

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**THİAMETHOXAM'IN *Galleria mellonella*' NİN BAZI
BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİLERİ**

MURAT ALTUN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADYAMAN, 2018

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

**THIAMETHOXAM'IN *Galleria mellonella*' NİN BAZI BİYOKİMYASAL
PARAMETRELERİNE ETKİLERİ**

Murat ALTUN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 04/09/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**Doç. Dr. Tamer KAYIŞ
Danışman**

**Doç. Dr. Mustafa COŞKUN
Üye**

**Doç. Dr. Mehmet ARSLAN
Üye**

**Prof. Dr. Refet KARADAĞ
Enstitü Müdürü**

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

THIAMETHOXAM'IN *Galleria mellonella*' NIN BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİLERİ

Murat ALTUN

Adıyaman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Tamer KAYIŞ
Yıl : 2018, Sayfa sayısı: 54

Jüri : Doç. Dr. Tamer KAYIŞ
Doç. Dr. Mustafa COŞKUN
Doç. Dr. Mehmet ARSLAN

Sunulan çalışmada thiamethoxamın subletal konsantrasyonlarının *Galleria mellonella*'da antioksidan enzimler (SOD: süperoksit dismutaz ve CAT: katalaz), lipid peroksidasyon düzeyi (malondialdehid miktarı), bazı biyokimyasal parametreler (protein, lipid ve karbohidrat) üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Thiamethoxamın denenen subletal dozları (10, 20, 30, 40 ve 50 µg) *G. mellonella* larvalarına enjekte edilmiş ve 24, 48, 72 ve 96 saat sürelerde etkileri araştırılmıştır. Thiamethoxam protein miktarını önemli ölçüde etkilememiştir. Fakat lipid ve karbohidrat miktarlarının önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur. Antioksidan enzim aktiviteleri (SOD ve CAT) önemli ölçüde azalırken, malondialdehid düzeyi önemli ölçüde artış göstermiştir.

Sonuç olarak thiamethoxam *G. mellonella*'da hemostatik ve oksidatif denge üzerine önemli etkilerde bulunmuş ve antioksidan enzim sisteminde ve enerji metabolizmasında değişikliklere neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*; Thiamethoxam; Antioksidan enzimler; Malondialdehit; Biyokimyasal parametreler

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECTS OF THIAMETHOXAM ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF *Galleria mellonella*

Murat ALTUN

Adiyaman University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Assoc.Prof. Dr. Tamer KAYIŞ
Year : 2018 , Number of pages: 54

Jury : Assoc.Prof. Dr. Tamer KAYIŞ
Assoc. Prof. Dr. Mustafa COŞKUN
Assoc. Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

In this study, effects of sublethal concentrations of thiamethoxam on antioxidant enzyme activities (SOD: superoxide dismutase and CAT: catalase), lipid peroxidation levels (malondialdehyde content), some biochemical parameters (total protein, total lipid, and total carbohydrate) of *Galleria mellonella* were investigated.

Sublethal doses of thiamethoxam (10, 20, 30, 40 and 50 µg) were injected into the *G. mellonella* larvae and the effects were investigated at 24, 48, 72 and 96 hour periods.

Thiamethoxam did not effect of protein content of *G. mellonella* . But it was caused significantly reduce lipid and carbohydrate contents when compared to the control. Antioxidant enzyme activities were significantly reduced and malondialdehyde content significantly increased after the imidacloprid injection.

Consequently, imidacloprid significantly effects on homeostatic and oxidative balance and it caused the changes antioxidant enzyme system, and energy metabolism of *G. mellonella*,

Key Words: *Galleria mellonella*; Thiamethoxam; Antioxidant enzymes; Malondialdehyde; Biochemical parameters

BEYAN

“THIAMETHOXAM’IN *Galleria mellonella*’ NİN BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİLERİ” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Murat ALTUN
imza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresi boyunca değerli bilgilerini, yardımlarını ve desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Tamer KAYIŞ'a,

Tez çalışmam sırasında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Adıyaman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mustafa ÇOŞKUN'a,

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Adıyaman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Yusuf SEVGİLER'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Ahmet GÜNAY'a ve Mehmet Sait YÜCEL'e,

Çalışmam süresince beni koşulsuz ve sabırla destekleyen Aileme, sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
BEYAN	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
RESİMLER DİZİNİ	X
SİMGE VE KISALTMALAR	X
1. GİRİŞ	1
1.1. İnsektisitler	2
1.1.1. Thiamethoxam	4
1.2. Serbest Radikaller	5
1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	6
1.4. <i>Galleria mellonella</i> (Linnaleus, 1758): Büyük Balmumu Güvesi	8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	16
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	17
3.1.3. <i>G. mellonella</i> Stok Kültürü ve Deney Böceklerinin Üretimi	17
3.1.4. Thiamethoxamın LD ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	18
3.1.5. Deney Gruplarının Oluşturulması	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Biyokimyasal Analizler İçin Süpernatantların Elde Edilmesi	20
3.2.2. Total Protein Miktarı Analizi	21
3.2.3. Total Karbohidrat Miktarı Analizi	21
3.2.4. Total Lipid Miktarı Analizi	22
3.2.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.2.6. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.2.7. Malondialdehid (MDA) Miktarının Belirlenmesi	23
3.2.8. Verilerin Analizi	23

4. BULGULAR	24
4.1. Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın Total Protein Miktarına Etkisi.....	24
4.2. Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın Total Lipid Miktarına Etkisi	26
4.3. Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın Total Karbohidrat Miktarına Etkisi	28
4.4. Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın SOD Enzim Aktivitesine Etkisi.....	30
4.5. Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın CAT Enzim Aktivitesine Etkisi	32
4.6. Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın MDA Miktarına Etkisi	34
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	42
KİŞİSEL BİLGİLER	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Thiamethoxamın bazı genel özellikleri	4
Çizelge 4.1 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın total protein miktarına	
konsantrasyona bağlı etkisi	24
Çizelge 4.2 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın total lipid miktarına konsantrasyona	
bağlı etkisi	26
Çizelge 4.3 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın total karbohidrat miktarına	
konsantrasyona bağlı etkisi	28
Çizelge 4.4 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın SOD enzim aktivitesine	
konsantrasyona bağlı etkisi	30
Çizelge 4.5 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın CAT enzim aktivitesine	
konsantrasyona bağlı etkisi	32
Çizelge 4.6 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın MDA miktarına konsantrasyona bağlı	
etkisi	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın total protein miktarına etkileri.....	25
Şekil 4.2 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın total lipid miktarına etkileri.....	27
Şekil 4.3 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın total karbohidrat miktarına etkileri....	29
Şekil 4.4 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın SOD enzim aktivitesine etkileri	31
Şekil 4.5 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın CAT enzim aktivitesine etkileri	33
Şekil 4.6 Thiamethoxamın <i>G. mellonella</i> 'nın MDA miktarına etkileri.....	35

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1 <i>Galleria mellonella</i> yaşam evreleri.....	8
Resim 3.1 <i>G. mellonella</i> stok kültürü	18
Resim 3.2 <i>G. mellonella</i> son evre (7. evre) larvaları	19
Resim 3.3 <i>G. mellonella</i> larvalarına thiamethoxam enjeksiyonu	20

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

H_2O_2	: Hidrojen peroksit
1O_2	: Singlet oksijen
O_2^-	: Süperoksit radikal anyonu
OH	: Hidroksil radikalleri
μL	: Miktolitre
μg	: Mikrogram
$^{\circ}C$: Santigrat derece

Kısaltmalar

AChE	: Asetilkolinesteraz
ACP	: Asit fosfataz
ALP	: Alkalın fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
APOX	: Askorbat peroksidaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
BSA	: Bovin serum albumin
CAT	: Katalaz
DDT	: Dikloro difenil trikloroethan
DDVP	: Dimethyl Dichloro-Vinyl Phosphate
DHAR	: Dehidroksiaskorbat peroksidaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
GABA	: Gama amimobutirikasit
GP _x	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutatyondan indirgenmiş glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon S transferaz
HSP	: Isı şok proteinleri
LC ₁₀	: Letal Konsantrasyon % 10
LC ₂₀	: Letal Konsantrasyon % 20
LC ₃₀	: Letal Konsantrasyon % 30
LC ₄₀	: Letal Konsantrasyon % 40
LC ₅₀	: Letal Konsantrasyon % 50
LD ₅₀	: Letal Konsantrasyon % 50
MDA	: Malondialdehid
nAChR	: Nikotinik asetilkolin reseptörleri
NBT	: Nitroblue tetrazolium

RFID	: Radyo frekanslı kimlik tanımlama
RNA	: Ribonükleik asit
RNS	: Reaktif nitrojen türevleri
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
SNK	: Student Newman Keul's
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TBA	: Tiyobarbiturik asit
TCA	: Trikloroasetik asit

1. GİRİŞ

Pestisitler tarım alanlarında ve depolama aşamasında tarımsal ürünlerin, evcil hayvanların ve yerleşim yerlerinin zararlılara karşı korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Pestisit kelime anlamı zararlıları öldüren olmakla birlikte, genel olarak zararlıları ortamdaki uzaklaştıran, popülasyon yoğunluğunu azaltan veya tamamen ortadan kaldıran doğal veya çeşitli kimyasal işlemlerle sentez edilebilen bileşikler bu şekilde anılmaktadır [1]. Doğal pestisitlerin kullanımı insanlık tarihi kadar eski olmakla birlikte özellikle XIX. yüzyıldan sonra teknoloji ve kimya endüstrisinin gelişimi ile birlikte sentetik pestisitlerin üretimi ve kullanımı son derece yaygın hale gelmiştir [2,3].

Pestisitler zararlı türlerle mücadelede etkin bir yöntem olması, kullanımının kolay ve ucuz olması nedeniyle mücadele açısından büyük bir kolaylık sağlamakla birlikte, kullanımının belirli bir standarta sahip olmaması, genel olarak kullanan kişilerin bu konuda yetkinliğinin olmaması nedeni ile ağır çevresel zararlara da neden olmaktadır. Pestisitler uygulandıkları alanlarda hedef canlılara karşı istenen etkiyi gösterirken, aynı alanda bulunan yararlı birçok canlı türü üzerine etki edebilmekte, dahası yağmur suyu ve akarsular aracılığı ile karasal ve sucul çevrelere de yayılım göstererek buradaki canlılar aracılığı ile ekosistem içerisinde geniş ölçüde yayılım gösterebilmektedirler [2,4].

Pestisitlerin kullanımında pestisit-hedef canlı ilişkisi üzerinde durulması gereken önemli bir konudur. Pestisitler etki ettikleri canlı gruplarına göre; insektisit (böcekler için), akarisit (akarlar için), mollusit (yumuşakçalar için), fungusit (mantarlar için) ve herbisit (zararlı otlar için) olarak sınıflandırılırlar [5]. Doğru pestisit doğru hedef için kullanılmadığında veya aşırı ve zamansız kullanıldığında (örneğin larvasidal etkili olan bir insektisit ergin böceklerle karşı kullanılması gibi) hedef dışı canlıların ortadan yok olmasına ve zararlı diğer türlerin bu pestisitlere karşı direnç geliştirmesine neden olabilir [4].

Pestisitlere karşı gelişen direnç ve yararlı türlerin yok olmasının yanında kullanılan bu pestisitlerin hedef dışı canlılar üzerindeki diğer etkileri de araştırılması gereken bir konudur. Çeşitli pestisit türlerinin, çeşitli canlılarda savunma sistemlerine

(antioksidan ve başışıklık), üremeye, genetik materyallere (DNA ve RNA) ve davranış üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir [6-10].

Bugüne kadar keşfedilmiş canlılar arasında böcekler sayı ve çeşitlilik bakımından en fazla üyeye sahip gruptur [11]. Bu kadar çeşitliliğe sahip olması bakımından böcekler âlemi içerdii zararlı tür sayısı bakımından da oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle insektisitler pestisitler içerisinde en yaygın olarak kullanılan pestisit grubudur [12].

1.1. İnektisitler

İnektisitler yaygın olarak tarımsal üretimde zararlı böceklerin tahrip edici etkisini azaltmak veya zararlıları tamamen ortadan kaldırmak için kullanılan pestisit türleri olmakla beraber, günümüzde tarımsal ürünlerin saklandığı depoların ve konutların, aynı zamanda evcil hayvanların da zararlı böceklerden korunması için de yaygın olarak kullanılmaktadır [13].

Formulasyonunu oluşturan etken maddeye göre insektisitler; organoklorlular, organofosfatlılar, karbamatlar, piretroidler ve neonikotinoidler olarak beş grup altında sınıflandırılabilirler [14].

Organoklorlu insektisitler, sinir hücre zarında pozitif yüklü iyon hareketlerini inhibe ederler ve nöronların hareketlerini engelleyerek, nöronlarda ve dolayısıyla merkezi sinir sisteminde aşırı uyarılmalara neden olur. Bu gruba ait insektisitlerin en bilineni dikloro difenil trikloroethan (DDT) olmakla birlikte, aldrin ve dieldrin de bu grubun yaygın olarak kullanılmış üyeleridir [15-17].

Organofosfat grubu insektisitler ise önemli birer asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörü olup, enzim inhibisyonuna bağlı olarak sinir uçlarında asetilkolin birikimine neden olarak sinaptik iletimin engellenmesine yol açar. Sonuçta sinaptik iletim gerçekleşmez. En önemli üyeleri arasında malation, paration ve diazinon sayılabilir [15-17].

Karbamat grubu insektisitlerde organofosfat grubu insektisitler gibi asetilkolinesteraz enzimini üzerine etkilidirler. Merkezi sinir sisteminin aşırı uyarılmasına neden olarak impuls iletimini engellerler [15-17].

Piretroit insektisitler, papatyagillerden krizantem olarak adlandırılan bitkiden elde edilen ve piretrum adı verilen doğal insektisidal aktivitesine sahip madde ile benzerlik gösteren sentetik kimyasallardır. Sodyum kanalları üzerine etkilerini membranı depolarize edip Na^+ akımını arttırarak gerçekleştirirler. Tip I ve Tip II olarak iki gruba ayrılan piretroitler sırasıyla, sodyum kanallarının milisaniyelik bir zaman aralığından saniyeler kadar uzun sürebilecek bir zaman aralığına kadar açık kalmasına sebep olur ve bu nedenle kontrolsüz iyon geçişleri ve aşırı depolarizasyona neden olurlar [18-19]. Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar pyretroidlerin kalsiyum kanalları ve beyindeki GABA kapılı klorür kanalları üzerine de etkili oldukları gösterilmiştir [20]. Sipermetrin ve deltametrin gibi üyeleri bu grupta yaygın olarak bilinen insektisit formülasyonlarıdır.

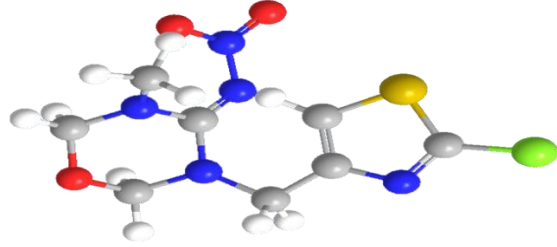
Organofosfat ve organoklorlu insektisitlerin uzun zamandan bu yana kullanılması ve buna bağlı olarak ortaya çıkan dezavantajları, gelişmiş ülkelerde bu tip insektisitlerin kullanımına sınır getirilmesine neden olmuştur. Neonikotinoid grubu insektisitler ilk kez 1970 yılında kurşun metali ile ilgili yapılan çalışmalar esnasında tesadüfi olarak keşfedilmiştir. Daha sonra kurşun bileşiklerinden ilk olarak sentezlenen pestisit nitiazini imidakloprid takip etmiş ve 1990'lı yıllardan sonra yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [21,22]. Organoklorlu ve organofosfat grubu insektisitlere göre hedef dışı canlılara karşı düşük toksisite göstermesi, hedef canlılara karşı selektif özelliğinden dolayı son yıllarda tercih sebebi olmuşlardır [23,24]. Bu grup insektisitler merkezi sinir sistemindeki nikotinic asetilkolin reseptörleri (nAChR) üzerine yüksek afinite gösterirler ve nikotine benzer bir uyarıcı etki ile sinaps sonrası hücre membranında iyon kanallarının aşırı depolarizasyonuna neden olurlar [23]. Böcekler ve memelilerdeki nAChR lerinin alt ünitelerindeki yapısal farklılıklar nedeniyle, böceklerdeki reseptörler ile daha sıkı ve geri dönüşümsüz olarak bağlandığından böcekler için memeli ve kuşlara göre daha toksik olduğu belirtilmektedir [25,26].

Neonikotinoidler, N-nitroguanidinler (imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin) ve N-siyanoaminidler (acetamiprid ve thiacloprid) olmak üzere iki ana gruba ayrılır [27,28]. Avrupa Birliğince clothianidine, imidacloprid ve thiamethoxam

bal arılarının yaşamlarını tehlikeye attığı yönündeki çalışmalar nedeniyle 2013 yılında kullanımının kısıtlanmasına karar verilmiştir [29,30].

1.1.1. Thiamethoxam

Çizelge 1.1 Thiamethoxamın bazı genel özellikleri [30]

Kimyasal adı	“3-[(2-Chloro-1,3-thiazol-5-yl)methyl]-5-methyl-N-nitro-1,3,5-oxadiazinan-4-imine
Molekül formülü	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S
Molekül ağırlığı	291,71 g/mol
Sudaki çözünürlüğü (25 °C)	4,1 g/L
Oral akut LD ₅₀ (ratlarda)	1563 mg/kg/gün
3Boyutlu yapısı	
www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archivetthiamethoxam.html	

Neonikotinoid grubu insektisitlerin en önemli temsilcilerinden olup geniş spektrumlu bir böcek öldürücüdür. Diğer grup üyeleri gibi nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR) bağlanarak post sinaptik hücre membranında iyon kanallarının depolarizasyonuna neden olurken, repolarizasyonun engellenmesiyle iyon kanallarının normalden daha uzun süre açık kalmasına yol açar [23, 31]. Uzun süre açık kalan iyon kanalları nedeniyle impuls iletimi engellenir ve böceğin paralize olarak ölümüyle sonuçlanır [23, 27].

Memelilerde emiliminin hızlı olduğu, vücutta yüksek ölçüde dağılabildiği ve birikim yerinin en çok karaciğer olduğu belirtilmektedir. Bunun yanında kronik maruziyette karaciğer ve böbrek üzerine toksik etkiye sahip olduğu, akut nörotoksisite çalışmalarında lokomotor sistem üzerinde aktivite kayıplarına, yüksek dozlarda ise merkezi sinir sistemi depresyonuna neden olduğu ve farelerde tümör oluşumunu indüklediği gösterilmiştir [30, 32].

Nauen vd. [33] *Spodoptera frugiperda* da larval evrede verilen thiamethoxamın hızlı bir şekilde açık zincirli bir diğer neonikotinoid olan clothianidine metabolize olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle biyoaktivasyon ürünleride canlılar üzerine etki gösterebilmektedir.

İnsektisitler gibi ksenobiyotiklerin toksik etkilerinin gösterilmesinde biyomarkırlar önemli bir yer tutar. İnsektisit toksisitesinde serbest radikal oluşumu ve buna bağlı olarak oluşan reaktif oksijen türlerinin antioksidan enzim aktivitelerine, genetik materyaller üzerine (DNA, RNA), protein, lipid ve karbohidratlar gibi hücresel bileşenlerde meydana getirdiği değişiklikler toksik etkinin gösterilmesinde önemli birer biyomarkırdır [9,10,34,35,36].

1.2. Serbest Radikaller

Son yörüngesinde bulundurduğu bir veya birden fazla sayıda eşlenmemiş elektrondan dolayı son derece kararsız yapıda olup diğer maddelerle reaksiyona girme eğilimindeki atom veya moleküller serbest radikal olarak adlandırılır [37].

Serbest radikaller normal oksijen metabolizması sırasında ortaya çıkabilmekle beraber, bu yolla oluşan serbest radikaller hücrelerin kendi savunma mekanizmaları tarafından ortadan kaldırılarak hücrenin korunması sağlanır. Burada önemli olan nokta oluşan serbest radikaller ile bunları ortadan kaldıracak mekanizmaların (antioksidan enzimler ve diğer antioksidanlar) birbiriyle dengeli olarak görev yapmasıdır. Oksidatif denge adı verilen bu durumda hücreler serbest radikallerden önemli ölçüde etkilenmezler. Ancak dengenin endojen veya eksojen kaynaklar tarafından bozulması oksidatif stresle sonuçlanır. Oksidatif dengenin bozulmasındaki en önemli sebepler arasında organizmaya giren patojenlere karşı oluşturulan fagositoz tepkimeleri ve vücudumuzda gerçekleşen çeşitli oksidasyon reaksiyonları gibi içsel faktörlerin yanı sıra çeşitli ilaçlar, alkol, sigara ve uyuşturucu gibi bağımlılık yapıcı maddeler ile pestisit ve ağır metal gibi eksojen çevresel kirleticiler yer almaktadır [38, 39]. Eksojen ve endojen bu kaynaklar ya canlıda serbest radikal üretimini doğrudan arttırarak ya da antioksidan enzimlerin yapılarında bozulmalara neden olarak oksidatif strese neden olurlar [40].

Serbest radikaller kaynağına bağlı olarak reaktif oksijen türevleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak ayrılırlar [41, 42]. Canlı organizmalarda en önemli serbest radikaller oksijen kaynaklı olan ROS'ler dir [43].

Reaktif oksijen türlerinin en önemlileri süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\bullet-}$), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($\bullet OH$) gibi inorganik moleküllerden veya alkoksil ve peroksil radikalleri gibi organik moleküllerden oluşur [44,45].

Hücrede serbest radikallerin zararlı etkilerine en çok maruz kalan yapılar öncelikle membran lipidleri olmak üzere, proteinler, karbonhidratlar ve DNA dır [34]. Taşıdığı paylaşılmamış elektrondan dolayı oldukça reaktif olan bu radikaller hücre zarındaki kolesterol ve çoklu doymamış yağ asitlerinin yan zincirindeki hidrojen atomu ile birleşerek lipidlerin peroksidasyonuna ve sonuçta membran bütünlüğünün ve yapısının bozulmasına yol açar [41,42,46]. Aynı zamanda proteinlerin kümeleşerek çökmesine, çapraz bağların meydana gelmesine ve aminoasitlerde yapısal değişikliklere neden olurlar [47]. Bu da proteinlerin yapıtaşısı olarak rol aldığı birçok enzim aktivitesinde, hücre membranında bulunan taşıyıcı proteinlerin transport mekanizmalarında ve kas kontraksiyonlarında hasarlara yol açar [46,48]. Karbohidratlar üzerine ise monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu oluşan H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehidler aracılığı ile zarar verirler. Oluşan bu okzoaldehidler, DNA, RNA ve proteinlerin yapısını bozar ve mitozu engelleyici etki gösterirler [35,49]. Hidroksil radikalleri ise DNA üzerinde mutasyona, kırıklara, çapraz bağ oluşumuna, pürinlerin oksidasyona neden olur [36,46,50].

1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Böcekler diğer canlılarda olduğu gibi serbest radikallerin zararlı etkilerinin önüne geçilebilmesi için antioksidan savunma sistemlerine sahiptir [51, 52]. Bu sistemler ya serbest radikal oluşumunun engellenmesi yoluyla ya da oluşabilecek serbest radikal formalarının ortadan kaldırılması yoluyla savunma işlevini yerine getirirler [53].

Böceklerde antioksidan enzimler ve enzim olmayan antioksidanlar aracılığıyla gerçekleştirilen bu savunma sisteminde, enzim yapısındaki antioksidanlar arasında, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S transferaz (GST) ve askorbat peroksidaz (APOX) ve dehidroksiaskorbat redüktaz (DHAR) gibi enzimler sayılabilir [52,54]. SOD enzimi reaktif oksijen türevlerinin zararlı etkilerinden hücreleri koruyan ilk basamak enzim olarak görev yapar ve süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene parçalanmasını sağlar [55,56]. Oluşan H_2O_2 ise yüksek konsantrasyonlarda Katalaz (CAT) tarafından parçalanarak su ve moleküler oksijene [56-58], daha düşük konsantrasyonlarda ise APOX ve DHAR gibi enzimler tarafından parçalanarak askorbat ve okside glutationa (GSSG) dönüştürülür [52]. Glutatyon peroksiadazlar (GPx), ise katalaza benzer şekilde H_2O_2 ve lipidlerin peroksidasyonuna neden olan diğer radikallerin zararlı etkilerine karşı hücreleri korurlar [41,55,59]. Böceklerde bulunan selenyumdan bağımsız GPx formu organik hidroperoksitlerin zararlı etkilerine karşı son derece önemlidir [41,60]. Glutatyon S transferaz (GST), ise böceklerde direnç gelişiminde önemli rol oynayan ve biyotransformasyon sırasında ve peroksidize olmuş lipid metabolitlerinin detoksifikasyonunda rol oynayan önemli bir enzimdir [61,62]. Böceklerde düşük GPx aktivitesinin GST nin sahip olduğu peroksidaz aktivitesiyle desteklendiği belirtilmektedir [63,64].

Glutatyon redüktaz (GR) ise H_2O_2 'nin detoksifiye edilmesi sırasında oluşan glutatyonun indirgenmiş glutatyonun (GSH) oluşmasını sağlayarak, daha sonra kullanılmak üzere hazır halde tutar [53].

Yukarıda bahsedilen enzimatik antioksidanların yanında enzim kökenli olmayan antioksidanlarda (glutation, askorbik asit, vitamin E, vb.) hücreleri ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinden korurlar [65-67].

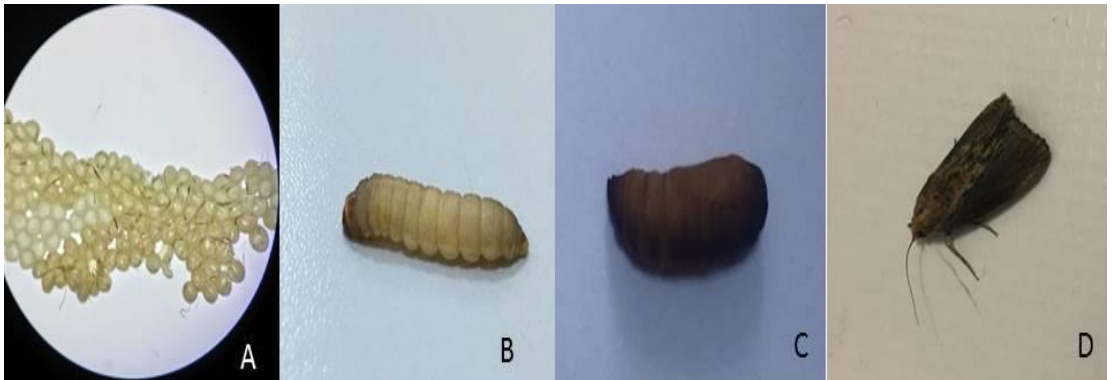
Glutatyon hücrenin her kompartımanında (sitozol, mitokondri ve nükleus) yüksek oranda bulunan bir tripeptittir. Yapısında glutamik asit, sistein ve glisin gibi aminoasitler bulunur [41,68,69]. Hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi önemli radikallerin zararlı etkilerinin önüne geçilmesi gibi önemli reaksiyonların yanında peroksitlere karşı da etki göstererek hücreleri korurlar [70,71].

Önemli bir diğer antioksidan madde ise vitamin E, yani α tokoferoldur. [41,72]. Yağda çözünebilirliğinden dolayı hücre membranında hidroksil radikallerinin hidrojen atomu ile reaksiyona girerek membran lipidlerinin peroksidasyonunun engellenmesinde önemli rol oynar [73].

Suda çözünebilir bir vitamin olan vitamin C (Askorbik asit) ise, çok güçlü indirgeyici özelliği ile süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girer zararlı etkilerine karşı hücreyi korurlar [74,75]. Askorbat, süperoksit ve hidroksil radikallerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırırken reaksiyon sırasında ortaya çıkan dehidroaskorbik asit, C vitamini kaynağı olarak tekrar tekrar kullanılabilir [70,75,76].

1.4. *Galleria mellonella* (Linnaleus, 1758): Büyük Balmumu Güvesi

Lepidoptera ordosuna ait holometabol bir böcek olan *Galleria mellonella*'nın (L.) larva formu arı kovanlarında bulunan peteklerde önemli miktarda kayıplardan sorumlu zararlı bir türdür [77,78]. Petekler kovanlar içerisine bırakılan yumurtaların açılması ile oluşan larvaların temel besinini oluşturur. Altı larval evrenin sonucunda pupa evresi ve ortalama 7-14 gün süren pupa evresinden sonra ergin böcek oluşur [78,79]. Ergin bir dişi ortalama ömrü boyunca sıcaklık ve nem değerlerine bağlı olarak ortalama 400-1000 yumurta bırakarak kovanlara zarar vermeye devam eder [80-82] (Resim 1.1).



Resim 1.1 *Galleria mellonella* yaşam evreleri [(A) Yumurta, B) Larva, C) Pupa, D) Ergin]

G. mellonella parazitoid böceklerin kitle halinde üretilmesinde kullanılan önemli bir konukçu olmasının yanında [83], zararlı bir tür olması açısından da, biyolojisi ve mücadelesi açısından da bilimsel çalışmaların önemli materyalleri arasında yer almaktadır [84]. Son yıllarda ise fizyolojik, biyokimyasal, genotoksik, immünolojik ve histolojik çalışmalarda model organizma olarak kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır [10,78,85,86]. Geleneksel model organizmalar ile (fare ve sıçanlar) yapılan çalışmalarda gerekli olan etik kurul izin belgeleri, belirli standartlara sahip laboratuvar gereksinimleri ve artan maliyet gibi dezavantajlar *G. mellonella* gibi omurgasız model organizmalara yönelme ihtiyacı doğurmuştur [87,88].

Tsai vd. [89], araştırmasında *G. mellonella* ile ilgili olarak iki yüzü 2014-2015 yılları arasında olmak üzere binin üzerinde akademik çalışmanın yapıldığını tespit etmiştir.

G. mellonella larvaları model organizma olarak bazı avantajlara sahiptir. Bu avantajlar arasında ekonomik olması, kültür olarak yetiştirilmesinin kolay olması, kısa yaşam döngüsü sayesinde jenerasyonlar arasında karşılaştırma yapılabilmesi, larva boyutunun ve hemolenf miktarının çoklu deney tekrarları için uygun olması, insan patojen çalışmaları için gerekli vücut sıcaklığında (37°C) yaşayabilmesi ve en önemlisi etik açısından herhangi bir prosedüre gerek duymaması sayılabilir [10,79,90-92].

G. mellonella larvalarının memeli model organizma olarak kabul görmesindeki en büyük etkenler arasında memelilerle bir çok yönden benzer özellik gösteren immün sisteminin yapısı ve çalışma mekanizmasıdır [93,94].

Bu benzerlikler memelilerdeki epidermisle aynı görevi gören kütikül tabakası, barsaklarında bulunan ve mikrobiyal toksinlere karşı reseptör taşıyan mikrovilluslar, patojenlere karşı gösterilen humoral bağışıklık yanıtı ve hemositlerin rol oynadığı fagositoz kabiliyeti olarak gösterilmiştir [94-97].

Gelişen teknoloji ve bilim sayesinde sentetik pestisitlerin üretimi her geçen gün artmakla birlikte bunların canlılar üzerindeki etkilerinin incelenmesi oldukça önemli bir hale gelmiştir. Bu etkilerin gösterilmesinde kullanılacak model organizmalar oldukça sınırlıdır.

Yukarıda bahsedilen bilgiler doğrultusunda sunulan tezin amacı yeni nesil bir insektisit olan ve tartışmalı toksik etkilerinden dolayı bazı gelişmiş ülkelerde kullanımını kısıtlanan, buna rağmen ülkemizde kullanımını konusunda herhangi bir kısıtlama olmayan thiamethoxamın son 10 yıldır model organizma olarak kullanımını önemli ölçüde artan aynı zamanda zararlı bir tür olması bakımından insektisitlerin hedef canlı grubunda olan *G. mellonella*'da antioksidan savunma sistemine ait bazı enzimler (SOD, CAT), MDA miktarı ve protein, karbohidrat ve lipid gibi biyobelirteçler üzerine etkilerini ortaya koymaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Alak ve ark. [98], doğal bir pestisit olan azadiraktin ve sentetik pestisit deltametrinin *Oncorhynchus mykiss*'de antioksidan enzim aktiviteleri üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, her iki pestisitinde SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini azalttığını, bunun yanında MDA düzeyini ise önemli ölçüde artırdığını belirtmişlerdir.

Baron ve ark. [99], thiamethoxamın *Bombus terrestris*, *Bombus lucorum*, *Bombus pratorum* ve *Bombus pascuorum*'da iki haftalık maruziyetten sonra beslenmeyi engellediğini bildirmişlerdir.

Buyukguzel [100], *Pimpla turionellae* ve konukçusu olan *G. mellonella*'da organofosfat grubu insektisit, malationun, gelişimi ve biyokimyasal parametreleri nasıl etkilediğini araştırmıştır. Malationun konak *G. mellonella*'nın pupalaşma oranını, parazitoit *P. turionellae*' da ise erişkin böcek oluşumunu azalttığını göstermiştir. Bunun yanında, malationun her iki türde de MDA miktarını arttırdığını, yani lipid peroksidasyonuna yol açtığını tespit etmiştir.

Champion ve ark. [101], *G. mellonella*'nın mikrobiyolojik ve toksin çalışmalarında model organizma olarak kullanılabileceğini belirtmiştir.

Choi ve ark. [102] dördüncü evre *Chironomus riparius* Mg. larvalarında fenitrothionun hipoksiya, hiperoksiya ve potasyumun enerji metabolizması üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, fenitrothionun elektron taşıma sisteminin aktivitesinde önemli değişikliklere neden olduğunu bunun yanında lipid ve glikojen miktarında önemli azalmalara yol açtığını göstermiştir.

El- Demerdash ve ark. [103], Fare testislerinde insektisitlerin oksidatif stres ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, lambdasiyalotrin ve fenitrothion karışımının GST, SOD ve CAT gibi antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu bunun yanında ALT, AST ve protein içeriğini de önemli ölçüde inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Gultekin ve ark. [104], klorpirifos-etilin *invitro* olarak eritrositlerde, antioksidan enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerini önemli ölçüde azalttığını ve MDA miktarında önemli artışlara neden olduğunu göstermişlerdir.

Henry ve ark. [105], Bal arılarında RFID ile yönetilen çiplerle, thiamethoxam'ın ölümcül dozun altındaki miktarlara maruz kalan bal arılarında büyük oranda eve geri dönememe ve toplanamamadan kaynaklanan ölümler saptanmış ve bunların büyük bir risk oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca radyo frekansı ile yapılan çalışmada neonikotinoid grubu insektisitlerin, arıların beyin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyerek arıların yön tayinlerini de güçleştirdiğini tespit etmişlerdir.

Kapoor ve ark. [106], bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu üzerine imidaklopritin etkilerini ratlar üzerinde araştırmışlar, 5mg/gün ve 10mg/gün imidakloprit dozu uygulanan hayvanlarda SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeylerinin önemli ölçüde etkilenmediğini, fakat dozun artırılması sonucu (20mg/gün) karaciğerde SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeylerinin, beyinde ise yine SOD, CAT ve GPx düzeylerinin önemli ölçüde farklılık gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca böbrek dokusunda da lipid peroksidasyona yol açtığını belirtmişlerdir.

Kapoor ve ark. [107], İmidaklopritin dişi ratların ovaryumları üzerindeki morfolojik değişiklikler, hormonlar ve bazı antioksidan enzimler üzerine etkilerini araştırmışlardır. İmidakloprite maruz bırakılan ratlarda, ovaryumun ağırlığının kontrol grubuna göre azaldığını, bazı patolojik farklılıklara yol açtığını, hormonlar ve SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzimleri önemli ölçüde etkilediğini ve, GSH ve lipid peroksidasyon düzeylerinde önemli ölçüde değişikliklere yol açtığını göstermişlerdir.

Keshta ve ark. [108], ratlarda thiamethoxam ve acetamipridin oksidatif stres ve biyokimyasal parametrelere etkilerini inceledikleri çalışmalarında her iki insektisit de MDA ve nitrikoksit konsantrasyonunun önemli ölçüde artmasına yol açtığını ve bunun yanında önemli birer antioksidan enzim olan CAT ve SOD enzimlerinin aktivitelerinin azalmasına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Kissoum ve Soltani [109], *Drosophila melanogaster* üzerinde spiromesifen insektisitinin, biyokimyasal bazı belirteçler üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, önemli birer enerji kaynağı olan karbohidrat ve glikojen miktarlarının, insektisitten önemli ölçüde etkilenerek azaldığını göstermişlerdir.

Noshy ve ark. [110], karbamatlı ve organofosfatlı insektisitlerin tarım işçilerinde oksidatif stres parametreleri üzerine olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında, insektisitlerin MDA konsantrasyonunu önemli ölçüde artırdığını, GSH aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğünü ve bunun yanında glutasyon bağımlı enzimler olan glutasyon peroksidaz ve glutasyon s transferaz aktivitelerini ise önemli ölçüde arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca enzimatik antioksidanlar olan SOD ve CAT aktivitelerinde önemli ölçüde azalmanın meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Piri ve ark. [111], spinosadın *Glyphodes pyloalis* (Walker)' de bazı biyokimyasal parametrelere etkilerini araştırdıkları çalışmalarında beşinci evre larvalarında spinosadın LC₁₀, LC₂₀, LC₃₀ ve LC₄₀ dozlarının artan konsantrasyona paralel olarak karbohidrat miktarını önemli ölçüde azalttığını, LC₁₀ konsantrasyonunun lipid miktarını önemli arttırdığını ve LC₂₀, LC₃₀ ve LC₄₀ dozlarının ise lipid miktarında artışa neden olduğunu, protein miktarının ise LC₃₀ ve LC₄₀ dozlarında önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir.

Sak ve ark. [112], sipermetrinin *Galleria mellonella*'nın parazitoiti olan *Pimpla turionellae*'da ergin böceklerde toplam lipid, protein ve karbohidrat düzeylerinde büyük oranda azalmalara yol açtığını ve bu etkinin böceğin eşeyine bağlı olarak önemli ölçüde fark gösterdiğini, dişi böceklerin erkeklere nazaran daha çok etkilendiğini göstermişlerdir.

Saraiva ve ark. [113], thiamethoxamın toksik etkilerini *Chironomus riparus*'ta araştırmışlar ve thiamethoxamın büyümeyi azalttığını, ergin çıkış süresini geciktirdiğini, CAT enzim aktivitesini azaltırken, AChE ve GST aktiviteleri üzerine önemli bir etkide bulunmadığını belirtmişlerdir.

Smina ve ark. [114], toprak solucanı *Helix aspersa*'da thiamethoxamın bazı antioksidan enzim aktivitelerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, asetilkolin esterazın thiamethoxam konsantrasyonuna bağlı olarak, önemli ölçüde inhibe edildiğini ve insektisit GST ve CAT gibi antioksidan enzim aktivitelerinde ise artışa neden olduğunu göstermişlerdir.

Tavares ve ark. [115], bal arılarında embriyo sonrası dönemde thiamethoxamın ömür uzunluğu ve bazı fizyolojik parametrelere olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, thiamethoxamın larvalarda ve pupalarda ömür

uzunluğunu ve ergin birey çıkışını azalttığını, pupal evrede asetilkolinesteraz ve GST enzim aktivitelerinde ise önemli ölçüde artışa neden olduğunu belirtmişlerdir.

Tsai ve ark. [89], *G. mellonella*'nın önemli bir model organizma olduğunu, bakteri kaynaklı hastalıklar ve antimikrobiyal ilaç çalışmaları için *G. mellonella*'nın enfeksiyon modeli olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca yaptıkları literatür çalışmasında bu konuda yapılmış binden fazla çalışma olduğunu belirtmişlerdir.

Velisek ve Stara [116], thiamethoxamın *Cyprinus carpio*'da etkilerini araştırdıkları çalışmalarında thiamethoxamın ergin birey çıkışı, davranış ve embriyo hareketliliği üzerine negatif yönde bir etkide bulunmadığını, bunun yanında thiamethoxama maruz kalan bireylerin boy ve kilo oranlarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu ve gelişimin engellendiğini, ayrıca süperoksit dismutaz ve glutasyon redüktaz gibi enzim aktivitelerinde önemli ölçüde azalmalara neden olduğunu belirtmişlerdir.

Vohra ve Khera [117], Ratlarda bazı hayati önemdeki organların mikromorfolojisi ve bazı önemli enzim parametreleri üzerine imidaklopritin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, birinci jenerasyon yavrularda alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), asit fosfataz (ACP) ve alkalın fosfataz (ALP) gibi enzimlerde yüksek konsantrasyondaki imidakloprite bağlı olarak aktivite artışlarının meydana geldiğini, bunun yanında beyin ve plazmada asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesinin kayda değer bir şekilde azalma gösterdiğini belirtmişlerdir.

Yan ve ark. [118], thiamethoxamın *Danio rerio*'da antioksidan yanıt ve oksidatif stres üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, SOD ve CAT enzim aktivitelerinin uygulamayı takip eden erken periyotta önemli ölçüde arttığını, fakat daha sonra artan reaktif oksijen türevleri konsantrasyonuna bağlı olarak önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir.

Zhang ve ark. [119], Fluoxastrobinin akut ve kronik etkilerini *Danio rerio*'da araştırdıkları çalışmalarında, oluşan reaktif oksijen türevlerinin lipid peroksidasyonuna neden olduğunu ve DNA hasarlarını indüklediğini, artan fluoxastrobinin konsantrasyonuna bağlı olarak önce antioksidan enzim aktivitelerinin

önemli ölçüde arttığını daha sonra ise fazla miktarda oluşan reaktif oksijen türevlerine bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinin inhibe olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM**3.1. Materyal****3.1.1. Kullanılan Kimyasallar**

Albümin (BSA)

Antron

Bakır Klorür (CuCl_2)

Bakır Sülfat (CuSO_4)

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)

Fenilthiourea ($\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$)

Folin Ciocalteu's Ayıracı

Fosforik Asit (H_3PO_4)

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Kalsiyum klorür (CaCl_2)

Kloroform (CHCl_3)

Ksantin, ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$)

Ksantin Oksidaz; (EC): 1.17.3.2.

Metanol (CH_3OH)

Mısır Yağı

Nitroblue Tetrazolium (NBT)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)

Potasyum klorür (KCl)

Sodyum dihidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Sodyum Hidroksit (NaOH)

Sodyum karbonat (Na_2CO_3)

Sodyum klorür (NaCl)

Sodyum Potasyum Tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Sodyum Sülfat (Na_2SO_4)

Sülfürik Asit (H_2SO_4)

Thiamethoxam 3-[(2-Chloro-1,3-thiazol-5-yl)methyl]-5-methyl-*N*-nitro-1,3,5-oxadiazinan-4-imine
Trikloroasetik asit (TCA)
Tiyobarbiturik asit (TBA)
Vanilin (C₈H₈O₃)

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Analitik terazi	: Ohaus
Buzdolabı	: Vestel BZP-XL3442W
Buz makinası	: Scotsman AF-80
Deney tüpleri	: İsolab
Ependorf tüpleri	: İsolab
Genel Amaçlı Santrifüj	: Hettich Eba 21
Homojenizatör	: Daihan
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	: Daihan Wisd MSH-20A
Otomatik pipetler	: Gilson
pH metre	: Thermo Orion 2 Star
Saf su cihazı	: Millipore Rios 8
Sıcak su banyosu	: Daihan Wisd WB22
Soğutmalı masaüstü santrifüj	: Hettich Universal 320 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1800
Vortex	: Labart MSV-1
-80 °C Derin dondurucu	: New Brunswick U570

3.1.3. *G. mellonella* Stok Kültürü ve Deney Böceklerinin Üretimi

Thiamethoxamın son evre *G. mellonella* larvalarının enerji rezervleri (protein, lipid, karbohidrat düzeyleri), antioksidan enzim aktiviteleri (SOD ve CAT) ve lipid peroksidasyonuna (MDA miktarı) olan etkilerinin incelendiği bu çalışmada *G.*

mellonella larval evredeki bireyleri 30 ± 2 °C sıcaklık ve 70 ± 5 bağıl nem oranına sahip laboratuvarında ve 24 saat boyunca karanlık fotoperiyodu uygulanan bir ortamda Bronskill [120] tarafından geliştirilen yarı sentetik besin içerisinde yetiştirilen ergin bireylerden elde edilmiştir (Resim 3.1).

Deneylerden önce thiamethoxamın *G. mellonella* son evre larvaları için 96 saatlik LD₅₀ değerleri farklı dozlardaki thiamethoxamın rastgele seçilen son evre larvalarına enjeksiyonu yapılarak belirlenmiştir.



Resim 3.1 *G. mellonella* stok kültürü

3.1.4. Thiamethoxamın LD₅₀ Değerinin Belirlenmesi

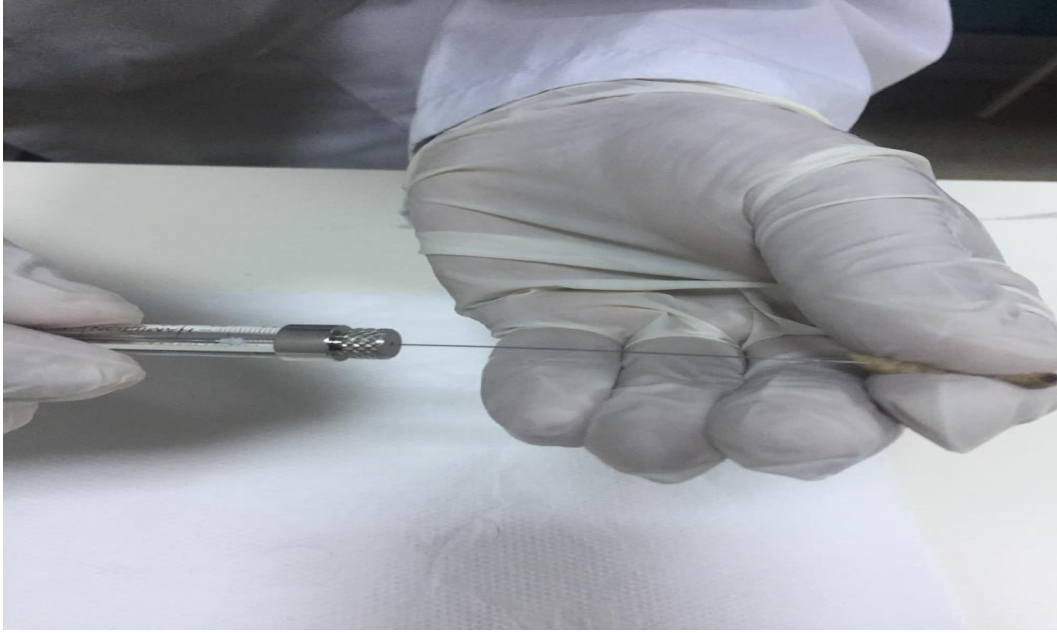
Stok *G. mellonella* kültüründen rastgele alınan son evre larvalara (yaklaşık 250-350 mg) thiamethoxamın farklı dozları enjekte edildi ve 96 saat boyunca her 24 saatte bir ölen ve hayatta kalan larvalar takip edilerek kayıt altına alındı. Elde edilen verilerden Finney [121] probit analiz yöntemi kullanılarak LD₅₀ değerleri belirlendi. Buna göre thiamethoxamın subletal dozlarının larva başına (10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg ve 50 µg) çalışılmasına karar verildi.

3.1.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

G. mellonella stok kültürü oluşturmak için bileşimi Bronskill [120] tarafından geliştirilen ve içeriğinde kepek, bal, saf su, gliserin ve petek bulunan besin cam kavanozlara konularak üzerlerine *G. mellonella* ergin bireyleri bırakıldı. Ergin *G. mellonella* bireyleri bu besin içerisinde yumurta bıraktıktan sonra açılan yumurtaların larva oluşumları takip edildi ve son evreye ulaşan larvalar (yaklaşık 250-350 mg) deneylerde kullanıldı (Resim 3.2). Son evre larvaları kavanozlardan alınarak buz üzerinde hareketleri yavaşlatıldı ve Hamilton marka mikro enjeksiyon iğnesi kullanılarak thiamethoxam farklı konsantrasyonları (10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg ve 50 µg/larva) larvaların son arka bacağı önünden enjeksiyon yapıldı (Resim 3.3). Kontrol grubu larvalarına ise saf su enjeksiyonu yapılarak larvalar 24, 48, 72 ve 96 saatlik gruplar oluşturuldu. Enjeksiyon yapılan larvalar aynı laboratuvar şartlarında deney periyotları boyunca bekletildi. Belirlenen süreler sonunda larvalar buldukları ortamdan alınarak hassas terazide tartıldı ve daha sonra analizler yapılmaya kadar -80°C de saklandı.



Resim 3.2 *G. mellonella* son evre (7. evre) larvaları



Resim 3.3 *G. mellonella* larvalarına thiamethoxam enjeksiyonu

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyokimyasal Analizler İçin Süpernatantların Elde Edilmesi

Larvalar, antioksidan enzim aktiviteleri (SOD ve CAT), lipid peroksidasyon düzeyi (MDA) ve protein miktarının belirlenmesi için -80°C 'den alınarak 10 mL'lik plastik tüpler içerisine konuldu ve üzerlerine melanizasyonu engellemek için feniltiüre eklenerek 50 mM fosfat tamponu (1/10) içerisinde 24000 devir/dk homojenize edildi. Homojenizasyonu takiben $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 devir/dk da 30 dakika santrifüj edildi ve meydana gelen süpernatant yukarıda belirtilen parametrelerin ölçümünde kullanıldı.

Total karbohidrat ve lipid düzeylerinin belirlenmesi için -80°C 'de saklanan larvalar 10 mL'lik plastik tüpler içerisine alındı ve üzerlerine melanizasyonu engellemek için feniltiüre eklendi. Daha sonra tüplere 2 mL sodyum sülfat ilave edildi ve 24000 devirde homojenize edildi. Homojen hale gelen örnekler üzerine 8 ml kloroform/metanol (1/2) çözeltisi eklendi ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 10000 devir/dk da 10 dk

santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra oluşan süpernatant toplam karbohidrat ve toplam lipid oranlarının tayininde kullanıldı.

3.2.2. Total Protein Miktarı Analizi

G. mellonella son evre larvarlarının protein miktarlarının belirlenmesinde Lowry ve ark. [122] tarafından gösterilen yöntem esas alınmış, analiz için gerekli çözeltilerin hazırlanması ve spektrofotometrede absorbans okunması ve protein miktarlarının hesaplanması Kayış [123]' de açıklandığı şekilde yapılmıştır.

Protein miktarının analizinde %1' lik BSA (Sigma; A-2153) standart olarak kullanılmış ve seri sulandırmalarla hazırlanan standart çözeltilerin 750 nm'de spektrofotometrik yöntemle (Shimadzu UV-1800) ölçümleri ile elde edilen absorbanslar kullanılarak protein standart grafiği oluşturulmuştur. Örneklerden edilen absorbanslar standart çözeltilerin absorbansları ile oluşturulan standart protein eğrisine yerleştirilerek böceklere ait toplam protein miktarları elde edilmiştir. Bu değerler toplam böcek ağırlıklarına bölünerek, sonuçlar mg/100mg protein olarak gösterilmiştir.

3.2.3. Total Karbohidrat Miktarı Analizi

Toplam karbohidrat miktarının tayini Van Handel [124]' in göstermiş olduğu yöntemle göre yapılmıştır. Örneklerin karbohidrat miktarlarını belirlemek için önce saf glikojenden mililitresinde 0.1gr glikojen içeren bir stok çözelti hazırlanmıştır (Sigma G-8751). Bu stok çözeltilerden seri sulandırmalarla farklı konsantrasyonlarda çözelti serileri hazırlanmış ve çözeltilerin 625 nm de spektrofotometrik (Shimadzu UV 1800) ölçümlerle elde edilen absorbansları kullanılarak standart bir karbohidrat regresyon eğrisi oluşturulmuştur. Örneklerin absorbanslarının belirlenmesi için ise, örneklerden 200 µL alınarak Van Handel [124]' e göre okunmuştur. Elde edilen absorbans verileri standart çözelti serilerinden elde edilen karbohidrat regresyon denkleminde yerine konularak toplam miktarları mg/100mg cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.4. Total Lipid Miktarı Analizi

Örneklerin toplam lipit miktarı Van Handel [125]' in geliştirmiş olduğu yöntemle göre hesaplanmıştır. Bunun için öncelikle % 0.1' lik mısır yağı kullanılarak stok bir çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti kloroform/metanol (1/2) karışımı ile farklı konsantrasyonlarda seyreltilmiş ve elde edilen çözelti serilerinin spektrofotometrede (Shimadzu UV 1800) 525 nm dalga boyunda okunması ile lipid standart grafiği elde edilmiştir. Daha sonra 200 µL örnek alınarak spektrofotometrede Van Handel [125]'in geliştirmiş olduğu metoda göre okuma işlemi yapılmış, elde edilen absorbans verileri standart grafik kullanılarak oluşturulan regresyon denkleminde yerine konularak total lipit miktarı mg/100mg olarak hesaplanmıştır.

3.2.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde Sun ve ark. [126] tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin spektrofotometrik ölçümünde kullanılan SOD reaktif çözeltisinin içerdiği kimyasallar, reaktif hazırlama ve spektrofotometrede okuma aşamaları ile enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan formüller daha önce Kayış [123]'de açıklandığı şekilde uygulanmıştır. Örneklerin SOD aktiviteleri U/mg protein cinsinden belirlenmiştir.

3.2.6. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz enzim aktivitesinin hesaplanmasında Aebi [127] tarafından gösterilen yöntem kullanılmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometre kinetik olarak ölçülmüş, 30 sn aralıklarla 1 dk boyunca okuma işlemi yapılmıştır. Okunan absorbanslardan enzim aktivitesinin hesaplanması ve yöntemde kullanılan çözeltilerin hazırlanması Kayış [123]'de gösterildiği gibi uygulanmıştır. CAT enzim aktivitesi U/mg protein şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.7. Malondialdehid (MDA) Miktarının Belirlenmesi

Malondialdehid miktarının tayininde Bar-Or ve ark. [128] tarafından geliştirilen yöntem esas alınmıştır. Bunun için süpernatanttan 250 µl alınarak üzerine %20'lik 125 µL TCA ilave edildi ve 30 dk 15000 devirde santrifüj edildi. Daha sonra üzerine % 0,8'lik TBA çözeltisinden 200 µL ilave edilen örnekler, vortekslenerek daha önceden 90 °C'ye ayarlanan sıcak su banyosunda bir saat bekletildi. Daha sonra örneklerin soğumaları beklendi ve soğuyan örnekler spektrofotometrede 525nm de 250 µL saf su + 125 µL TCA + 200 µL TBA ile hazırlanan köre karşı okundu. Absorbanslar aşağıda verilen formül kullanılarak MDA düzeyleri nmol/mg protein cinsinden hesaplandı.

Hesaplama:

$$A = K (\text{Konsantrasyon}) \times l (\text{Işık yolu}) \times \epsilon (\text{Ekstinksiyon katsayısı})$$

$$K = A (\text{Okunan absorbans}) / l \times \epsilon (1,56. 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = \text{nmol} / \text{mg protein}$$

3.2.8. Verilerin Analizi

Deneyler farklı zamanlarda beşer kez tekrarlandı, her bir konsantrasyonun her bir tekrarından elde edilen verilere SPSS 20.00 istatistiksel analiz bilgisayar programı kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. İstatistiksel analizler için Student-Newman Keul's (SNK) testi kullanılmıştır. Verilerin ortalamaları arasındaki fark 0.05 olasılık seviyesinde P değerinden büyük ise anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

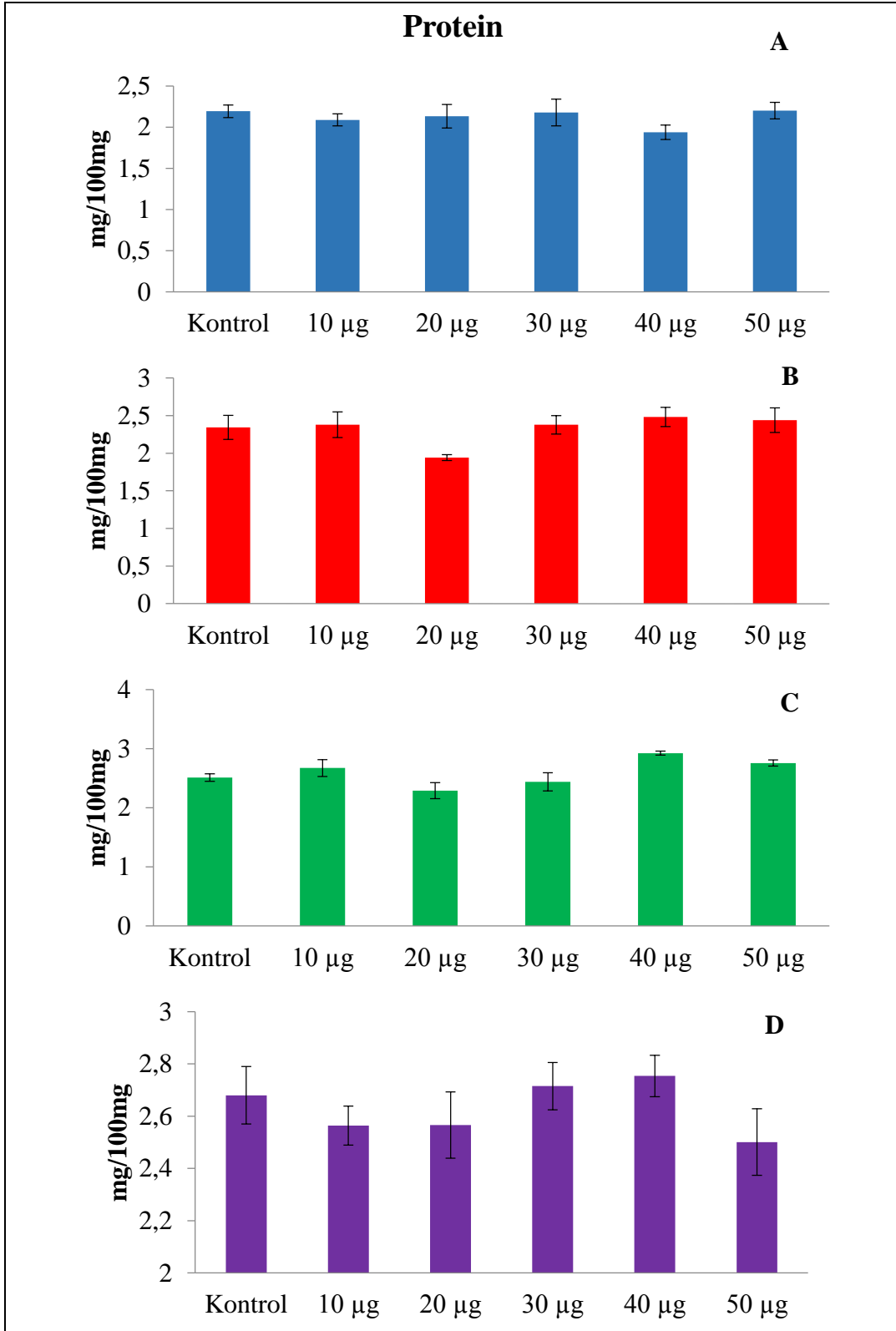
4.1. Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın Total Protein Miktarına Etkisi

Farklı thiamethoxam konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarının toplam protein miktarına etkileri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1' de gösterilmiştir. Denenen tüm periyotlarda gerek kontrol grubu ile insektisit uygulanan gruplar arasında gerekse uygulanan dozlar arasında protein miktarları bakımından artma ve azalmalar olmakla birlikte bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P \geq 0.05$).

Çizelge 4.1 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın toplam protein miktarına konsantrasyona bağlı etkileri

Konsantrasyon	PROTEİN (mg/100mg)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	2.194±0.076a	2.342±0.160a	2.511±0.064abc	2.680±0.110a
10 µg	2.089±0.072a	2.379±0.170a	2.673±0.142abc	2.564±0.075a
20 µg	2.134±0.142a	1.941±0.038a	2.289±0.135c	2.566±0.127a
30 µg	2.179±0.161a	2.377±0.123a	2.438±0.154bc	2.715±0.091a
40 µg	1.939±0.087a	2.483±0.128a	2.925±0.035a	2.754±0.079a
50 µg	2.201±0.100a	2.439±0.163a	2.758±0.050ab	2.501±0.127a

*: a, b, c, harfleri verilerin ortalamaları arasındaki farkı göstermektedir. Herbir sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiki olarak bir fark yoktur ($P > 0.05$) (Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.1 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nin total protein miktarına etkileri (A:24 saat, B: 48 saat, C: 72 saat ve D: 96 saat)

*: kontrol grubu ile farkı göstermektedir ($P < 0.05$)

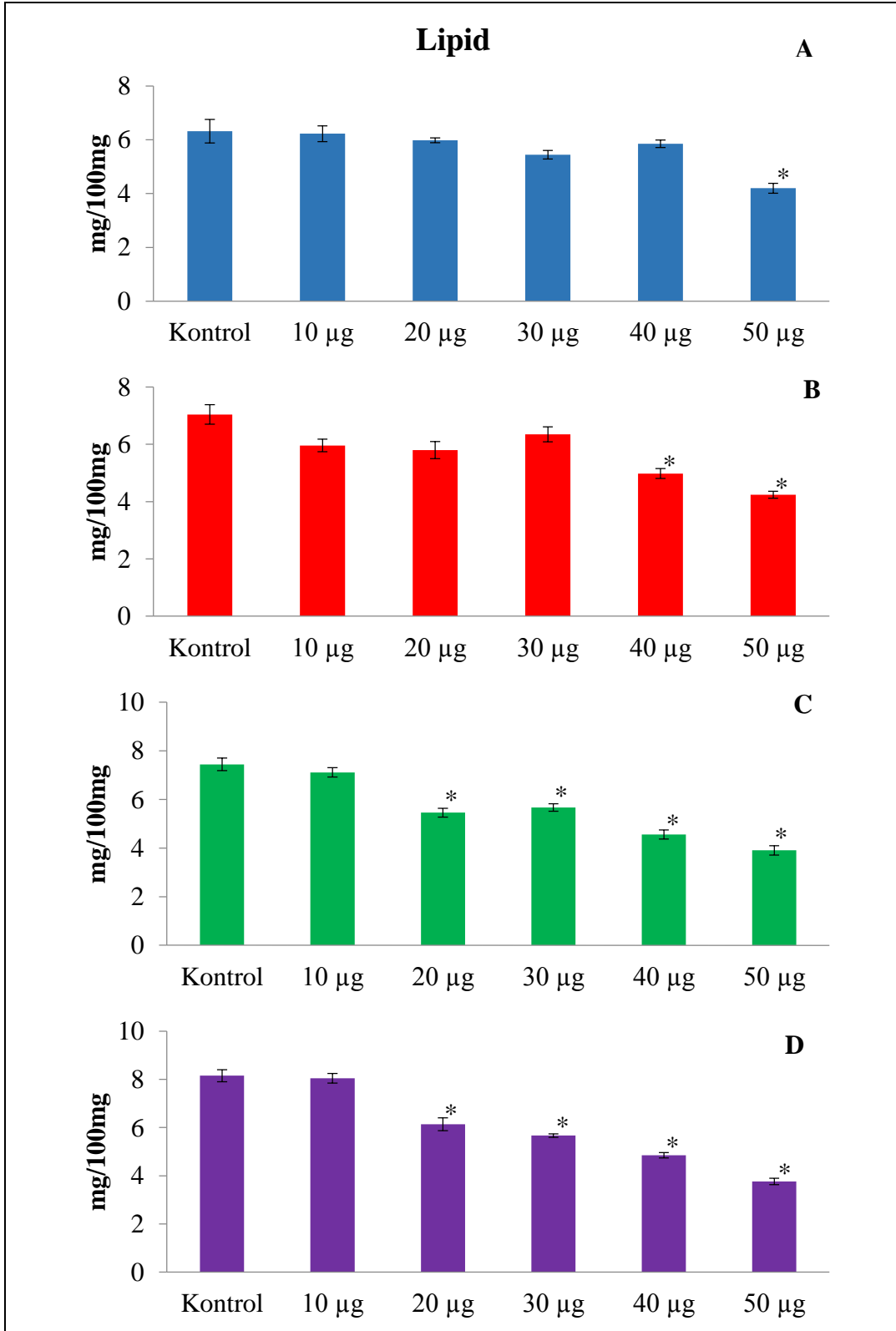
4.2. Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın Total Lipid Miktarına Etkisi

Farklı thiamethoxam konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarının toplam lipid miktarına etkileri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2' de gösterilmiştir. *G. mellonella*'nın lipid miktarları thiamethoxam enjekte edilen larvalarda önemli ölçüde değişiklik göstermiştir. Yirmi dördüncü saatte kontrol grubuna göre (6.320 mg/100mg) tek fark 50 µg thiamethoxam konsantrasyonunda görülmüştür. Bahsi geçen konsantrasyonda lipid miktarı diğer insektisit konsantrasyonlarına göre de önemli ölçüde azalmıştır (4.202 mg/100mg) ($P<0.05$). Kırk sekizinci saatte lipid miktarı 30 µg thiamethoxam dozu dışındaki dozlarda kontrole göre önemli ölçüde azalırken, 72 ve 96. saattlerde ise en düşük doz olan 10 µg thiamethoxam dozu dışındaki tüm dozlarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır.

Çizelge 4.2 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın toplam lipid miktarına konsantrasyona bağlı etkileri

Konsantrasyon	LİPİD (mg/100mg)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	6.320±0.442a	7.041±0.339a	7.441±0.259a	8.155±0.252a
10 µg	6.226±0.295a	5.960±0.221b	7.114±0.193a	8.043±0.200a
20 µg	5.981±0.086a	5.799±0.300b	5.457±0.182b	6.140±0.263b
30 µg	5.448±0.160a	6.351±0.263ab	5.673±0.154b	5.669±0.069b
40 µg	5.850±0.141a	4.978±0.172c	4.558±0.188c	4.854±0.111c
50 µg	4.202±0.184b	4.242±0.122d	3.904±0.196d	3.768±0.132d

*: a, b, c, d harfleri verilerin ortalamaları arasındaki farkı göstermektedir. Herbir sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiki olarak bir fark yoktur ($P>0.05$) (Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.2 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın total lipid miktarına etkileri (A:24 saat, B: 48 saat, C: 72 saat ve D: 96 saat)

*: kontrol grubu ile farkı göstermektedir ($P < 0.05$)

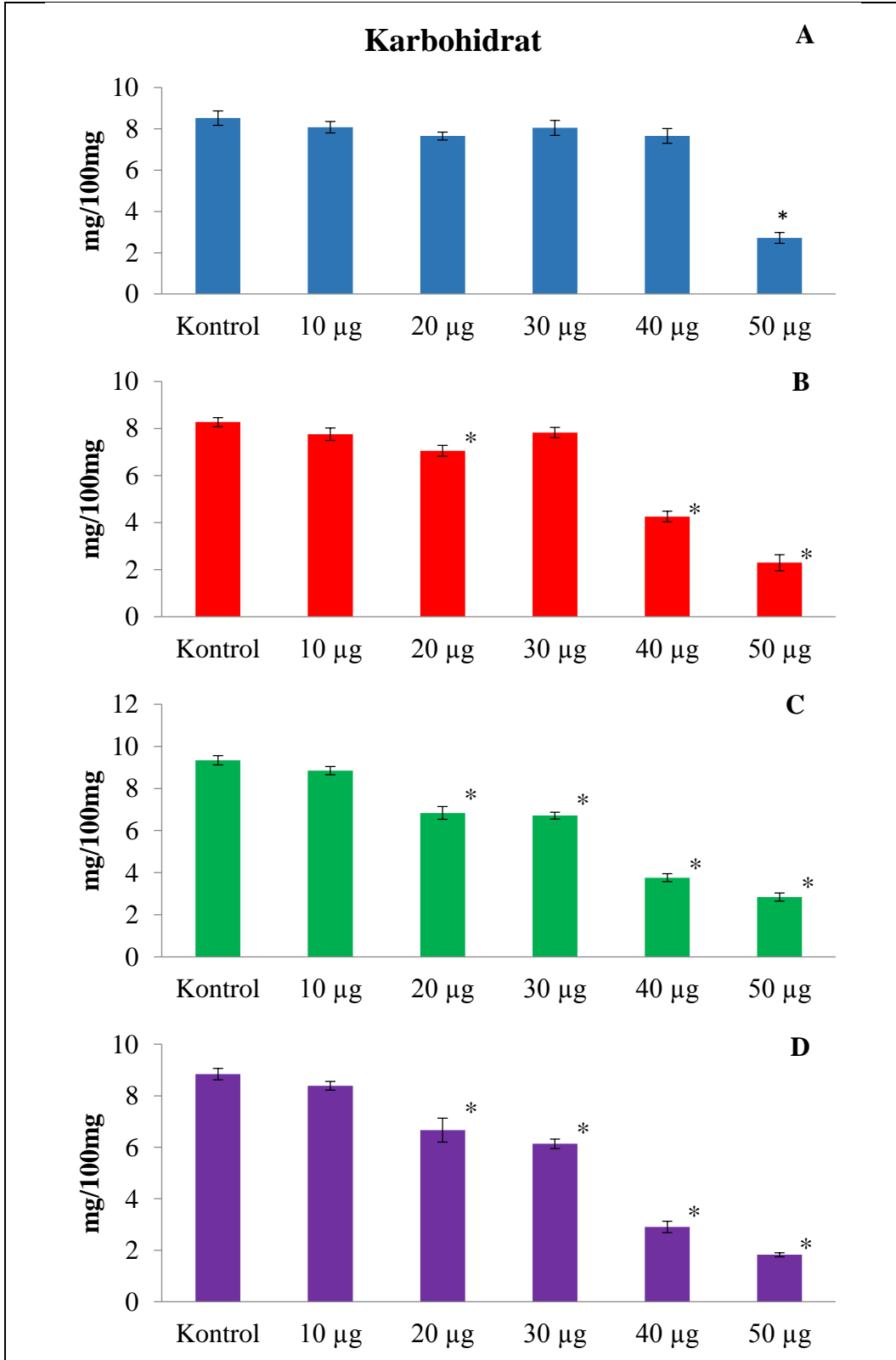
4.3. Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın Total Karbohidrat Miktarına Etkisi

Farklı thiamethoxam konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarının toplam karbohidrat miktarına etkileri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3' de gösterilmiştir. *G. mellonella* larvalarının toplam karbohidrat miktarı 24. saatte yalnızca en yüksek thiamethoxam konsantrasyonunda (50 µg) kontrole ve diğer konsantrasyonlara göre önemli ölçüde azalmıştır ($P<0.05$). Bahsi geçen günde diğer konsantrasyonların kendi aralarında ve kontrol grubuyla karşılaştırılmaları durumunda istatistiki bakımdan bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). Kırk sekizinci saatte kontrol grubunda 8.272 mg/100mg olan karbohidrat miktarı 20, 40 ve 50 µg thiamethoxam konsantrasyonlarında önemli ölçüde azalarak sırasıyla 7.047 mg/100mg, 4.257 mg/100mg ve 2.293 mg/100mg olarak gerçekleşmiştir. Yetmiş iki ve 96. saatlerde karbohidrat miktarlarında doza bağlı olarak bir azalma gerçekleşmekle beraber, bu azalma en düşük doz olan 10 µg thiamethoxam dışındaki dozlarda istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Çizelge 4.3 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın toplam karbohidrat miktarına konsantrasyona bağlı etkileri

Konsantrasyon	KARBOHİDRAT (mg/100mg)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	8.522±0.350a	8.272±0.191a	9.339±0.220a	8.838±0.221a
10 µg	8.074±0.274a	7.756±0.265ab	8.846±0.191a	8.384±0.166a
20 µg	7.651±0.191a	7.047±0.232b	6.838±0.298b	6.662±0.466b
30 µg	8.045±0.357a	7.828±0.220ab	6.714±0.162b	6.133±0.185b
40 µg	7.660±0.356a	4.257±0.228c	3.759±0.186c	2.904±0.222c
50 µg	2.724±0.264b	2.293±0.339d	2.837±0.194d	1.826±0.083d

*: a, b, c, d harfleri verilerin ortalamaları arasındaki farkı göstermektedir. Herbir sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiki olarak bir fark yoktur ($P>0.05$) (Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.3 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın total karbohidrat miktarına etkileri (A:24 saat, B: 48 saat, C: 72 saat ve D: 96 saat)

*: kontrol grubu ile farkı göstermektedir ($P<0.05$)

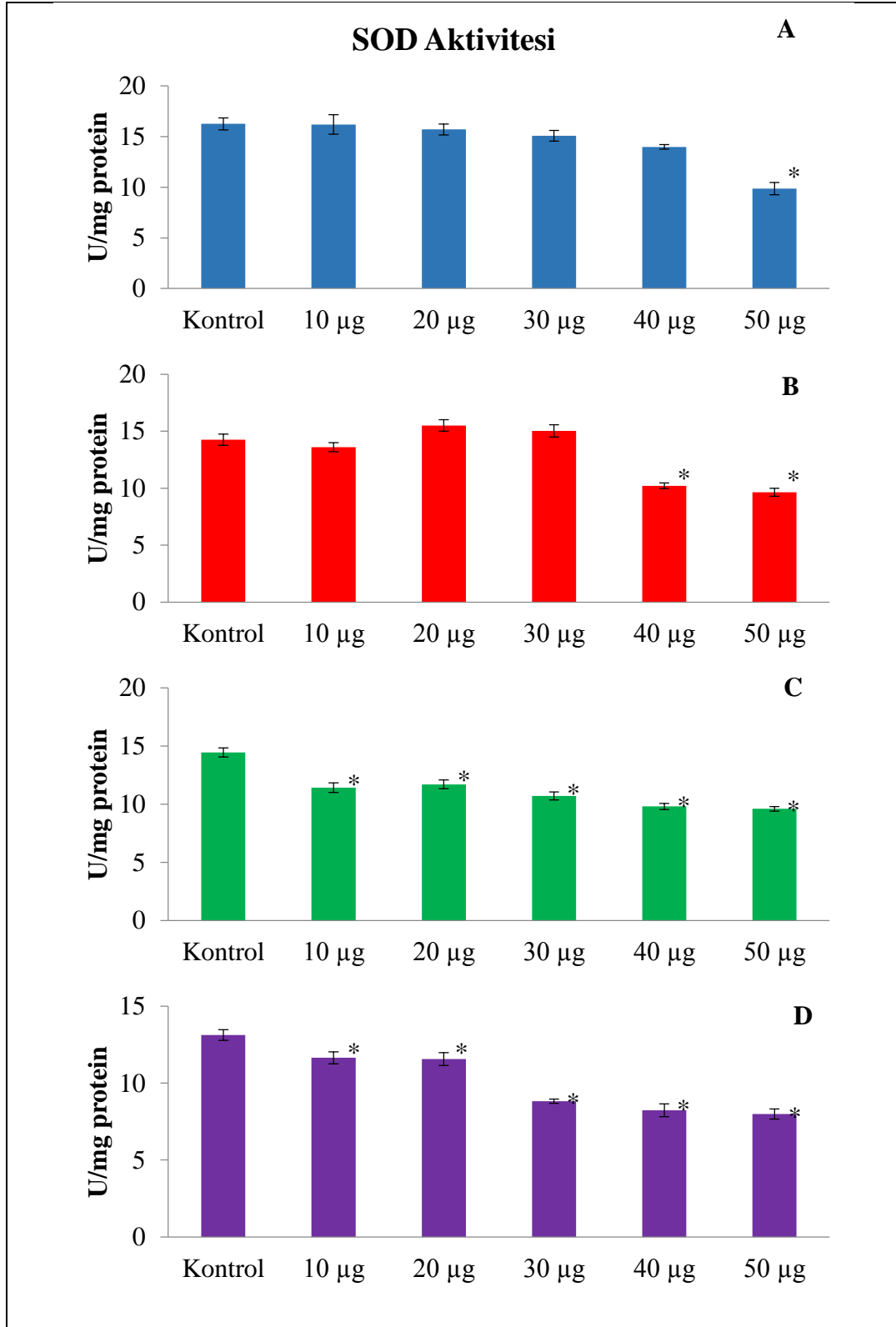
4.4. Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın SOD Enzim Aktivitesine Etkisi

Farklı thiamethoxam konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarının SOD enzim aktivitesi üzerine olan etkileri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4' de gösterilmiştir. SOD enzim aktivitesi 24. saatte yalnızca en yüksek thiamethoxam konsantrasyonunda (50 µg) kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalırken ($P<0.05$), diğer thiamethoxam konsantrasyonlarının gerek kendi aralarında gerekse kontrol grubu ile karşılaştırılmaları sonucunda istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($P>0.05$). Kırk sekizinci saatte yüksek insektisit dozları olan 40 µg ve 50 µg thiamethoxam enjekte edilen larvalarda kontrol grubuna ve diğer dozlara göre SOD aktivitesinde önemli ölçüde azalma meydana gelmiştir ($P<0.05$). Yetmiş iki ve 96. saatlerde ise denenen tüm thiamethoxam konsantrasyonlarında SOD aktivitesi kontrole göre önemli ölçüde azalmakla beraber ($P<0.05$), bu azalmalar doza bağlı azalma şeklinde gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.4 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın SOD enzim aktivitesine konsantrasyona bağlı etkileri

Konsantrasyon	SOD (U/mg protein)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	16.250±0.591a	14.260±0.500ab	14.441±0.390a	13.125±0.350a
10 µg	16.194±0.958a	13.613±0.399b	11.422±0.411c	11.648±0.392b
20 µg	15.699±0.532a	15.505±0.503a	11.699±0.381c	11.563±0.423b
30 µg	15.076±0.518a	15.031±0.536ab	10.704±0.345bc	8.824±0.143c
40 µg	13.971±0.225a	10.215±0.247c	9.811±0.263c	8.238±0.416c
50 µg	9.856±0.598b	9.639±0.355c	9.602±0.198c	7.990±0.336c

*: a, b, c harfleri verilerin ortalamaları arasındaki farkı göstermektedir. Herbir sütündeki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur ($P>0.05$) (Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.4 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın SOD enzim aktivitesine etkileri (A:24 saat, B: 48 saat, C: 72 saat ve D: 96 saat)

*: kontrol grubu ile farkı göstermektedir ($P < 0.05$)

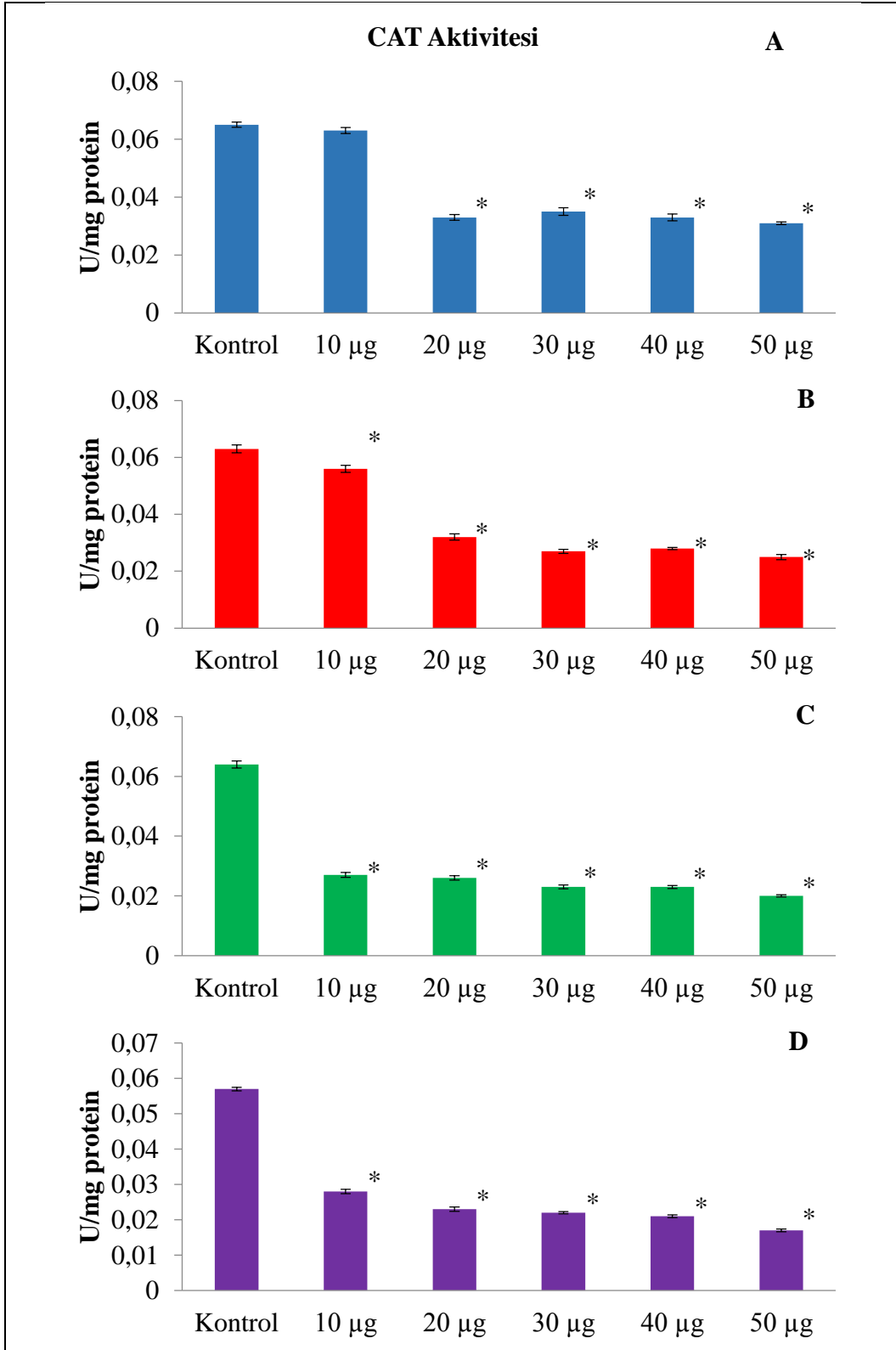
4.5. Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın CAT Enzim Aktivitesine Etkisi

Farklı thiamethoxamın konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarının CAT enzim aktivitesi üzerine olan etkileri Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5' de gösterilmiştir. Katalaz enzim aktivitesi 24. saatte en düşük thiamethoxam konsantrasyonu (10 µg) dışındaki tüm dozlarda kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır ($P<0.05$). Kırk sekiz, 72 ve 96. saatlerde ise denenen tüm thiamethoxam konsantrasyonlarında CAT aktivitesi kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır ($P<0.05$). Yetmiş iki ve 96. saatlerde CAT aktivitesinde gözlenen azalma doza bağlı bir azalma şeklinde gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.5 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın CAT enzim aktivitesine konsantrasyona bağlı etkileri

Konsantrasyon	CAT (U/mg protein)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	0.065±0.0009a	0.063±0.0014a	0.064±0.0012a	0.057±0.0005a
10 µg	0.063±0.0010a	0.056±0.0012b	0.027±0.0008b	0.028±0.0006b
20 µg	0.033±0.0010b	0.032±0.0011c	0.026±0.0007bc	0.023±0.0006c
30 µg	0.035±0.0013b	0.027±0.0007d	0.023±0.0006d	0.022±0.0003c
40 µg	0.033±0.0012b	0.028±0.0004d	0.023±0.0005cd	0.021±0.0004c
50 µg	0.031±0.0005b	0.025±0.0009d	0.020±0.0004e	0.017±0.0004d

*: a, b, c, d,e harfleri verilerin ortalamaları arasındaki farkı göstermektedir. Herbir sütündeki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiki olarak bir fark yoktur ($P>0.05$) (Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.5 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın CAT enzim aktivitesine etkileri (A:24 saat, B: 48 saat, C: 72 saat ve D: 96 saat)

*: kontrol grubu ile farkı göstermektedir ($P < 0.05$)

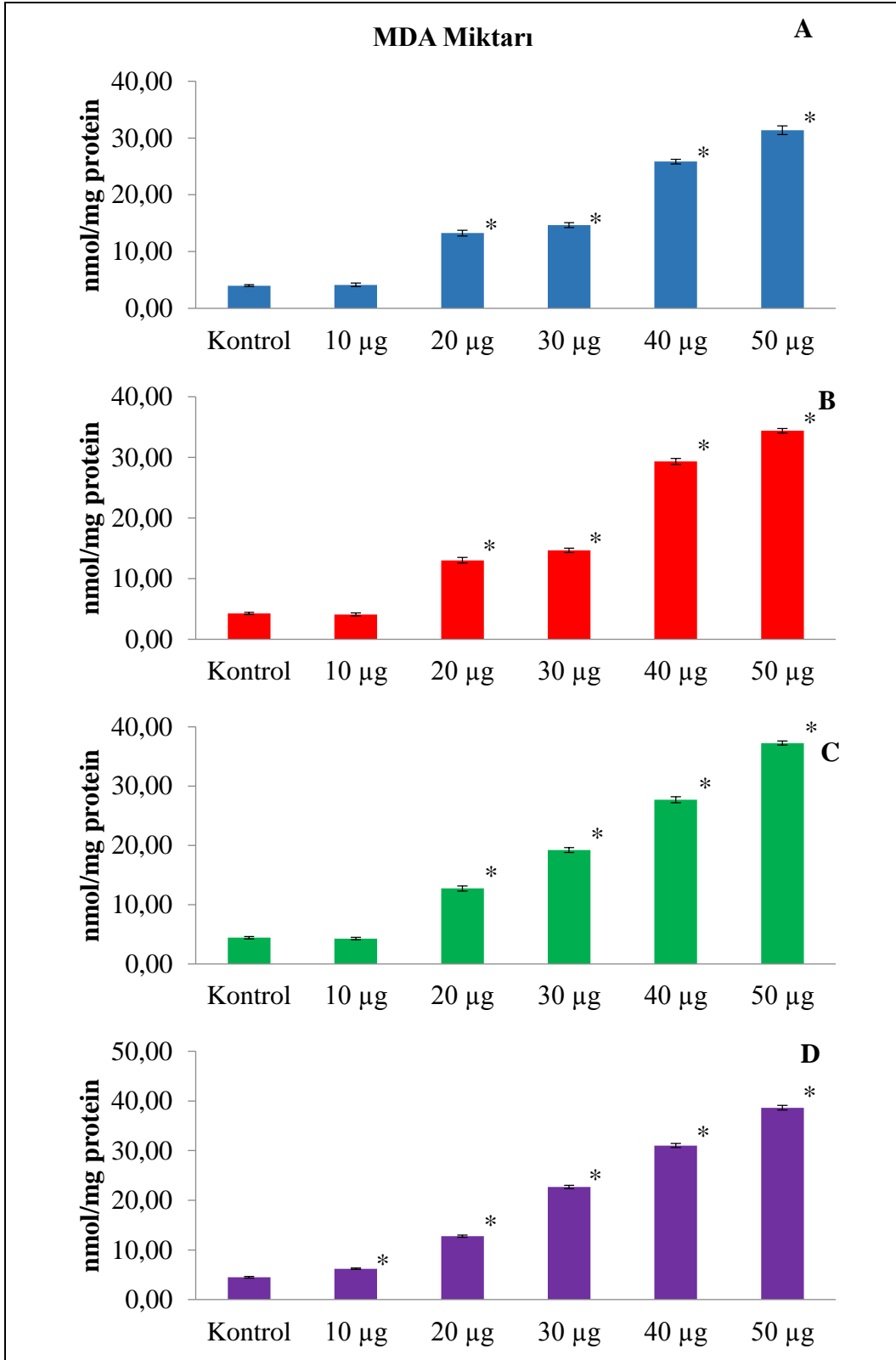
4.6. Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın MDA Miktarına Etkisi

Farklı thiamethoxam konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarının MDA miktarı üzerine olan etkileri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6' da gösterilmiştir. MDA düzeyleri 24, 48 ve 72. saatlerde en düşük thiamethoxam konsantrasyonu (10 µg) dışındaki dozlarda kontrol grubuna ve en düşük thiamethoxam konsantrasyonuna göre önemli ölçüde artmıştır ($P<0.05$). Doksan altıncı saatte kontrol grubunda 4.50 nmol/mg protein olan MDA seviyesi denenen tüm dozlarda önemli ölçüde artarak ($P<0.05$), sırasıyla 6.22 nmol/mg protein, 12.77 nmol/mg protein, 22.68 nmol/mg protein, 31.03 nmol/mg protein ve 38.64 nmol/mg protein olarak ölçülmüştür. MDA düzeylerindeki bu artışlar denenen tüm periyotlarda doza bağlı artış şeklinde gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.6 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın MDA miktarına konsantrasyona bağlı etkileri

Konsantrasyon	MDA (nmol/mg protein)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	3.99±0.158e	4.28±0.187e	4.42±0.198e	4.50±0.174f
10 µg	4.13±0.300e	4.12±0.241e	4.27±0.197e	6.22±0.129e
20 µg	13.25±0.507d	13.03±0.479d	12.73±0.427d	12.77±0.206d
30 µg	14.66±0.424c	14.68±0.371c	19.22±0.419c	22.68±0.310c
40 µg	25.85±0.390b	29.33±0.493b	27.70±0.516b	31.03±0.419b
50 µg	31.38±0.753a	34.39±0.381a	37.26±0.347a	38.64±0.470a

*: a, b, c, d, e, f harfleri verilerin ortalamaları arasındaki farkı göstermektedir. Herbir sütündeki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiki olarak bir fark yoktur ($P>0.05$) (Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.6 Thiamethoxamın *G. mellonella*'nın MDA miktarına etkileri (A:24 saat, B: 48 saat, C: 72 saat ve D: 96 saat)

*: kontrol grubu ile farkı göstermektedir ($P < 0.05$)

5. TARTIŞMA

Ksenobiyotiklere maruziyet sonucunda oluşan serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında antioksidan enzimler önemli rol oynarlar. Enzimatik antioksidanlar, bu radikal türevlerinin ya oluşumunu önleyerek ya da oluşmasına engel olunamayan bu radikalleri ortamdaki kaldırarak veya parçalanmalarını sağlayıp daha az zararlı bileşenlere dönüştürerek canlıları koruma işlevini yerine getirirler. Protein, lipid ve karbohidrat gibi biyomoleküller ise bu süreçte enerji kaynağı olarak kullanıldıkları için stres altındaki canlılarda miktarlarındaki değişimler nedeniyle biyolojik indikatör olarak kullanılan önemli makromoleküllerdir.

Çalışmamızda thiomethoxaminin subletal dozlarının bazı antioksidan savunma sistemi enzimleri, lipid peroksidasyon düzeyleri ve protein, lipid ve karbohidrat gibi biyomoleküller üzerine olan etkileri *G. mellonella*'da araştırılmıştır.

Canlılarda metabolizmanın işleyişi sırasında az miktarda serbest radikal normal koşullarda da üretilir, fakat bu az miktardaki radikal, sahip olunan enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmaları tarafından uzaklaştırıldığı veya ortadan kaldırıldığı için canlı üzerine zararlı bir etkide bulunmaz. Dışardan alınan serbest radikal oluşumunu indükleyen maddeler ise serbest radikal oluşumunu organizmanın sahip olduğu savunma mekanizmalarının ortadan kaldırabileceği düzeyin çok üzerine çıkardığı veya özellikle enzimatik antioksidanların yapılarında bozulmalara neden olduğu için oksidatif strese neden olmaktadır [129].

Vücuda alınan ksenobiyotikler çeşitli biyotransformasyon enzimleri tarafından daha az zararlı hale getirilmek için formasyon değişikliğine uğratılırlar. Asıl amacı daha az zararlı hale dönüştürmek olan bu işlem esnasında bazı ksenobiyotikler daha aktif formlara dönüşerek daha toksik bir hale gelebilir [130-132]. Ksenobiyotikler ve onların biyoaktivasyon ürünlerinin serbest radikallerin meydana gelmesini indüklediği ve oksidatif hasara yol açtığı bilinmektedir. Önemli bir ksenobiyotik grubu olan pestisitlerin toksik etkilerinin ortaya çıkarılmasında bu serbest radikaller önemli birer belirteçtir [38].

Cheung [133], kimyasal maddelerin neden olduğu stres koşullarında antioksidan enzim aktivitelerinde artışın genel bir kural olmadığını, stres faktörünün

konsantrasyonu veya uygulama süresine bağı olarak enzim aktivitelerinde artma veya azalmalar olabileceğini belirtmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda ise canlılarda laboratuvar koşullarına ağır metallere maruziyet, insektisit uygulamaları ve bakteri enfeksiyonu sonucu oluşturulan stres koşullarında antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler rapor edilmiştir [134-137].

Sunulan çalışmada *G. mellonella* larvalarında SOD aktivitesi, ilk 24 saatte sadece en yüksek konsantrasyonda olmak üzere, özellikle 48 saatten sonra doza bağı olarak önemli ölçüde azalmıştır. Katalaz enzimi ise SOD'ye benzer şekilde artan thiamethoxam konsantrasyonuna bağı olarak önemli azalmalar göstermiştir. Yapılan çalışmalar farklı pestisitlere maruz bırakılan böceklerde antioksidan enzim aktivitelerinde önemli ölçüde değişiklik gözleendiği gösterilmiştir [10,138,139].

Ksenobiyotiklere maruz kalma sonucunda antioksidan enzim aktivitelerinde artışın gerçekleşmesi toksik etkinin bir sonucu olarak gözlenen önemli bir reaksiyondur [138,140,141]. Böceklerde insektisit uygulaması sonucu SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artış gözleendiği farklı araştırmacılar tarafından gösterilmekle birlikte [10,142,143], çalışmamızda elde edilen veriler bu genel duruma uymamaktadır.

Pestisitler direkt olarak redoks döngüsüne girerek ROS miktarını artırır ve oksidatif strese neden olabilirler, bunun yanında redoks döngüsüne girmeden de antioksidan enzimlerin inhibisyonuna yol açıp oksidatif strese yol açabilirler [40]. Süperoksit radikali moleküler oksijene bir elektron eklenmesiyle oluşur ve SOD enzimi tarafından dismutasyona uğratarak hidrojen peroksidin oluşumuna yol açar. Oluşan hidrojen peroksid ise başlıca katalaz enzimi tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülür [34,127,144]. Fakat yüksek miktarda oluşan bu reaktif oksijen türevleri antioksidan enzim aktivitelerinde inhibisyon da neden olabilmektedir [118,119,145,146], fluoxastrobin uygulanmış balıklarda yüksek dozların aşırı miktarda reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına neden olduğunu, sonuçta kendi substratları olan SOD ve CAT aktivitelerinde azalmalara neden olarak lipid peroksidasyonuna yol açtığını belirtmiştir. Gultekin ve ark. [104], İn vitro olarak uygulanan klorpirifosetilin ROS üretimini arttırdığını buna bağı olarak da SOD ve CAT enzim aktivitelerinin azaldığını göstermişlerdir. Yan ve ark. [118] ve Keshta ve

ark. [108], thiamethoxamın balıklarda ve farelerde SOD ve CAT aktivitelerini azalttığıın göstermişlerdir. Benzer şekilde farklı organizmalarda, farklı pestisit uygulamalarının antioksidan enzim aktivitelerinde neden olduğu azalmalar [40,110,116,147], çalışmamızla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda antioksidan enzim aktivitelerinde ortaya çıkan bu azalmaların, artan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu antioksidan enzimlerin sistein yapılarının oksidasyonuna bağlı olarak aktivitesindeki azalmadan kaynaklandığını şeklinde yorumlanmıştır [148,149].

Malondialdehid lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak ortaya çıkan ve ksenobiyotiklerin neden olduğu toksik etkinin hücresel zararlarının belirlenmesinde kullanılan önemli bir indikatördür [9,10]. Sunulan çalışmada thiamethoxam enjekte edilen *G. mellonella* larvalarında'da MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Ortaya çıkan veriler daha önce ortaya konan çalışmalarla büyük ölçüde paralellik göstermektedir. Kayis ve ark. [10], DDVP uygulamasından sonra *G. mellonella*'da MDA düzeylerinin arttığını, Hamza ve ark. [150], *S. oryzae*'de metil avermektinin lipid peroksidasyona neden olduğunu belirtmişlerdir. Keshta ve ark. [108], ratlarda thiamethoxamın serbest radikal oluşumunu ve MDA miktarını artırdığını göstermiştir.

Artan reaktif oksijen türevlerinin antioksidan enzimlerce ortadan kaldırılamamasının bir sonucu olarak hücre membranında lipidlerin peroksidasyonu gerçekleşmektedir [151]. Sunulan çalışmada antioksidan enzim aktivitelerinde azalma ve MDA düzeyinin artması bu genel duruma uymaktadır.

Bütün canlılarda olduğu gibi böceklerde de proteinler büyüme, gelişme üreme ve enerji sentezinde, lipidler eşeyssel olarak erginliğe ulaşmada, yumurta üretiminde, hormonların sentezinde, enerji üretiminde, karbohidratlar ise başlıca enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır [152-158].

Protein, lipid ve karbohidratların canlılarda sentezi, depolanması, kullanımı ve dolayısıyla miktarı pestisitler ve ağır metaller gibi toksik ksenobiyotiklerin etkisiyle değişebilir [159]. Araştırmacılar bu enerji kaynaklarındaki azalmaların toksik metabolitlerin zehirli etkilerini ortadan kaldırmak için gerekli detoksifikasyon enzimleri ve ısı şok proteinlerinin sentezlenmesi ve bu metabolitlerin aktif olarak

uzaklaştırılmasında gerekli olan enerji için kullanıldığını belirtmişlerdir [102,112,160].

Sunulan çalışmada *G. mellonella*'nın toplam protein miktarında thiamethoxama bağlı olarak önemli bir değişiklik olmamakla birlikte toplam lipid ve toplam karbohidrat miktarları önemli ölçüde azalmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda insektisit etkisine maruz bırakılan böceklerde toplam protein miktarının önemli ölçüde değiştiği gösterilmiştir [161-163]. Ribeiro ve ark. [161], böceklerdeki protein içeriğinin pestisitlere maruziyet ile ortaya çıkan oksidatif stres altında, fizyolojik bir adaptasyon ile gelişen, protein katabolizmasında değişiklikler şeklinde ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada protein miktarının thiamethoxam dozlarına bağlı olarak önemli ölçüde değişmemesi daha önce yapılan çalışmalardan farklı bir durumdur. Bununla birlikte, Yücel [164] imidakloprid enjekte edilen *G. mellonella* larvalarında protein miktarlarının yalnızca yüksek konsantrasyonlarda azaldığını, Dağdevran [165] ise emamektin benzoat enjekte edilen *G. mellonella* larvalarında ise protein miktarında önemli bir değişiklik gözlenmediğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda protein miktarında gözlenen bu durumun uygulanan thiamethoxam konsantrasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan doz-yanıt ilişkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Böcekler çeşitli aktiviteler için gereksinimleri olan enerjiyi büyük oranda ve öncelikli olarak karbohidratlardan elde ederler [155,156].

Çalışmamızda elde edilen verilerde thiamethoxam konsantrasyonuna paralel olarak toplam karbohidrat miktarları önemli ölçüde azalmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar farklı insektisitlerin böceklerde karbohidrat miktarında benzer azalmalara neden olduğunu göstermiştir [109,164-166]. Elde edilen veriler thiamethoxamın neden olduğu stres altında artan enerji ihtiyacının karşılanmasında karbohidratların büyük oranda kullanıldığı fikrini uyandırmaktadır.

Böcekler ihtiyacı olan lipidleri öncelikli olarak besinlerden sağlarlar, lipidleri daha sonra kullanılmak üzere depolayabilir ve protein ve karbohidrat gibi diğer temel besinlerden sentezleyebilirler [167]. Sunulan çalışmamızda daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde thiamethoxam enjekte edilen *G. mellonella* larvalarında da lipid miktarı önemli ölçüde azalmıştır. Sak ve ark. [112] *P. turionellae*'da,

Fotouhi ve ark. [168] *B. mori*'de, Dağdevran [165] ve Yücel [164] *G. mellonella*'da farklı insektisitlerin toplam lipit miktarı üzerine çalışmamızdakine benzer şekilde etki ettiğini göstermişlerdir. Lipid miktarındaki bu azalmanın stres altında ihtiyaç duyulan enerjinin karşılanmasına yönelik adaptif azalma olduğu belirtilmiştir [112].

İnsektisit gibi toksik maddelerin vücuda alınmasından sonra detoksifiye edilerek zararsız hale dönüştürülmesi veya biyotransformasyona uğratarak daha az zararlı bileşikler haline dönüştürülerek vücuttan atılması canlının kendini koruması açısından elzemdir. Bu işlemler için gerekli olan detoksifikasyon enzimleri ve HSP (ısı şok proteinleri) sentezi ve oluşan metabolitlerin vücuttan aktif olarak atılması için enerji gereksinimi oldukça fazladır [102,112,160]. Elde edilen verilere göre ortaya çıkan total karbohidrat ve total lipid içeriğindeki azalmanın insektisitinden kaynaklı toksik stres altında, thiamethoxamın zararlı etkilerinin ortadan kaldırılmasında, yukarıda bahsedilen mekanizmaların işleyişi için böceğin ihtiyacı olan enerji ihtiyacının karşılanmasında kullanıldığı sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak thiamethoxam *G. mellonella*'ya önemli ölçüde etki ederek antioksidan enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu ve enerji metabolizması (protein, lipid ve karbohidrat) üzerine önemli ölçüde etki etmiştir. Azalan antioksidan enzim aktivitesi ile birlikte artan MDA düzeyleri oksidatif dengenin serbest radikaller lehine bozulduğunu ve membran lipidlerine zarar vererek hücresel düzeyde etkisinin yanında, enerji metabolizması üzerine etki ederek özellikle birincil enerji kaynakları olan karbohidrat ve lipidlerin metabolizmasını önemli ölçüde etkilemiştir.

Sonuçlar neonikotinoid grubu nispeten yeni ve sıklıkla kullanılan bir insektisit olan thiamethoxamın oksidatif stres parametreleri olan antioksidan enzimler (SOD, CAT), lipid peroksidasyonu (MDA) ve protein, lipid ve karbohidratlar gibi önemli biyokimyasal parametreler üzerine olan etkilerini *G. mellonella* gibi model bir organizmada göstermesi bakımından önemlidir.

Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, thiamethoxam zararlılarla mücadelede etkin olarak kullanılabilceği gibi, diğer canlılar üzerine de potansiyel toksik etkisinden dolayı bilinçli kullanılması gereken bir insektisittir.

KAYNAKLAR

- [1] M. Abdollahi, A. Ranjbar, S. Shadnia, S., Nikfar and A. Rezaie, "Pesticides and oxidative stress: a review", *Medical Science Monitor*, vol.10 no. 6, pp. 141-47, 2004.
- [2] D. Kumargal, "Neonikotinoitlerin kurbağa (*Rana ridibunda*) periferik sinirleri üzerine elektrofizyolojik etkilerinin araştırılması".Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, 2007.
- [3] W. Zhang, F. Jiang and J. Ou, "Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus", *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, vol. 1, no. 2, pp. 125-144, 2011.
- [4] Ş. Çakır ve Ş. Yamanel, "Böceklerde insektisidlere direnç", *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, vol. 6, Sayı 1. pp. 21-29, 2005.
- [5] Ç. Güler ve Z. Çobanoğlu, *Pestisitler*, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi Ankara,1997.
- [6] S. Feng, Z. Kong, X. Wang, P. Peng and E.Y. Zeng, "Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with comet assay and cytogenetic tests", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 61, no. 2, pp. 239-246, 2005.
- [7] N.U. Karabay and M.G. "Oguz, Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos", *Genetics and Molecular Research*, vol. 4, no. 4, pp.653-662, 2005.
- [8] M.B. Abou-Donia, L.B. Goldstein, S. Bulman T. Tu, W.A. Khan, A.M. Dechkovskaia and A.A. Abdel-Rahman, "Imidacloprid induces neuro behavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motorcortex and hippocampus in offspring rats following *in utero* exposure", *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 71, pp. 119–130, 2008.
- [9] I. Emre, T. Kayis, M. Coskun, O. Dursun and H.Y. Cogun, "Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae", *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 106, no. 3, pp. 371-377, 2013.
- [10] T. Kayis, M. Coskun, O. Dursun and I. Emre, "Alterations in antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation and ion balance induced by Dichlorvos in *Galleria mellonella* L." *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 108 no. 4, pp. 570-574, 2015.
- [11] J.E.M. Baillie, C. Hilton-Taylor, and S.N. Stuart, *2004 IUCN Red list of threatened species. A Global Species Assessment*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 2004.
- [12] O. Tiryaki, R. Canhilal ve S. Horuz, "Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri", *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol. 26, no. 2, pp. 154-169, 2010.
- [13] M. Kanbur, B.C. Liman, G. Eraslan and S. Altinordulu, "Effects of cypermethrin, propetamphos, and combination involving cypermethrin and propetamphos on lipid peroxidation in mice", *Environmental Toxicology*, vol. 23, no. 4, pp. 473 – 479, 2008.

- [14] N.V. Kovganko and Kashkan Zh.N., "Advances in the synthesis of neonicotinoids", *Russian Journal of Organic Chemistry*, vol. 40, no. 12, pp. 1709-1726, 2004.
- [15] W.M. Simpson and S.H. Schuman, "Recognition and management of acute pesticide poisoning", *American Family Physician*, vol. 65, pp. 1599–1604, 2002.
- [16] G.J.G.M. Smulders, J.H. Tjerk, T.J.H. Bueters, G.D.M. Regina, R.G.D.M. Van Kleef and H.P.M.V. Vijverberga, "Selective effects of carbamate pesticides on rat nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase", *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 193, pp. 139-148, 2003.
- [17] B. Weiss, S. Amler and R.W. Amler, "Pesticides", *Pediatrics*, vol. 113, no. 4, pp.1030 –1036, 2004.
- [18] D.E. Ray and J.R. Fry, "A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides", *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 111, no. 1, pp. 174-193, 2006.
- [19] T.J. Shafer, S.O. Rijal and G.W. Gross, "Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin", *Neurotoxicology*, vol. 29, no. 2, pp. 203-212, 2008.
- [20] D.M. Soderlund, "State-dependent modification of voltage-gated sodium channels by pyrethroids", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 97, no. 2, 78-86, 2010.
- [21] N. Mencke and P. Jeschke, "Therapy and prevention of parasitic insects in veterinary medicine using imidacloprid", *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 2, pp. 701–715, 2002.
- [22] W.D. Kollmeyer, R.F. Flattum, J.P. Foster, J.E. Powell, M.E. Schroeder and S. Soloway, *Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides*, in *Neonicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, ed. by Yamamoto I and Casida JE. Springer, New York, NY, pp. 71–89, 1999.
- [23] M. Tomizawa and J.E. Casida, "Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action". *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*, vol. 45, pp. 247-268, 2005.
- [24] M. Ihara, L.A. Brown, C. Ishida, H. Okuda, D.B. Sattelle and K. Matsuda, "Actions of imidacloprid, clothianidin and related neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors of American cockroach neurons and their relationships with insecticidal potency", *Journal of Pesticide Science*, vol. 31, no. 1, pp. 35–40, 2006.
- [25] M. Kazuhiko, S.D. Buckingham, D. Kleier, J.J. Rauh, M. Grauso and D. B. Sattelle, "Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors", *TRENDS in Pharmacological Sciences*, vol. 22, no. 11, pp. 573-580, 2001.
- [26] J. Casida and G.B. Quistad, "Why Insecticides are More Toxic to Insect Than People: The Unique Toxicology of Insects", *Journal of Pesticide Science*, vol. 29, pp. 81- 86, 2004.
- [27] C. Costa, V. Silvani, A. Melchini, S. Catania, J.J. Heffron, A. Trovato and R. De Pasquale, "Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation

- and composition of the commercial product”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 672, no. 1, pp. 40-44, 2009.
- [28] P. Jeschke and R. Nauen, “Review Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry”, *Pest Management Science*, vol. 64, pp. 1084–1098, 2008.
- [29] I. Laycock, K.C. Cotterell, T.A. O’Shea-Wheller and J.E. Cresswell, “ Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 100, pp. 153–158, 2014.
- [30] European Commission, “Bee Health: EU-wide Restrictions on Pesticide Use to Enter into Force”, European Commission, Brussels, 2013.
- [31] I. Yamamoto and J.E. Casida, *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptors*, Yamamoto, I., Casida, J.E. (Eds.) Springer-Verlag, Tokyo, 1999.
- [32] T. Green, A. Toghill, R. Lee, F. Waechter, E. Weber and J. Noakes, “Thiamethoxam Induced Mouse Liver Tumors and Their Relevance to Humans Part 1: Mode of Action Studies in the Mouse”, *Toxicological Sciences*, vol. 86, no. 1, pp. 36–47, 2005.
- [33] R. Nauen, U. Ebbinghaus-Kintscher, V.L. Salgado and M. Kaussmann, “Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 76, pp. 55–69, 2003.
- [34] J. Nordberg and E.S.J. Arnér, “Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system”, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 31, pp. 1287–1312, 2001.
- [35] T.P.A. Devasagayam, J.C. Tilak, K.K. Boloor, K.S. Sane, S.S. Ghaskadbi and R.D. Lele, “Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects”, *Journal of the Association of Physicians of India*, vol. 52, pp. 794-804, 2004.
- [36] A. Gümrükçüoğlu, *Serbest radikaller*, Erişim: genetikbilimi.com/serbest-radikaller, [erişim tarihi, 20.05.2017]
- [37] H. Karabulut ve M.Ş. Gülay, “Serbest Radikaller”, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, vol. 4, no. 1, pp. 50-59, 2016.
- [38] U. Mercan, “Toksikolojide serbest radikallerin önemi”. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, vol. 15, no. 1-2, 91-96, 2004.
- [39] A. Mohammad, R. Akram, S. Shahin, N. Shekoufeh and R. Ali, “Pesticides and oxidative stress”, *Annual Review of Medical Science Monitoring*, vol. 10, no. 6, 141-147, 2004.
- [40] V.I. Lushchak, “Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach”, *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 42, pp. 711-747, 2016.
- [41] B. Halliwell, and J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University, New York, 1999.
- [42] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncola, M.T.D. Cronin, M. Mazura and J. Telser, “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, pp. 44-84, 2007.

- [43] J.M. Mates, "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology", *Toxicology*, vol. 153, pp. 83-104, 2000.
- [44] R. Dringen, "Metabolism and functions of glutathione in brain". *Progress in Neurobiology*, vol. 62, pp. 649-671, 2000.
- [45] A. Valavanidis, T. Vlahogianni, M. Dassenakis and M. Scoullou, "Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 64, pp. 178-189, 2006.
- [46] A.D. Sarma, A.R. Mallick and A.K. Ghosh, "Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview", *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, vol. 1, no. 3, pp. 185-192, 2010.
- [47] G. Erenel, D. Erbaş ve A. Arıcıoğlu, "Serbest radikaller ve antioksidan sistemler". *Gazi Tip Dergisi*, vol 3, pp. 243-250, 1992.
- [48] E. Shacter, "Protein Oxidative Damage", *Methods in Enzymology*, vol. 319, pp. 428-436, 2000.
- [49] P.J. Thornalley and M. Vasak, "Possible role of metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress: Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 827, pp. 35-44, 1985.
- [50] B. Halliwell, "Free Radicals and Antioxidants: A Personal View". *Nutrition Reviews*, vol. 52, pp. 253-265, 1994.
- [51] A. Enayati, H. Ranson and J. Hemingway, "Insect glutathione transferases and insecticide resistance", *Insect Molecular Biology*, vol. 14, pp. 3-8, 2005.
- [52] R.V. Barbehenn, S.L. Bumgarner, E.F. Roosen and M.M. Martin, "Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen", *Journal of Insect Physiology*, vol. 47, pp. 349-357, 2001.
- [53] M. Hermes-Lima, J.M. Storey, and K.B. Storey, "Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: Storey K.B., Storey J.M. (Eds), Cell and Molecular Responses to Stress, Elsevier Press, Amsterdam, (2001).
- [54] C.B. Summers and G.W. Felton, "Antioxidant role of dehydroascorbic acid reductase in insects", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1156, pp. 235-238, 1993.
- [55] S. Sen, R. Chakraborty, C Sridhar, Y.S.R. Reddy and B. De, "Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 3, no. 1, pp. 91-100, 2010.
- [56] S. Sen and R. Chakraborty, "The role of antioxidants in human health. American Chemical Society, Oxidative Stress Diagnostics", *Prevention and Therapy*, vol. 1, pp. 1-37, 2011.
- [57] I. Fridovich, "Superoxide radical and Superoxide Dismutase", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 64, pp. 97-112, 1995.
- [58] I.S. Young and J.V. Woodside, "Antioxidants in health and disease", *Journal of Clinical Pathology*, vol. 54, no. 3, pp. 176-186, 2001.

- [59] H. Manduzio, B. Rocher, F. Durand, C. Galap and F. Leboulenger, "The point about oxidative stress in molluscs", *Invertebrate Survival Journal*, vol. 2, pp. 91-104, 2005.
- [60] N.H.P. Cnubben, I.M.C.M. Rietjens, H. Wortelboer, J. Van-Zanden and P.J. Van Bladeren, "The interplay of glutathione related processes in antioxidant defense", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 10, pp. 141-152, 2001.
- [61] D. Sheenan, G. Meade, V.M. Foley and C.A. Dowd, "Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily", *Biochemical Journal*, vol. 360, pp. 1-16, 2001.
- [62] S.J. Yu, "Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 80, pp. 113-122, 2004.
- [63] S. Ahmad, C.A. Pritsos, S.M. Bowen, C.R. Heisler, G.J. Blomquist and R.S. Pardini, "Subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in the southern armyworm, *Spodoptera eridania*", *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 7, pp. 173-18, 2005.
- [64] N. Krishnan and F. Sehnal, "Compartmentalization of oxidative stress and antioxidant defense in the larval gut of *Spodoptera littoralis*", *Archives in Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 63, pp. 1-10, 2006.
- [65] R.J. Reiter, D. Acuna-Castroviejo, T. Dun- Xian and S. Burkhardt, "Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system", *New York Academy of Sciences*, vol. 939, pp. 200-215, 2006.
- [66] N. Krishnan, D. Kodrik, B. Kludkiewicz and F. Sehnal, "Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata*", *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 39, pp. 180-188, 2009.
- [67] A.N. Kumar, P. Aruna, J.N. Naidu, R. Kumar and A.K. Srivastava, "Review of concepts and controversies of uric acid as antioxidant and pro-oxidant", *Archives Medical Review Journal*, vol. 24, no. 1, pp. 19-40, 2015.
- [68] D.A. Dickinson and H.J. Forman, "Cellular glutathione and thiols metabolism", *Biochemistry and Pharmacology*, vol. 64, pp. 1019-1026, 2002.
- [69] C. Mytilineou, B.C. Kramer and J.A. Yabut, "Glutathione depletion and oxidative stress", *Parkinsonism Related Disaeses*, vol. 8, pp. 385-387, 2002.
- [70] R.K. Murray, P.A. Mayes, D.K. Granner and V.W. Radwell, *Harper'in Biyokimyası. Çevirenler: Prof. Dr. Gülriz Menten, Prof.Dr. Biltan Ersöz. Baris Kitabevi. 1993.*
- [71] G.W. Burton, "Vitamin E. Molecular and biological function", *Proceeding of the Nutrition Society*, vol. 53, no. 2, pp. 251-262 1994.
- [72] L. Packer, S.U. Weber and G. Rimbach, "Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signaling", *Journal of Nutrition*, vol. 31, pp. 369-373, 2001.

- [73] A. Rigotti, "Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E", *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 28, pp. 423-36, 2007.
- [74] S.I. Baskin and H. Salem, "Oxidants, antioxidants, and free radicals", Washington DC: Taylor and Francis, pp. 79-120, 1997.
- [75] A. Aydın, A. Sayal ve A. İşimer, Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayn Kitapı, 2001
- [76] K. Iqbal, A. Khan and M.A.K. Khattak, "Biological significance of ascorbic acid (Vitamin C) in human health-a review". *Pakistan Journal of Nutrition* vol. 3, no. 1, pp. 5-13, 2004.
- [77] B. Desalegne, "Origin and characterization of honeybee (*A. mellifera*) pollen source around Utrecht University", The Netherlands. M.Sc thesis, Utrecht University, Faculty of Biology, (2001).
- [78] J.D. Ellis, J.R. Graham and A. Mortensen, "Standard methods for wax moth research", *Journal of Apicultural Research*, vol. 52, no. 1, pp. 1-17, 2013.
- [79] N. Ramarao, C. Nielsen-Leroux and D. Lereclus, The insect "*Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis", *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2, pp. 70-e4392, 2012.
- [80] L. Allan, *Wax Moth and Its Control*, Department of Agriculture, Western Australia, 2000.
- [81] B. Cymborowsky, "Temperature Dependent Regulatory Mechanism of Larval Development of the Wax Moth (*Galleria mellonella*)", *Acta Biochemical Polonica*, vol. 47, no. (1), pp. 215-221, 2000.
- [82] E. Akyol, "Mum Güvesi (*Galleria mellonella* L.) Zararı ve Kontrol Yöntemleri", *Arıcılık Araştırma Dergisi*, pp. 2-7, 2013.
- [83] K. Buyukguzel, "DNA gyrase inhibitors: Novobiocin enhances the survival of *Pimpla turionellae* larvae reared on an artificial diet but other antibiotics do not", *Journal of Applied Entomology*, vol. 125, pp. 583-587, 2001.
- [84] S.K. Sharma, T. Dai, G.B. Kharkwal, Y. Huang, L. Huang, V.J.B. De Arce, G.P. Tegos and M.R. Hamblin, "Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models", *Current Pharmaceutical Design*, vol. 17, no. 13, pp. 1303-1319, 2011.
- [85] P. Neumann, C.W. Pirk M.O. Schäfer and J.D. Ellis, "Standard methods for small hive beetle research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) The Coloss Beebook: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research", *Journal of Apicultural Research*, vol. 52, no. 4, 1-4, 2013.
- [86] V. Dietemann, F. Nazzi, S.J. Martin, D. Anderson, B. Locke, K.S. Delaplane, Q. Wauquiez, C. Tannahill, E. Frey, B. Ziegelmann, P. Rosenkranz and J.D. Ellis, *Standard methods for varroa research*. In V. Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The Coloss Beebook, Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>, 2013.
- [87] E. Mylonakis, A. Casadevall and F.M. Ausubel, "Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi", *PLoS Pathogens*, vol. 3, no. 7, pp. e101, 2007.

- [88] A. Vilcinskas, “Anti-infective therapeutics from the Lepidopteran model host *Galleria mellonella*”, *Current Pharmaceutical Design*, vol. 17, no. 13, pp. 1240-1245, 2011.
- [89] C.J. Tsai, J.M. Loh and T. Proft, “*Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing”, *Virulence*, vol. 7, no. 3, pp. 214-229, 2016.
- [90] K. Kavanagh and J.P. Fallon, “*Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence”, *Fungal Biology Reviews*, vol. 24, pp. 79-83, 2010.
- [91] E. Mylonakis, M.A. Frederick, G. Michael and C. Arturo, *Of model hosts and man: Using Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster and Galleria mellonella as Model Hosts for Infectious Disease Research*. In: Justin GB, Maged M, Mylonakis E, eds. Recent Advances on Model Hosts. Springer: London, 2012.
- [92] N. Banville, N., Browne and K. Kavanagh, “Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection”. *Virulence*, vol. 3, no. 6, pp. 497-503, 2012.
- [93] J.P. Fallon, N. Troy and K. Kavanagh, “Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses”, *Virulence*, vol. 2, pp. 413-421, 2011.
- [94] R. Krautz, B. Arefin and U. Theopold, “Damage signals in the insect immune response”, *Frontiers in Plant Science*, vol. 5, no. 342, pp. 1-11, 2014.
- [95] J.A. Hoffmann, “Innate immunity of insects”, *Current Opinion in Immunology*, vol. 7, pp. 4-10, 1995.
- [96] L.R. Scully and M.J. Bidochka, “Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens”, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 263, pp. 1-9, 2006.
- [97] K. Kavanagh and P.E. “Reeves, Insects and mammalian innate immune responses are much alike”, *Microbe*, vol. 2, pp. 596–599, 2007.
- [98] G. Alak, A. Ucar, V. Parlak, A. Cilingir-Yeltekin, I.H. Tas, D. Olmez, E.M. Kocaman, M. Yilgin, M. Atamanalp and T. Yanik, “Assesment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, gene expression and antioxidant enzyme activity on rainbow trout (*Oncorhynchus myskiss*) tissues exposed to biopesticide”, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, vol. 203, pp. 51-58, 2017.
- [99] G.L. Baron, N.E. Raine and M.J.F. Brown, “General and species-specific impacts of a neonicotinoid insecticide on the ovary development and feeding of wild bumblebee queens”, *Proceedings of the Royal Society of London*, 284, 20170123, 2017.
- [100] K. Buyukguzel, “Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: Effect on adult emergence, longevity and oxidative and antioxidative response of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae)”, *Journal of Economic Entomology*, vol. 99, pp. 1225– 1234, 2006.
- [101] O.L. Champion, S. Wagley and R.W. Titball, “*Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research”, *Virulence*, vol. 7, no. 7, pp. 840-845, 2016.

- [102] J. Choi, H. Roche and T. Caquet, "Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae", *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology and Pharmacology*, vol. 130, no. 1, pp. 11-17, 2001.
- [103] F.M. El-Demerdash, A.B. Jebur and H.M. Nasr, "Oxidative stress and biochemical perturbations induced by insecticides mixture in rat testes", *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 48, no. 7, pp. 593-599, 2013.
- [104] F. Gultekin, M. Ozturk and M. Akdogan, "The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (*invitro*)". *Archives of Toxicology*, vol. 74, pp. 533-538, 2000.
- [105] M. Henry, M. Béguin, F. Requier, O. Rollin, J.F. Odoux, P. Aupinel, J. Aptel, S. Tchamitchian and A. Decourtye, "A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees", *Science*, vol. 336, no. 6079, pp. 348-350, 2012.
- [106] U. Kapoor, M.K. Srivastava, S. Bhardwaj and L.P. Srivastava, "Effect on Imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats to derive its No observed Effect Level (NOEL)", *The Journal of Toxicological Sciences*, vol. 35, no. 4, pp. 577-581, 2010.
- [107] U. Kapoor, M.K. Srivastava and L.P. Srivastava, "Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats", *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 49, pp. 3086-3089, 2011.
- [108] A.T. Keshta, A.A. Hataba, H.M.I. Mead and N.M. El-Shafey, "Oxidative Stress and Biochemical Changes Induced by Thiamethoxam and Acetamiprid Insecticides in Rats", *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, Vol. 5, no. 6, pp. 44-60, 2016
- [109] N. Kissoum and N. Soltani, "Spiromesifen, an insecticide inhibitor of lipid synthesis, affects the amounts of carbohydrates, glycogen and the activity of lactate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*", *Journal of Entomology and Zoology Studies*, vol. 4, no. 1, pp. 452-456, 2016.
- [110] M.M. Noshay, A. Saad-Hussein, E.M. Shahy, H.M. El-Shorbagy, M.M. Taha and E.A. Abdel-Shafy, "Assessment of Anticholinesterase Toxicity, Oxidative Stress and Antioxidant Status in Carbamate and Organophosphorus Pesticides-Exposed Agricultural Workers" *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 9, no. 3, pp. 205-209, 2017.
- [111] F. Piri, A. Sahragard and M. Ghadamyari, "Sublethal effects of spinosad on some biochemical and biological parameters of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae)", *Plant Protection Science*, vol. 50, no. 3, pp. 135-144, 2014.
- [112] O. Sak, F. Uckan and E. Ergin, "Effects of cypermetrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae)", *Belgian Journal of Zoology*, vol. 136, no. 1, pp. 53-58, 2006.
- [113] A.S. Saraiva, R.A. Sarmiento, A.C.M. Rodrigues, D. Campos, G. Fedorova, V. Žlábek, C. Gravato, J.L.T. Pestana and A.M.V.M. Soares, "Assessment of

- thiamethoxam toxicity to *Chironomus riparius*” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 137, pp. 240–246, 2017.
- [114] A.H. Smina, B. Samira, D. Mohamed and B. Houria, “Evaluation of acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and catalase activities in the land snail *Helix aspersa* exposed to thiamethoxam”, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, vol. 4, no. 5, pp. 369-374, 2016.
- [115] D.A. Tavares, C. Dussaubat, A. Kretzschmar, S. M. Carvalho, E.C.M. Silva-zacarin, O. Malaspina, G. Berail, J.L. Brunet and L.P. Belzunces, “Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages” *Environmental Pollution*, Vol. 229, pp. 386-393, 2017.
- [116] J. Velisek and A. Stara, “Effect of thiacloprid on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*)” *Chemosphere*, vol. 194, pp. 481-487, 2018.
- [117] P. Vohra and K.S. Khera, “Alteration in key enzymes and micromorphology of vital organs during exposure of imidacloprid in albino rats”, *International Journal of Advanced Research*, vol. 3, no. 3, pp. 134-144, 2015.
- [118] S.H. Yan, J.H. Wang, L.S. Zhu, A.M. Chen and J. Wang, “Thiamethoxam induces oxidative stress and antioxidant response in zebrafish (*Danio rerio*) Livers”, *Environmental Toxicology*, vol. 3, pp. 2006-2015, 2016.
- [119] C. Zhang, T. Zhou, J. Wang, S. Zhang, L. Zhu, Z. Du and J. Wang, “Acute and chronic toxic effects of fluoxastrobin on zebrafish (*Danio rerio*)” *Science of the Total Environment* vol. 610, pp. 769–775, 2018.
- [120] J.K. Bronskill, “A cage to simplify the rearing of greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae)”, *Journal of the Lepidopterists' Society*, vol. 15, no. 2, pp. 102-104, 1961.
- [121] J.D. Finney, *Probit Analysis*, 3rd eds. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1971.
- [122] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, “Protein measurement with the folin phenol reagent”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–75, 1951.
- [123] T. Kayış, “Diazinonun subletal konsantrasyonlarının *Pimpla turionellae* L.'nin eşey oranı ve bazı biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri” Doktora Tezi, . Çukurova Üniversitesi, 2010.
- [124] E. Van Handel, “Rapid determination of glycogen and sugar in mosquitoes”, *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 1, pp. 299-301, 1985a.
- [125] E. Van Handel, “Rapid determination of total lipids in mosquitoes”, *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 1, pp. 302- 304, 1985b.
- [126] Y. Sun, L.W. Oberley and Y. Li, “A simple method for clinical assay of superoxide dismutase”, *Clinical Chemistry*, vol. 34, no. 3, pp. 497–500, 1988.
- [127] H. Aebi, “Catalase *in vitro*”, *Methods in Enzymology*, pp. 121-126, 1984.
- [128] D. Bar-Or, L.T. Rael, E.P. Lau, N.K.R. Rao, G.W. Thomas, J.V. Winkler, R.L. Yukl, R.G. Kingston and C.G. Curtis, “An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala -His- Lys) prevents formation of copper induced reactive oxygen species”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 284, pp. 856–862, 2001,

- [129] M. Serafini and D. Del Rio, "Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the total antioxidant capacity the right tool?", *Redox Report*, vol. 9, no. 3, pp. 145-152, 2004.
- [130] C. Öncüer, *Tarımsal zararlılarla savaş yöntemleri ve ilaçları*. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, Aydın, 2000.
- [131] N. Vural, *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 2005.
- [132] A. Tsagkarakou, T.V. Leeuwen, A. Khajehalit, M. Grispou, M.S. Williamsons, L. Tirry and J. Vontas, "Identification of pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)", *Insect Molecular Biology*, vol. 18, no. 5, pp. 583- 593, 2009.
- [133] C.C.C. Cheung, G.J. Zheng, A.M.Y. Li, B.J. Richardson and P.K.S. Lam, "Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*", *Aquatic Toxicology*, vol. 52, pp. 189-203, 2001.
- [134] L. Li, X. Lui, Y. Guo and E. Ma, "Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidae)", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 20, pp. 412-416, 2005.
- [135] K. Zaman, R.S. MacGill, J.E. Johnson, S. Ahmad and R.S. Pardini, "An insect model for assessing mercury toxicity: effect of mercury on antioxidant enzyme activities of the housefly (*Musca domestica*) and the cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*)", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 26, no. 1, pp. 114-118, 1994.
- [136] J. Venkateswara Rao, "Toxic effects of novel organophosphorous insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 86, pp. 78-84, 2006.
- [137] I.M. Dubovskiy, V.V. Martemyanov, Y.L. Vorontsova, M.J. Rantala, E.V. Gryzanova and V.V. Glupov, "Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae)", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, vol. 148, pp. 1-5, 2008.
- [138] E. Buyukguzel, "Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion", *Journal of Economic Entomology*, vol. 120, no. 1, pp. 152-159, 2009.
- [139] A. Aslanturk, S. Kalender, M. Uzunhisarcikli and Y. Kalender, "Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae", *Journal of Entomological Research Society*, vol. 13, pp. 27-38, 2011.
- [140] Z. Adamski, K. Ziemnicki, K. Fila, R. Zikic and A. Stajn, "Effects of long-term exposure to fenitrothion on *Spodoptera exigua* and *Tenebrio molitor* larval development and antioxidant enzyme activity", *Biology Letters*, vol. 40, pp. 43-52. 2003.

- [141] T. Kayis, I. Emre and M. Coskun, "Effects of diazinon on antioxidant enzymes and adult emergence of the parasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)", *Türk Entomoloji Dergisi*, vol. 36, no. 4, pp. 463-471, 2012.
- [142] R. Muthusamy and S. Rajakumar, "Antioxidative response in a silkworm, *Bombyx mori* larvae to dichlorvos insecticide", *Free Radicals and Antioxidants*, vol. 6, pp. 158-163, 2016.
- [143] A.M.F. Al-Barty, "Laboratory evaluation of superoxide dismutase (SOD) of methylamine avermectin control of the rice red weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored wheat grains", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 6, no. 4, pp. 979-983, 2014.
- [144] P.A. Wickens, "Ageing and the free radical theory", *Respiration Physiology*, vol. 128, pp. 379-391, 2001.
- [145] M.E. Yonar, "Protective effect of lycopene on oxidative stress and antioxidant status in *Cyprinus carpio* during cypermethrin exposure", *Environmental Toxicology*, vol. 28, pp. 609-616, 2013.
- [146] Y.N. Han, T. Liu, J.H. Wang, J. Wang, C. Zhang and L.S. Zhu, "Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 133, pp. 13-19, 2016.
- [147] W. Ge, S. Yan, J. Wang, L. Zhu, A. Chen and J. Wang, "Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*)". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 63, pp. 1856-1862, 2015.
- [148] T.V. Bagnyukova, O.L. Chahrak and Lushchak, "Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress". *Aquatic Toxicology*, vol. 78, pp. 325-331, 2006.
- [149] M.S.T. Dimitrova, V. Tsinova and V. Velcheva, "Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C*, vol. 108, pp. 43-46, 1994.
- [150] R.Z. Hamza, A.M.F. Al-Barty and R.S. Rashwan, "Evaluation of toxic effect of methylamine avermectin on malondialdehyde activity in the rice red weevil *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) in stored rice grains". *Biosciences Biotechnology Research ASI*, vol. 11, no. 1, pp. 295-299, 2014.
- [151] F.G. Uzun, S. Kalender, D. Durak, F. Demir and Y. Kalender, "Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E". *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, pp. 1903-1908, 2009.
- [152] R.H. Dadd, *Nutrition Organisms* In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. pp: 313-390. Kerkut G.A. and Gilbert L.I. (eds.). Pergamon Press, Oxford, U.K. 1985.
- [153] D.M. Olson, H. Fadamiro, J.G. Lundgren and G.E. Heimpel, "Effects of Sugar Feeding on Carbohydrate and Lipid Metabolism in a Parasitoid Wasp", *Physiological Entomology*, vol. 25, pp. 17-25, 2000.
- [154] R.O. Ryan and D.J. Van der Horst, "Lipid transport biochemistry and its role in energy production", *Annual Review of Entomology*, vol. 45, pp. 233-260, 2000.

- [155] J.C. Lee, G.E. Heimpel and G.L. Leibe, “Comparing floral nectar and aphid honeydew diets on the longevity and nutrient levels of a parasitoid wasp”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 111, pp. 189-199, 2004.
- [156] L. Chen and H.Y. Fadamiro, “Comparing the effects of five naturally occurring monosaccharide and oligosaccharide sugars on longevity and carbohydrate nutrient levels of a parasitic phorid fly, *Pseudacteon tricuspis*”, *Physiological Entomology*, vol. 31, pp. 46-56, 2006.
- [157] D. Giron and J. Casas, “Lipogenesis in an adult parasitic wasp”, *Journal of Insect Physiology*, vol. 49, pp. 141–147, 2003.
- [158] T. Mentel, C. Duch, H. Stypa, G. Wegener, U. Muller and H.J. Pfluger, “Central modulatory neurons control fuel selection in flight muscle of migratory locust”, *The Journal of Neuroscience*, vol. 23, pp. 1109-1113, 2003.
- [159] M.A. Saleem, A.R. Shakoori and D. Mantle, “Macromolecular and enzymatic abnormalities induced by a synthetic pyrethroid, Ripcord (cypermethrin) in adult beetles of stored grain pests, *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Col. Tenebrionidae)”, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 39, pp. 144-154, 1998.
- [160] M. Maryanski, P. Kramarz, R. Laskowski and M. Niklinska, “Decreased energetic reserves, Morphological changes and accumulation of metals in Carabid Beetles (*Poecilus cupreus* L.) exposed to Zinc or Cadmium contaminated food”. *Ecotoxicology*, vol. 11, pp. 127–139, 2002.
- [161] S. Ribeiro, J.P. Sousa, A.J.A. Nogueira and A.M.V.M. “Soares, Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 49, pp. 131- 138, 2001.
- [162] M. Rashwan, “Biochemical impacts of rynaxypyr (Coragen) and spinetoram (Radiant) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.)”, *Nature and Science*, vol. 11, no. 8, pp. 40-47, 2013.
- [163] E.H. Shaurub and M.N. Abd El-Aziz, “Biochemical effects of lambda-cyhalothrin and lufenuron on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae)”, *International Journal of Mosquito Research*, vol. No. 3, pp. 122-126, 2015.
- [164] S.Yücel, İmidakloprid’in *Galleria mellonella*’nın Bazı Biyokimyasal Parametrelerine ve Hemositleri Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman üniversitesi, 2017.
- [165] B. Dağdevran, Emamektin Benzoatın *Galleria mellonella* ’nın Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman üniversitesi, 2017.
- [166] N.M. Elbarky, H.F. Dahi and Y.A. El-Sayed, “Toxicological evaluation and biochemical impacts for radiant as a new generation of spinosyn on *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae”, *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, vol. 1, no. 2, pp. 85 -97, 2008.
- [167] J.H. Werren, “Labile sex ratios in wasps and bees”, *Bioscience*, vol. 37, pp. 498-506, 1987.
- [168] K. Fotouhi, M.M. Fazel and A. Kavaousi, “Effects of pyriproxyfen on bioenergetic resources of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae)” *Türk Entomoloji Dergisi*, vol. 39, no. 1, pp. 11-22, 2015.

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Murat ALTUN
Doğum Yeri : Adıyaman
Doğum Tarihi : 28.05.1979
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mraltun02@hotmail.com

Eğitim Durumu

Derece	Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Biyoloji	Adıyaman Üniversitesi	2018
Lisans	Fen Bilgisi	İnönü Üniversitesi	2005
Lise	Sayısal	Adıyaman Lisesi	1996

Yayımlar

- 1- Kayış Tamer, Coşkun Mustafa, Emel Yalçınkaya, Emre Mehmet İskender, Mehmet Sait Yücel, Emre Gülsu, Turan Tankut, Altun Murat “Alternatif Model Organizma Olarak *Galleria mellonella* Büyük Balmumu Güvesinin Kullanımı”. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. Konya, TÜRKİYE, 2015.
- 2- Tamer Kayış, Mustafa Coskun, Murat Altun “Effect of Thiamethoxam on Total Hemocyte Counts of *Galleria mellonella*” ECE 2018, Napoli, Italy, 2018.