumunu etkilediği görülmektedir. Toplam hemosit sayısındaki artışlar ve mikronükleus oluşumunun artması böceğin immün sisteminin deltametrinden etkilendiğini ve genotoksik olarak bu kimyasaldan zarar gördüğünün göstergesidir.

Hedef zararlıya yönelik olması gereken bu tür insektisitlerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı hedef dışı birçok böcek (parazitoid ve predatörler), balık ve hatta insanlarda bu tür olumsuz etkileri ortaya çıkarması muhtemeldir. Ancak bu konuda yapılacak daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ayrıca çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve immünolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan büyük mum güvesi *G. mellonella*'nın genotoksik çalışmalar içinde uygun olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Adamo, S.A., (2010). Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*), Brain Behavior and Immunity, 24: 194-200.
- Al-Hariri, M.K. and Anjum, S., (2001). Effect of lambda-cyhalothrin and deltamethrin on the haemocytes of Desert Locust, *Schistocerca gregaria* Forsk, International Journal of Agriculture and Biology, 3(1): 81-84.
- Ali, A.D., Bakry, N.M., Abdellatif, M.A. and El-Sawaf, S.K., (1973). The control of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L., by chemicals I. susceptibility of the Wax Moth Larvae and Honey-Bee Workers to Certain Chemicals. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 74: 170-177.
- Arbjörk, C., (2004). Effects of the insecticide Deltamethrin on benthic macroinvertebrates – field and laboratory studies, Master's thesis, Department of Environmental Assessment Swedish University of Agricultural Sciences, p 33.
- Arnold, J.W. and Hinks, C.F., (1976), Haemopoiesis in Lepidoptera. I. A note on the multiplication of spherule cells and granular haemocytes, Canadian Journal of Zoology, 61: 275–277.
- Ashida, M. and Brey, P.T., (1998). Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Molecular Mechanism of Immune Responses in Insects. Brey, P. T. and Hultmark, D. (Eds), Chapman and Hall, London, pp. 135–172.
- Ashhurst, D.E. and Richards, G., (1964). Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L., J. Morph., 114: 247- 254.
- Bayne, C.J., (1990). Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates, BioScience, 40: 723-731.
- Beeman, S.C., Wilson, M.E., Bulla, L.A., and Consigli, R.A., (1983). Structural characterization of the hemocytes of *Plodia interpunctella*, Journal of Morphology, 175: 1-16.
- Bohn, H. and Barwig, B., (1984). Hemolymph clotting in the cockroach *Leucophaea maderae* (Blattaria). Influence of ions and inhibitors; isolation of the plasma coagulogen, J. Comp. Physiol. B., 154: 457-467.

- Bronskill, J.K., (1961). A cage to simplify the rearing of greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae), Journal of Lepidoptera Society, 15(2): 102-104.
- Cai, J., Ye, G. and Hu, C., (2004). Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) effects of parasitization and venom on host hemocytes, Journal of Insect Physiology, 50 (4): 315-322.
- Çalta, M. ve Ural, M. Ş., (2004). Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to young Mirror Carp, *Cyprinus Carpio*, Fresenius Environmental Bulletin, Germany,13 (11a) 1179 – 1183.
- Çakır, Ş. ve Yamanel, Ş., (2005). Böceklerde insektisidlere direnç. Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi. Cilt 6 Sayı. 1 21-29.
- Çelik, A., Mazmanci, B., Çamlıca, Y., Aşkin, A. and Çömelekoğlu, Ü., (2005). Induction of micronuclei by lambda-cyhalothrin in Wistar rat bone marrow and gut epithelial cells, Mutagenesis, 20 (2): 125-129.
- Chapman, R.F., (1998). The Insects: Structure and Function, Cambridge University Press, Cambridge.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M. and Pham-Deleguea Minh-Ha, (2004). Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions, Ecotoxicology and Environmental Safety, 57: 410–419.
- Demirsoy, A., (2003). Yaşamın Temel Kuralları, Omurgasızlar/ Böcekler, Entomoloji. Cilt II/ Kısım II, II. Baskı, Meteksan Matbaacılık, Ankara, 119- 122.
- Dubovskiy, I.M., Grizanova, E.V., Ershova, N.S., Rantala, M.J. and Glupov, V.V.,(2011). The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*, Chemosphere, 85: 92-96.
- Dubovskiy, I.M., Krukova, N.A. and Glupov, V.V., (2008). Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis*, Journal of Invertebrate Pathology, 98: 360-362.
- Dunn, P.E., (1986). Biochemical aspects of insect immunology, Annual Review of Entomology, 31: 321-339.

- El-Gohary, M., Awara , W. M., Nassar, S., Hawas, S., (1999). Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor, *Toxicology*, 132: 1–8.
- Ekebas, S., Cakir, S., Ertugrul, O. and Kence, A., (2000). The detection of mutagenic activity of some chemicals (Azamethypos, Dichlorvos, Methyl parathion, Aflatoxin B1) by the SMART Test in *Drosophila melanogaster*, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 24, (6) 563-569.
- Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O. and Cogun, H.Y., (2013). Changes in antioxidative enyzme activity, glycogen, lipid, protein, and melondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae, *Entomological Society of America*, 106(3): 371-377.
- EPA, 2006. Inert Reassessments: One exemption from the requirement of a tolerance for dimethyl sulfoxide (CAS Reg. No. 67-68-5). United States Environmental Protection Agency, Washington, 19 s.
- Er, A., (2011). Endoparazitoit *Pimpla turionellea* (L.) (Hymenoptera; Ichneumonidae) zehiri ve parazitlemesinin konak hemositlerine etkileri, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
- Fernández-Alba, A. R., Hernando Guil, M.D., D'iaz López, G., Chisti, Y., (2002). Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays, *Analytica Chimica Acta*, 451:195–202.
- George, P. J. E., (1996). Impact of chosen insecticides on three non-target reduviid biocontrol agents (Insecta: Heteroptera: Reduviidae). PhD Thesis. Tirunelveli: Manonmaniam Sundaranar University, p. 117.
- George, P. J. E., and Ambrose, D. P., (2004). Impact of insecticides on the haemogram of *Rhynocoris kumarii* Ambrose and Livingstone (Hem., Reduviidae). Blackwell Verlag, *Journal of Applied Entomology*, 128(9/10): 600–604.
- Giglio, A., Battistella, S., Talarico, F.F., Brandmayr, T.Z., Giulianini, P.G., (2008). Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus* (*Chaetocarabus*) *lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge, *Micron*, 39: 552–558.

- Gillespie, J.P., Kanost, M.R. and Trenczek, T., (1997). Biological mediators of insect immunity, *Annual Review of Entomology*, 42: 611-643.
- Gilot D., Loyer P., Corlu A., Glaise D., Lagadic-Gossmann D., Atfi A., Morel F., Ichijo H., Guguen-Guillouzo C., (2002). Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione *S*-transferase regulation, *The Journal of Biological Chemistry*, 277, (51): 49220-49229.
- Giulianini, P. G., Bertolo, F., Battistella, S. and Amirante, G. A., (2003). Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids *in vivo* phagocytosis, *Tissue and Cell*, 35: 243-251.
- Götz, P. and Boman, H.G., (1985). Insect immunity. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 3, ed. Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I., Pergamon Press, Oxford, p 453-485.
- Gupta, A.P., (1988). *Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods*, Wiley, New York.
- Gupta, A. P., (1985). "Cellular Elements in the Hemolymph", In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, .G. A. Kerkut and L. I. Gilbert Eds. Pergamon Pres, New York, 3: 401-45.
- Gupta, A.P. and Sutherland, D.J., (1968). Effects of sublethal doses of chlordane on the hemocytes and midgut epithelium of *Periplaneta americana*, *Annals of the Entomological Society of America*, 61: 910-918.
- Güler, Ç., ve Çobanoğlu, Z., (1997). *Pestisitler, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No: 52*, Ankara.
- Halawa, S., Gaaboub, I., Gad, A.A., F El Aswad, A., (2007). Effect of some insecticides heamolymph of desert locust *Schistocera gregaria* Forskal, *J. The Egyptian Society of Toxicology*, 36: 61-66.
- Haydak, M.H., (1936). A food for Rearing Laboratory Insects, *J. Econ. Entolomol.*, 29, (5): pp. 1026.
- Ishaaya, I., (2000). *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 342p.

- Ittoop, G., George, K. C., George, R.M., Sobhana, K. S., Sanil, N. K. And Nisha, P. C. (2009). Effect of copper toxicity on the hemolymph factors of the Indian edible oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston), Indian J. Fish., 56(4) : 301-306.
- Jones, J.C., (1970). "Hematopoiesis In Insects," In: Regulation Of Hematopoiesis, (Ed: Gordon, A.S.), Appleton Press, New York, 7-65.
- Kanost, M.R., Jiang, H., and Yu, X.-Y., (2004). Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*, Immunological Reviews, 198: 97–105.
- Kaymak, G., (2011). Farklı dozlarda deltametrin ve cadmiyum uygulanan kılıçkuyruk (*Xiphophorus hellerii*) balıklarında oluşan oksidatif stres tayini, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul .
- Klaassen, C.D., (2001). (Ed.), 6th Edition, Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, McGraw-Hill, Medical Pub, 898p.
- Köprücü, S. S., Köprücü, K., Ural, M. S., (2006). Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to Fingerling European Catfish, *Silurus glanis* L, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 76: 59–65.
- Kylsten, P., Kimbrell, D.A., Daffre, S., Samakovlis, Ch. and Hulmark, D., (1992). The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster* different genes are expressed in midgut and salivary glands, Molecular and General Genetics, 232 (3): 335-343.
- Kumar, S., Thomas, A., Sahgal, A., Verma, A., Samuel, T., Pillai, M.K.K., (2002). Effect of the synergist, Piperonyl Butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 50: 1–8.
- Lavine, M.D. and Strand, M.R., (2002). Insect hemocytes and their role in immunity, Insect Biochem. Molec., 32:1295-1309.
- Lackie, A.M., (1981). Humoral mechanisms in the immune response of insects to larvae of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda), Parasite Immunology, 3: 201-208.
- Levin, D.M., (2007). An integrin required for the encapsulation immune response in the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae), PhD Thesis, Kansas State University, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas.

- Lee, W.J. and Brey, P.T., (1995). Isolation and characterization of the lysozyme encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*, *Gene*, 161: 199-203.
- Li, R., Li, S. and Liu, J., (2011). Studies of hemocytes DNA damage by two pesticides acetamiprid and chlorpyrifos in predaceous spiders of *Pardosa astrigera* Koch, *Acta Ecologia Sinica*, 31(11): 3156-3162.
- Mello, L.M., Junior, H.A., Garcia, S. and Vinatea, L., (2011). Acute toxicity of pyrazosulfuron-ethyl and permethrin to juvenile *Litopenaeus vannamei*, *Maringa*, 33(1):1-6.
- Minisi, S., Ciccotti, E., and Rizzoni, M., (1996). Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: A bioassay for the *in-Situ* detection of mutagenesis in freshwater. *Mutation Research*, 367pp. 245-251.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., (2006). Comparative Evaluation of Genotoxicity of Captan in Amphibian Larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) Using the Comet Assay and the Micronucleus Test. *Inc. Environmental Toxicology*, 21: 264–277.
- Neuwirth, M. (1973). The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Journal of Morphology*, 139: 105-124.
- Özer, M., (1961), Arı kovanlarında önemli zarar yapan balmumu güvesi *Galleria mellonella* L.'nin morfoloji, biyoloji ve yayılışı üzerine araştırmalar, *Bitki Koruma Bülteni*, 2(12): 26-36.
- Özkan, O. ve Üstüner, O., (2012). Investigations about genotoxicity of deltamethrin, *Kafkas Univ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18 (1): 69-74.
- Pandey, S., Pandey, J.P. and Tiwari, R.K., (2012). Effect of some botanicals on hemocytes and molting of *Papilio demoleus* larvae, *Journal of Entomology*, 9(1): 23-31.
- Pandey, J.P., Upadhyay, A.K. and Tiwari, R.K., (2007). Effects of some plant extracts on hemocyte count and moulting of *Danaus chrysippus* larvae, *Journal of Advanced Zoology*, 28: 14-20.
- Rencuzogullari, E., and Topaktas, M., (2000). Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with the mixtures of carbosulfan, ethyl carbamate and ethyl methanesulfonate, *Cytologia*, 65: 83-92.

- Sanmartin-Suarez C., Soto-Otero R., Sanchez-Sellero I., Mendez-Alvarez E., (2011). Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 63 (2): 209-215.
- Sendi, J.J. and Salehi, R., (2011). The effect of methoprene on total hemocyte counts and histopathology of hemocytes in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera). *Munis Entomology and Zoology*, 5(1): 240-248.
- Soderlund, D.M., J.M. Clark, L.P. Sheets, L.S. Mullin, V.J. Piccirillo, D. Sargent, J.T. Stevens, and M.L. Weiner., (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment, *Toxicology*, 171:3-59.
- Pech, L.L. and Strand, M.R., (1996). Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes, *Journal of Cell Science*, 109: 2053- 2060.
- Pinto-Silva, C.R.C., Ferreira, J.F., Costa, R.H.R., Filho, P.B., Creppy, E.E., and Matias, W.G., (2003). Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid, *Toxicol.*, 41: 93-97.
- Ratcliffe, N.A. and Gagen, S.J., (1977) Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*, *Tissue Cell*, 9: 73-85.
- Revankar, P.R., and Shyama, S.K., (2009). Genotoxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on an estuarine bivalve, *Meretrix ovum*, *Food and Chemical Toxicology*, 47 (7): 1618-1623.
- Ribeiro, C. and Brehelin, M., (2006). Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, 52: 417-429.
- Ribeiro, C., Simoes, N. and Brehelin. M., (1996). Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. *in vivo* and *in vitro* studies, *Journal of Insect Physiology*, 42: 815-822.
- Richards, E.H. and Edwards, J.P., (2002). Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation *in vivo*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 49:108–124.

- Richards, E.H. ve Edwards, J.P., (1999). Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) by the ectoparasitoid wasp, *Eulophus pennicornis*. effects of parasitization, venom and starvation on host haemocytes, Journal of Insect Physiology, 45: 1073-1083.
- Richards, E.H. ve Parkinson, N.M., (2000). Venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* adversely affects the morphology, viability, and immune function of hemocytes from larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*, Journal of Invertebrate Pathology, 76: 33-42.
- Rosetto, M., Manetti, A.G., Giordano, P.C., Marri, L., Amons, R., Baldari, C.T., Marchini, D., and Dallai, R., (1996). Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*, European Journal of Biochemistry, 241: 330-337.
- Rowley, A.F. and Ratcliffe, N.A., (1981). Insects, In: Invertebrate Blood Cells, ed. Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Vol 2, Academic Press, London, p 421-488.
- Russell, V.W. and Dunn, P.E., (1996). Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis, Journal of Insect Physiology, 42: 65-72.
- Russo, J. and Lagadic, L., (2000). Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail *Lymnaea palustris* (Gastropoda, Pulmonata). Cell Biology and Toxicology, 16: 15-30.
- Sabri, M.A. and Tariq, B., (2004). Toxicity of some insecticides on the haemocytes of red pumpkin beetle, *Aulacophora foveicollis* Lucas, Journal of Pakistan Entomology, 26: 109-114.
- Sharma, P.R., Sharma, B.P. and Saxena, B.P., (2003). Effects of neemgold on haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Fabr.) (Lepidoptera: Noctuidae), Current Science, 84: 690-695.
- Saxena, B. P., (1992). Comparative study of haemocytes of three lepidopterans by light and scanning electron microscopy, Acta Entomologica Bohemoslovenica, 89: 323-329.
- Schmidt, O., Theopold, U. and Strand, M., (2001). Innate immunity and its evasion and suppression by Hymenopteran endoparasitoids, BioEssays, 23: 344-351.

- Siu, S.Y.M., Lam, P.K., Martin, M., Cadwell, C.W., and Richardson, B.J., (2008). The use of selected genotoxicity assays in green-lipped mussels (*Perna viridis*): a validation study in Hong Kong coastal waters, *Marine Pollution Bulletin*, 57(6-12): 479-492.
- Strand, M.R., (2008). The insect cellular immune response, *Journal of Insect Science*, 15:1-14.
- Şekeroğlu V, Atlı-Şekeroğlu Z., (2011). Genotoksik Hasarın Belirlenmesinde Mikronükleus Testi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4): 241-52.
- Tauber, O.E. and Yeager, J.F., (1936). On the total hemolymph (blood) cell counts of insects. II Neuroptera, Coleoptera, lepidoptera, and Hymenoptera, *Annals of the Entomological Society of America*, 29: 112-118.
- Teleb, S.S., (2011). Effect of nomolt on differential and total haemocytes in the Desert Locust *Schistocerca gregaria* Forskal (Orthoptera: Acrididae), *Journal of American Science*, 7(11) :479-484.
- Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C. and Schmidt, O., (2002). The coagulation of insect hemolymph, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 363-672.
- Theopold, U., Schmidt, O., Söderhall, K. and Dushay, M.S., (2004). Coagulation in arthropods: defense, wound closer and healing, *Trends in Immunolgy*, 25: 289-294.
- Topaktaş, M., ve Rencüzoğulları, E., (2010). Sitogenetik, Nobel Yayınları, 2. Baskı. Pp. 176.
- Tosun, N., Karabay, N.Ü. and Sayım, F. (2001). Pesticide usage and their potential adverse impactso living organisms, *Anadolu Journal of Arı*, 11 (1): 113-125.
- Tunaz, H., (2004). Böceklerde Bağışıklık Mekanizması. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(2): 78-82.
- Tuzmen, N., Candan, N., Kaya, E. and Demiryas, N., (2008). Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver, *Cell Biochemistry and Function*, 26: 119–124.
- Uçkan, F. and Sak, O., (2010). Cytotoxic effect of cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larval hemocytes, *Ekoloji*, 19 (75): 20-26.
- Üstüner, D., (2011). Kromozom kırıkları ve mikronükleus-apoptoz bağlantısı. *Tubav Bilim Dergisi*, 4(1): 64-69.

- Velasquez, H., (2011). Air, water and soil pollution science and technology pollution control: Management, Technology and Regulations, Horatio R. Velasquez editor, by Nova Science Publishers, Inc. 161 pages.
- Venier, P., Maron, S. and Canova, S., (1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo(a)pyrene, *Mutation Research*, 390 (1-2): 33-44.
- Vilmos, P. and Kurucz, E., (1998). Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system, *Immunology Letters*, 62: 59-66.
- Vural N., (2005). Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:73 Ankara.
- Yılayaz, Ö., (2005). Parathion methyl (İnsektisit)'in *Barbus rajanorum mystaceus* (Heckel,1843) üzerindeki genotoksik etkisinin eritrosit mikronukleus testi ile belirlenmesi, Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları 2005, Elazığ.
- Zhu, Q., Yuan, He Y., Yao, J., Liu, Y., Tao, L., and Huang, Q., (2012). Effects of sublethal concentrations of the chitin synthesis inhibitor, hexaflumuron, on the development and hemolymph physiology of the cutworm, *Spodoptera litura*, *Journal of Insect Science*, 12 (27): 1-13.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Deniz Kurt

Doğum Yeri : Diyarbakır

Doğum Tarihi : 28.06.1978

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Lise : Malatya Atatürk Kız Lisesi

Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji

Yüksek Lisans : Adıyaman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji