

**ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ORGANOFOSFORLU İNSEKTİSİT FENTHİON' UN *Galleria mellonella* L.' NİN
ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ VE LİPİT PEROKSİDASYONU
ÜZERİNE ETKİLERİ**

EMEL YALÇINKAYA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADYAMAN

2013

TEZ ONAYI

Emel YALÇINKAYA tarafından hazırlanan “Organofosforlu insektisit fention’un *Galleria mellonella* L’nin antioksidan savunma sistemi ve lipit peroksidasyonu üzerine etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Mustafa COŞKUN

Jüri Üyeleri:

Yrd.Doç.Dr. Mustafa COŞKUN

Adıyaman Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Yrd.Doç.Dr. Tamer KAYIŞ

Adıyaman Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Yrd.Doç.Dr.Ahmet GENÇ

Adıyaman Üniversitesi Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Mustafa ÖZDEN

İmza

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ORGANOFOSFORLU İNSEKTİSİT FENTHİON' UN *Galleria mellonella* L' NİN ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ ve LİPİD PEROKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

Emel YALÇINKAYA

Adıyaman Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN: Yrd.Doç.Dr. Mustafa COŞKUN

Yıl: 2013, **Sayfa:**66

ÜYE: Yrd.Doç.Dr. Tamer KAYIŞ

ÜYE: Yrd.Doç.Dr.Ahmet GENÇ

Yapılan çalışmada organofosforlu bir insektisit olan fenthionun farklı subletal konsantrasyonlarının (2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00 µg/100 g besin) model organizma *Galleria mellonella* larvalarında oksidatif stres oluşturma potansiyelleri ve antioksidan enzimler ve lipit peroksidasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. CAT (katalaz), SOD (süperoksit dismutaz) aktiviteleri, MDA (malondialdehit) ve protein miktarları spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Fenthion protein düzeylerinde azalmaya neden olurken MDA miktarında, CAT aktivitesinde artışa neden olmuştur. Düşük fenthion dozları SOD aktivitesini artışa neden olurken yüksek fenthion dozları SOD aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır.

Bu sonuçlara göre fenthion'un oksidatif strese bağlı toksisitesi, CAT and SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini etkileyerek oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Galleria mellonella*, Antioksidan Enzimler, MDA, Fenthion

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF THE ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDE FENTHION ON ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM and LIPID PEROXIDATION LEVEL OF *Galleria mellonella*L.

Emel YALÇINKAYA

Adiyaman University

Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

ADVISOR:Asst.Prof.Dr. Mustafa COŞKUN

Year: 2013, **Page:**66

Member:Asst.Prof.Dr. Ahmet GENÇ

Member:Asst.Prof.Dr. Tamer KAYIŞ

In the present study, the effects of different sublethal concentrations (2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00 µg/100 g diet) of fenthion, an organophosphate insecticide, was investigated about the potency to induce oxidative stress and effect on antioxidant systems with model organism of *Galleria mellonella* larvae. Protein, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities were determined spectrophotometrically. Fenthion treatment caused a decrease in protein levels, while an increase in MDA levels and CAT enzyme activity were observed. The lower doses of fenthion increased SOD activity of wax mount *G. mellonella*, whereas SOD activity was decreased by the higher doses. In conclusion the oxidative stress-inducing potential of fenthion effects antioxidant enzymes such as CAT and SOD activity.

Keywords:*Galleria mellonella*, antioxidant enzyme, malondialdehyde (MDA), Fenthion

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
İÇİNDEKİLER	III
TESEKKÜR	VI
SİMGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1 Organoklorlu İnsektisitler	2
1.2 Karbamat Grubu İnsektisitler	2
1.3 Piretroid İnsektisitler (Piretrum)	2
1.4 Organosforlu İnsektisitler	2
1.5 Oksidatif Stres	3
1.6 Serbest Radikaller	6
1.7 Serbest Oksijen Radikalleri	6
1.7.1 Süperoksit radikali	7
1.7.2 Hidroksil radikali	7
1.8 Hidrojen peroksit	8
1.9 Singlet oksijen	9
1.10 Serbest Radikallerin Kaynakları	9
1.10.1 Biyolojik kaynaklar	9
1.10.2 İntrasellüler kaynaklar	10
1.11 Serbest Radikallerin Etkileri	10
1.11.1 Membranlipidlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu)	10

1.11.2 Proteinlere etkileri	11
1.11.3 Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri	11
1.11.4 Karbonhidratlara etkileri	12
1.12 Antioksidan Savunma Sistemi	12
1.12.1 Katalaz(hidrojen-peroksit:hidrojen-peroksitoksidoredüktaz)(CAT)	13
1.12.2 SüperoksitDismutaz (Süperoksit:süperoksitoksidoredüktaz) (SOD)	14
1.12.3 Glutatyontransferaz ve GlutatyonPeroksidaz (glutatyon:hidrojen peroksit oksidoredüktaz) (GSH-Px)	16
1.12.4 Glutatyonredüktaz (glutatyon:NADP+ oksidoredüktaz) (GSH-Rd)	16
1.12.5 E vitamini	17
1.12.6 C vitamini	17
1.12.7 A vitamini	17
1.12.8 Ürik asit	17
1.12.9 Albümin ve bilirubin	18
1.12.10 Melatonin	18
1.13 İnsektisitlerin etkileri	18
2.KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1 Materyal	23
3.1.1 Deney böceklerinin elde edilmesi	23
3.1.2 Kontrol besinin hazırlanması	23
3.1.3 Deney besinlerinin hazırlanması	24
3.1.3.1 Fenthion içeren besinlerin hazırlanması	24
3.1.4 Kimyasal maddeler	25
3.1.5 Cihazlar ve Gereçler	26

3.2 Yöntem	27
3.2.1 Böceklerin homojenizasyonu	27
3.2.2 Protein tayini	27
3.2.3 SüperoksitDismutaz (SOD) aktivitesinin tayini	29
3.2.4 Katalaz (CAT) aktivitesinin tayini	33
3.2.5 MDA(Malondialdehyde) tayini	33
3.2.6 Verilerin değerlendirilmesi	33
4.BULGULAR	35
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	42
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	56

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, sayın Yrd.Doç.Dr. Mustafa COŞKUN' a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan Adıyaman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca sayın Yrd.Doç.Dr.Tamer KAYIŞ ve Yrd.Doç.Dr.Ahmet GENÇ hocama teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans projemizi (FEFYL2011/0013) maddi olarak destekleyen Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin akademik ve idari personeline teşekkür ederiz.

SİMGELER DİZİNİ

AChE	Asetilkolinesteraz
CAT	Katalaz
Cu/ZnSOD	Bakır/çinko süperoksitdismutaz
DDT	Diklorodifeniltrikloretan
DNA	Deoksironükleik asit
FeSOD	Demir süperoksitdismutaz
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyonperoksidaz
GSH-Rd	Glutasyonredüktaz
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon –S-Transferaz
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
MDA	Malondialdehid
MnSOD	Mangan süperoksitdismutaz
NADPH	Nikotinamidadenininükleotid fosfat
NBT	Nitrobluetetrazolium
OP	Organofosforluinsektisitler
OH	Hidroksil
LD ₅₀	Letal doz
O ₂ –	Süperoksit radikal
LO –	Alkoksil radikal
LOO –	Peroksil radikal
LOOH	Lipithidroperoksit
HOCl	Hipoklorik asit
1O ₂	Singlet oksijen
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RO	Alkoksil
ROO	Peroksil radikali
ROOH	Organik peroksitler
SOD	Süperoksitdismutaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. Bronksil (1961) tarafından hazırlanan bal, petek, kepek, gliserin ve saf....	25
sudan oluşan yarı sentetik besini içerisindeki <i>G. mellonella</i> larvaları	
Şekil 4.1 Fenthionun <i>Galleria mellonella</i> larvalarında SOD aktivitesi üzerine etkisi	37
Şekil 4.2 Fenthionun <i>G. mellonella</i> larvalarının CAT aktivitesine etkisi.....	37
Şekil 4.3 Fenthionun <i>G. mellonella</i> larvalarının MDA miktarına etkisi.....	38
Şekil 4.4 Fenthionun <i>G.mellonella</i> larvalarının Protein miktarı korelasyonu	39
Şekil 4.5 Fenthionun <i>G. mellonella</i> larvalarının SOD ve CAT aktivitesinin korelasyonu	41
Şekil 4.6 Fenthionun <i>G.mellonella</i> larvalarının MDA miktarı ve CAT aktivitesinin korelasyonu	40
Şekil 4.7 Fenthionun <i>G. mellonella</i> larvalarının SOD aktivitesinin ve MDA miktarının korelasyonu	41
Şekil 4.8 Fenthionun <i>G.mellonella</i> larvalarının MDA miktarının, CAT ve SOD aktivitesinin korelasyonu	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Önemli ROS ve RNOS Özellikleri.....	5
Çizelge 3.1 Fenthion içerikli besin ve miktarları.....	25
Çizelge 3.2 Lowry ve ark. (1951) protein miktarı ölçüm prosedürü.....	29
Çizelge 3.3 Sun ve ark. (1988) SOD aktivitesi ölçüm prosedürü.....	31
Çizelge 3.4 Aebi (1984) CAT aktivitesi ölçüm prosedürü.....	33
Çizelge 4.1 Fenthionun SOD, CAT aktivitesi ve MDA, protein miktarlarına etkileri.....	36
Çizelge 4.2 Fenthion'a maruz kalan <i>Galleriamellanella</i> larvalarının protein, CAT, SOD ve MDA değerlerinin korelasyonu.....	42

1.GİRİŞ

Tarımda verimliliği artırmak amacıyla bilinçsiz ve sürekli kullanılan pestisitler hem ekolojik hem de ekonomik kayıplara yol açan kimyasal ve fiziksel maddelerdir. Asıl amacı besin maddelerine zarar veren haşereleri ve diğer zararlıları (pestleri) yok etmektir. İnsektisitler (organofosforlar, organoklorinler, carbamatlar), rodentisitler (antikoagulantlar), herbisitler (paraquat, diquat, 2,4-diklorophenoxyasetik asid [2,4-D]), fungusitler (e.g, dithiokarbamatlar , captan) ve fumigantlar (etilen dibromid, metil bromid) zararlıları öldürmek için kullanılan pestisitlerdir (Ellenhorn vd. 1997).

Pestisitler, kullanılmaları ile gerek halk sağlığı ve gerekse açlıkla savaşta besinlerin korunması bakımından faydalar sağlamaktadırlar. Diğer taraftan geniş bir alanda bıraktıkları kalıntılarla ekolojik sistemin ve uygulandığı ortamda hedef olmayan diğer canlıların dengesini bozmaktadır. Pestisitlerin bu fayda zarar ilişkisini değerlendirmek ise oldukça güçtür. Ucuz olması, kısa sürede sonuç alınması ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle çeşitli insektisitlerin kullanıldığı kimyasal mücadele tercih edilmektedir. Kullanılan insektisitlerin genelde nörotoksikan olup juvenil hormon analoglarını da etkilerler. Böceklerin merkezi sinir sistemleri (MSS) gelişmiş olup, memelilerinkine benzer. Aynı şekilde perifer sinir sistemleri (PSS) de benzerlik gösterir. Bu nedenle insektisitlerin toksik etki mekanizmaları ve hedef aldıkları organlar bütün türlerde aynıdır. Ancak bu toksik etki şiddetli dozla (maruziyet süresi ve düzeyi, biyotransformasyon hızı, absorpsiyon yoluna bağlı olarak) ilgilidir. Sinir sisteminde sodyum, potasyum, klorür iyonlarının membran transportunu interfere ederek (organik klorlular, piretroidler gibi); spesifik enzimleri inhibe ederek; veya sinir uçlarındaki kimyasal nörotransmitterleri etkileyerek (organofosforlular, karbamatlar gibi) nörotoksitelerini gösterirler (Ecobichon vd. 1991). İnsektisitler, kimyasal yapılarına göre: Organoklorlular, organofosfor esterleri, N-karbamat türevleri ve pretiroid gibi organik yapıda olanlar; kalsiyum arsenat gibi anorganik yapıda olanlar şeklinde sınıflandırılabilirler. Ayrıca sentetik (DDT gibi) ve bitkisel (nikotin gibi) kaynaklı olmak üzere de ayrılabilirler.

1.1 Organoklorlu Yapısındaki İsektisitler

Organoklorlu insektisitler klor, hidrojen ve karbon içerir. Organoklorinler bekte MSS uyarıcı olup etki mekanizmaları farklı olabilir.

Klorlu hidrokarbon grubu insektisitler, kimyasal yapılarına göre 3 sınıfta toplanırlar;

a) Diklorodifeniletan yapısında (DDT, metoksiklor gibi)

b) Klorlu siklodien yapısında (aldrin, dieldrin gibi)

c) Klorlu benzen ve sikloheksan yapısında olanlar(Ecobichon vd. 1991).

1.2 Karbamat Grubu İsektisitler

Karbamik asit türevleri, bitki korumasında geniş lde kullanılmaktadırlar. Karbamik asitin N-metilkarbamik asit aril esterleri insektisit olarak kullanılırlar. N-arilkarbamik asitlerin alkil esterleri ise kuvvetli herbisitler olup, monokotiledon yabancı otlara karşı kullanılırlar. Bazı karbamat asit türevlerinin ise, fungusit aktiviteleri de vardır (Ecobichon vd. 1991) .

1.3 Piretroid İsektisitler (Piretrum)

En güvenilir ve çok kullanılan insektisitler arasındadır. Piretroidlerin, memeliler için oldukça güvenli fakat böcekler için son derece toksik olmaları, yüksek etkinliği, kolay biyobozunurluk ve dşuk toksisite özellikleri ve çevrede bu nedenle birikmemeleri en önemli özellikleridir (Kale vd. 1999).

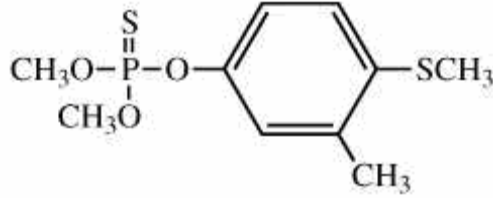
1.4 Organofosforlu (OP) İsektisitler

Organofosforlu (OP) insektisitler, dünya çapında yaygın olarak kullanılan pestisit grubu olup, pestisitlerin önemli bir kısmını oluşturmakta ve canlı organizmalar üzerinde istenmeyen etkilere neden olmaktadır. OP, hem insanlarda hem de hayvanlarda merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemi etkilemektedir. (OP), fosforik asitten elde edilen ve çoğunlukla kolinesteraz önleyici çok tehlikeli kimyasal ajanlardır. Organafosforlar vücutta asetilkolinesteraz (AChE) karboksilik ester, kimotripsin gibi

hidrolazlar, plazma veya butirilkolinesteraz (BuChE), plazma ve hepatik karboksilesteraz, paraksonaz ve diğer nonspesifik esterazların fonksiyonunu engeller (Abdollahi vd. 1999). Bazı bölgelerde çiftçiler tarafından en çok kullanılan organofosforlardan biri Fenthion'dur (o,o-dimetil-o-(4 metilmerkaptto-3- metilfenil)-fosforotioat).

Fenthion için bazı ortak ticaret unvanları Avigel, Avigrease, Entex, Baytex, Baycid, DALF, DMPT, Mercaptophos, Prentox, Fenthion'un 4E, Queletox ve Lebaycid vardır (Extoxnet 2003). Fenthion'un granül, sıvı, toz konsantreleri mevcuttur ve ıslatılabilir toz formülasyonları bulunmaktadır. Fenthion bir insektisit ve avisiddir.

Formülü:



Fiziksel özellikleri: Saf madde renksiz ve hemen hemen kokusuzdur.

Kaynama noktası: 0.01 mmHg'da 87°C

Çözünürlüğü: 20°C suda 54-56 ppm, gliserid yağları, aseton, etanol ve birçok organik çözücüde çözünebilmektedir.

Stabilitesi: 160°C'ye kadar stabil, ışığa ve alkaline hidrolizine karşı dirençlidir.

Buhar basıncı (Uçuculuğu) : 20°C'de 4×10^{-5} mmHg. Fenthion çevrede fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişimlere sebep olmaktadır. Fenthion'un karaciğer ve beyinde lipit peroksidasyonu oluşturduğu, DNA'nın tek ipliğinde kırıklara neden olduğu bulunmuştur. Bu toksik etkilere de Fenthion'un oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve/veya serbest radikallerin neden olduğu tespit edilmiştir (Bagchi vd. 1995).

1.5 Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve bunların son derece yıkıcı doğası en az otuz yıldır bilinen bir gerçektir. Bunların çeşitli hayati organlara patofizyolojik etkileri büyüktür ve bunların diğer etkileri hâla merak uyandırmaktadır. Oksidatif stres en basit şekilde hücre

tabakasının lipid peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi ile vücudun antioksidan savunma sistemi arasında dengesizlik olarak tanımlanabilir. Vücutta serbest radikaller oksidatif stresin bir durumu olarak kronik ve kalıcı hasarlara neden olabileceğinden canlının korunması için antioksidanlar geliştirilir (Harman 1999). ROS, süperoksit anyonları (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijenli solunum sonucu sürekli oluşturulduğu gibi radyasyon ışınları, ozon, sigara, bazı ilaçlar, pestisitler gibi kimyasal ajanlara maruz kalınmasından dolayı hücre ve dokularda oluşur (Davies ve Dean 1997). ROS hücresel bileşenlerde oksidatif zararlara neden olmaktadır, böylece bozulmalara ve yaşlanmaya sebep olur (Orr ve Sohal 1994, Hermes-Lima ve Zenteno- Savín 2002). Serbest radikal oluşumunun bir sonucu olarak, hücrelerde sürekli enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar gerçekleşir (Halliwell 1994).

Oksidatif stresin tam doğasını anlamak için, serbest radikal üretiminin prensipleri ve vücudun normal savunma sistemini açıklamak gereklidir.

Çizelge1. Önemli ROS ve RNOS özellikleri

$O_2^{\cdot -}$	Süperoksit anyonu	Organizmada çeşitli kaynaklardan oluşur. Oluşum yerinden fazla uzağa difüzenmez ve ROS oluşur.
H_2O_2	Hidrojen peroksit	Serbest radikal değildir. Fe,Cu gibi metaller ile serbest radikal oluşturup, hücre membranının içine ve dışına geçebilir.
OH^{\cdot}	Hidroksil radikali	Biyolojik moleküllere en kuvvetli atak yapan ve H_2O_2 varlığında, metal iyonu varlığında oluşan radikallerdir.
$RO^{\cdot},R^{\cdot},R-S^{\cdot}$	Organik radikaller	Sırasıyla ROH, RH, RSH gibi moleküllerden köken alırlar.
$RCOO^{\cdot}$	Peroksil radikali	LOO^{\cdot} Olarak da gösterilen, lipid yıkımından oluşan peroksil radikali
HOCl	Hipoklor asidi	Zararlı mikroorganizmaları yıkan nötrofil oksidatif patlama reaksiyonunda üretilir. HOCl halogenizasyon ve oksidasyon reaksiyonları için toksiktir.
$O_2 \uparrow \downarrow$	Singlet Oksijen	Yüksek oksijen basıncında UV ışını <i>in vivo</i> toksik etkisi yoktur.
NO	Nitrik Oksid	NO sentaz ile endojen iyonlarına bağlanır. O_2 ve diğer O_2 içeren radikallere farklı RNOS'lar üretilir.

1.6 Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir veya daha fazla çiftlenmemiş elektronlar içeren atom ya da molekül olarak tanımlanır. Atomlarda elektron dağılımı incelendiğinde elektronların kabuklarda olduğu görülür. Kabuklar alt kabuklardan, alt kabuklar da elektron içeren orbitallerden oluşur. Serbest radikallerin dış orbitalleri, genellikle eşleşmemiş elektron içerir (Halliwell vd. 1994). Radikaller üç farklı mekanizma ile oluşur: Yüksek sıcaklıkla kimyasal bağların kırılması, normal bir molekülün elektron kaybetmesi ve normal bir moleküle elektron transferi şeklinde meydana gelirler. Bu radikallerin başlıcaları; singlet oksijen ($1O_2$), süperoksit anyonu ($\cdot O_2^-$), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil ($ROO\cdot$) ve alkoksil ($RO\cdot$) radikalleridir (Kaur ve Kapoor 2001).

1 - Radikaller:

Süperoksit radikal (O_2^-)

Hidroksil radikal (OH^-)

Alkoksil radikal (LO^-)

Peroksil radikal (LOO^-)

2 - Radikal olmayanlar:

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Lipit hidroperoksit ($LOOH$)

Hipoklorik asit ($HOCl$)

3 - Singlet oksijen

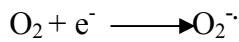
1.7 Serbest Oksijen Radikalleri

Oksijen, aerobik canlılardaki oksidasyon reaksiyonlarında son elektron tutucusu olması ve solunumda rol alması nedeniyle önemlidir (Phillips vd. 2003). Vücutta meydana gelen radikaller her zaman tehlikeli kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif formlara dönüştürülmesi zorunludur. Örneğin, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu için radikal yapımı şarttır. Oksijen birer elektronu eksik iki oksijen atomundan meydana gelmiştir. Ancak bu şekilde oksijen reaktif değildir, çünkü her iki atom belli bir dengededir. Diğer bir

tarafından yaşam için mutlaka gerekli olan oksijen, canlı yaşamının sona erdirilmesinde de etkili olan faktörlerin başında gelir. Normal metabolizmada moleküler O₂'nin büyük bir kısmı oksidazlar yoluyla suya çevrilmektedir. Geriye kalan kısmı ise oksijenazlar yoluyla hücre içi organellerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştiren, membranlarda oksidatif yıkıma neden olan reaktif toksik ürünlere dönüştürülür. Başka bir deyişle oksijenin canlılardaki toksik etkisinin oksijen radikalleri olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması esnasında meydana gelen reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Metabolik olayların normal seyrinde oksijen toplam dört elektron kabul edebilir. Oksijene bir elektron eklenmesi süperoksit anyonu, iki elektron eklenmesi hidrojen peroksit, üç elektron eklenmesi hidroksil radikali ve dört elektron eklenmesiyle su oluşur (Kaur vd. 2001).

1.7.1 Süperoksit radikali

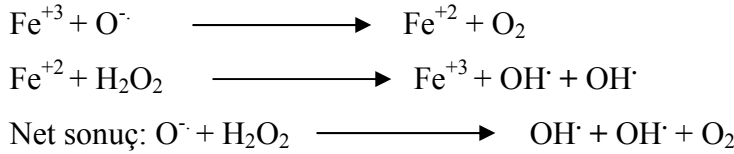
Canlılarda oluşan ilk radikal olarak bilinen süperoksit yüzlerce enzimin katalitik etkisiyle, enerji metabolizmasıyla ve biyolojik moleküllerin aerobik ortamda oksitlenmesiyle meydana gelir. Moleküler oksijenin dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron vardır. Dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilir. Hücresel koşullarda oluşan süperoksit, orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu (süperoksit radikali O₂⁻) iki elektron alması ile tehlikeli olan peroksil anyonu oluşur. O₂⁻ bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir ve oluşan peroksil anyonu ortamdaki iki proton alarak hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturabilir (Halliwell vd. 1994).



1.7.2 Hidroksil radikali

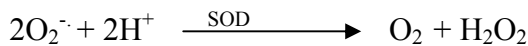
Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve toksik etkili olanı hidroksil radikali (OH[•]) dir. OH[•] nin yüksek reaktivitesi nedeniyle istenmeyen toksik etkileri yanı sıra, üretilmeleri normal biyolojik fonksiyonlar için de gereklidir. OH[•] ile oluşan en iyi tanımlanmış hasar, lipid peroksidasyonunda serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar

geçirgenliği artırarak ölümüne sebep olur. Bu radikal fagositoz ve pek çok enzimatik tepkimenin bir parçası olarak üretilir ve kataliz olayına doğrudan katılır. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşabilir (Cheeseman ve Slater 1993, Halliwell 1999, Song 2004). H₂O₂'nin UV ışığına maruz kalması ile OH[·] oluşabilir. OH[·] hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton Reaksiyonu), H₂O₂ 'nin O₂⁻ ile reaksiyonu (Haber-Weiss Reaksiyonu) ile de oluşur. Hidrojen peroksidin Fe⁺² ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenmesi (Fenton Reaksiyonu) ile veya O₂⁻ ile reaksiyonu sonucunda (Haber-Weiss Reaksiyonu) OH[·] oluşur (Nordberg ve Arner 2001, Deaton ve Marlin 2003).



1.8 Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit (H₂O₂) hücreler için toksik olmakla beraber, özellikle indirgenmiş metal iyonlarıyla reaksiyona girdiğinde önemli serbest radikal hasarına neden olmaktadır. O₂⁻ 'ye bir elektron transferi (süperoksit dismutasyonu) ya da O₂'ye iki elektronun eklenmesi (indirgenme) ile meydana gelir. Yapısında paylaşılmamış elektron bulunmadığından radikal özelliği taşımaz ve bu yüzden reaktif tür değildir. Oksitleyici olarak bilinmesinin nedeni demir, bakır gibi metallerin varlığında hidroksil radikalinin öncüsü olarak davranmasıdır. H₂O₂ proteinlerdeki hem grubunda bulunan demirle birleşerek yüksek oksidasyon seviyesindeki reaktif demir atomlarını oluşturur. Oksitleyici özelliği nedeniyle hücreden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu görevi antioksidanlar gerçekleştirir (Deaton ve Marlin 2003).



1.9 Singlet oksijen

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Dismutasyon tepkimeleri sırasında kendiliğinden ve enzimlerin etkileriyle meydana gelir (Halliwell vd. 1994).

1.10 Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller başlıca, oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır. Ayrıca, organik maddelerin çürümesi, plastik maddelerin işlenmesi gibi endüstriyel işlemlerde oksijenin kısmen redüksiyonu ile oluşabilmektedir (Thomas 1995). Serbest radikallerinin kaynakları:

I - Normal biyolojik işlemler

a - Oksijenli solunum

b - Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

Ksenobiotik maddelerin etkisi

III- Oksidan enzimlerdir.

1.10.1 Biyolojik kaynaklar

Biyolojik kaynaklar aktive olmuş fagositler (solunumsal patlama = respiratory burst), antineoplastik ajanlar (bleomisin, adriamicine), radyasyon ışınlarına maruz kalma , alışkanlık yapan maddeler (alkol ve uyuşturucular), çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı)ve stres serbest radikal oluşumuna neden olan biyolojik kaynaklardır (Thomas 1995).

1.10.2 İntrasellüler kaynaklar

Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tioller

Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, hemoglobin. Mitokondrial elektron transportu. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (stokrom P-450).

Peroksizomlar: oksidazlar, flavoproteinler.

Plazma membranı: lipit peroksidasyonu.

Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma (Bendich vd. 1986).

1.11 Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, genelde iç ve dış etkenlere bağılı olarak üretimlerindeki artışı takiben başta zar fosfolipitleri olmak üzere hücrenel bileşiklerin tümüne (karbonhidrat, lipit, protein, DNA) zarar vermekte, membranlar depolarize olmakta, detoksifikasyon enzimlerin aktivitesi artmakta, hücre zarının geçirgenliği ve elektriksel yük dengesi değişmektedir (Kavas 1989, Sinclair vd. 1990). Hücrede başlıca mitokondri olmak üzere hücre zarı, lizozomlar, peroksizomlar, çekirdek ve endoplazmik retikulumda lokalize olur (Bendich vd. 1986).

1.11.1 Membran lipitlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu)

Lipit peroksidasyonu biyolojik karmaşık bir süreçtir. Poliansatüre (doymamış) yağ asitleri serbest radikal hasarına karşı hassastırlar. Bu oksidatif hasara “Lipit Peroksidasyonu” denir. Yağ asitlerinin oksidasyonu reaktif bir radikal tarafından yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar. Karbon merkezli radikal oluşması ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipit hidroperoksitleri meydana gelir. Lipit hidroperoksitleri, lipit peroksidasyonunun erken aşamasını oluşturur ve çok uzun ömürlüdür. Böylece zincirleme reaksiyon başlar. Lipit hidroperoksitlerinin yıkımı ile de biyoaktif aldehitler meydana gelir. Bunlardan en önemlisi MDA (malondialdehit) dir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir, ya da diffüze olarak diğer hücrelerde hasar yaratırlar. Aerobik bir ortamda gerek

metabolizma reaksiyonları sırasında, gerekse dış etkenlere bağlı olarak meydana gelen oksijen kaynaklı radikaller, lipoproteinlerde ve hücre zarında bulunan lipitlerde (çoklu doymamış yağ asitleri, PUFA) oksidasyona sebep olur. Lipit hidroperoksitleri ile nihai yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı MDA lipit peroksidasyonunun indeksi olarak kabul edilir. Lipit peroksitlerinin konsantrasyonları arttıkça, membranların akışkanlıkları azalır ve kalsiyum gibi iyonların hücre içine geçişi kolaylaşır ve nihayet hücre fonksiyonlarında bozukluklar ortaya çıkar. Sonuçta membran akışkanlığında azalma ve permeabilite değişiklikleri meydana gelir (Kavas 1989). MDA hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlar doğurur. MDA bu özelliklerinden dolayı DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir (Kavas 1989).

1.11.2 Proteinlere etkileri

Proteinlerin, serbest radikal hasarından ne derece etkileneceği aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir (Kavas 1989). Doymamış bağlar ve -SH içeren moleküller ile triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenir. İmmüoglobulinler gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerde oksidasyon sonucu radikaller meydana gelir ve proteinin üç boyutlu yapısı bozulur. Polipeptit yapısında yer alan bazı amino asitlerin karbon atomlarından, reaktif oksijen molekülleri, özellikle de hidroksil radikali etkisiyle hidrojen atomunun koparılması sonucu radikaller oluşur (Kavas 1989).

1.11.3 Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca etkileşime girer ve değişikliklere yol açar. Sitotoksiste, büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Radyasyonla

oluşan serbest radikaller, DNA'yı olumsuz bir şekilde etkileyerek hücrede tamir edilemeyen mutasyonlara ve ölüme yol açarlar (Kavas 1989).

1.11.4 Karbonhidratlara etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit meydana gelir. Bunlar diabet gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar. Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkariti olan hyalüronik asit, sinovyal sıvıda bol bulunur. Bazı eklem hastalıklarında sinovyal sıvıya çok sayıda hücre göç eder ve ekstraselüler sıvıya H_2O_2 ve O_2^- salgırlarlar (Kavas 1989).

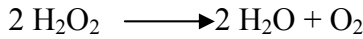
1.12 Antioksidan Savunma Sistemi

Canlı vücudunda serbest radikallerin yol açtığı hasarı ortadan kaldırmak için çeşitli mekanizmalar vardır. Vücudun temel ve en önemli savunma mekanizması antioksidan ajanlardır. Antioksidanlar vücutta zararlı etkileri olan serbest radikallere ve oksidatif strese karşı savunma sağlayan suda ya da yağda çözünebilen hayati biyomoleküllerdir (Nice 1997). Bunlara “antioksidan savunma sistemleri”, bu sistemde kullanılan moleküllere ise “antioksidanlar” denir. Antioksidanlar endojen (doğal) ve eksojen kaynaklı olabilirler. Doğal antioksidanlar, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimatik antioksidanlar ve askorbik asit, glutatyon, α - tokoferol ve β -karoten gibi non-enzimatik antioksidanlardan oluşmuştur (Ferreira vd. 2005). Eksojen antioksidanlar ise folik asit, NADPH oksidaz inhibitörleri ve sitokinler gibi bazı maddelerdir. Antioksidanlar organizmada etkilerini; serbest radikal oluşumunu engelleyerek, reaktifleri uzaklaştırarak, oksijeni uzaklaştırarak, katalitik metal iyonlarını yok ederek, oluşan radikalleri uzaklaştırarak, oluşan radikalleri daha az etkili hale dönüştürerek, oksidanları yok ederek (temizleme), bir hidrojen atarak ve baskılayarak veya serbest radikallerin oluşturdukları hasarı ortadan kaldırarak gösterirler. Böylece serbest radikaller tarafından proteinler ve DNA okside olmaktan korunmuş olur.

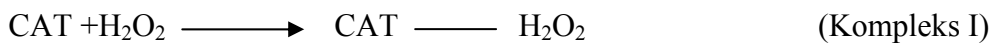
1.12.1 Katalaz (hidrojen-peroksit: hidrojen-peroksit oksidoredüktaz) (CAT)

Bir metalloenzim olarak bilinen CAT enzimi peroksizomlarda ve sitozolde bulunan en etkili protein katalistlerinden biridir. CAT, hematin ve demir içeriğine sahip dört hematin grubu bulundurur (Aebi 1974). Başka bir deyişle aktif kısmında dört tane ferrihem grubu (Fe^{3+}) bulunduran bir hemoproteindir. Her alt ünite aynı zamanda enzimi kendi substratı H_2O_2 'ye karşı koruyan ve etkinliğini artıran NADPH içerir (Halliwell ve Gutteridge 1999, Aydın vd. 2001, Nordberg ve Arner 2001). SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksit (H_2O_2), CAT enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüştürülmektedir (Duthie vd. 1989). CAT bir demir ya da manganeezi kofaktör olarak kullanıp, su ve oksijen ile hidrojen peroksit dönüşümünü katalize eden enzimlerdir (Zámocký vd 1999, Chelikani vd. 2004).

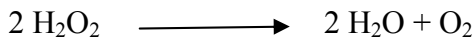
CAT



Katalazın bu reaksiyonu iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, kompleks I olarak ifade edilen ara ürün oluşur. Bu ara ürün, hidrojen peroksidin enzime bağlanması ile oluşur. Kompleks I'ın ikinci hidrojen peroksit molekülüyle reaksiyonu, su ve moleküler oksijen oluşumuyla sonuçlanır (Chance vd. 1979, Gebicka vd. 1989, Akertek 1994).



CAT



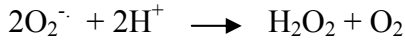
Katalaz, H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarında daha etkilidir. Daha düşük H_2O_2 konsantrasyonunun söz konusu olduğu durumlarda, bu aktif türün sönmülmesinde glutatyon peroksidaz (GSH-Px) daha etkilidir (Duthie vd. 1989). Hidrojen peroksit (H_2O_2), biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmemekte ve $OH\cdot$

radikali gibi daha reaktif oksidanların oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır.

1.12.2 Süperoksit Dismutaz (Süperoksit: süperoksit oksidoredüktaz) (SOD)

SOD hemen hemen tüm aerobik hücrelerde ve hücre dışı sıvılarda bulunan metalloenzimlerdir (Johnson vd 2005). Lepidopteran böceklerin hemolenfinde ve çeşitli dokularında süperoksit radikal üretimi ve SOD aktivitesi görülmüştür (Felton ve Summers 1995, Arakawa 1994). Bu enzim, süperoksit anyonunun ($\cdot\text{O}_2^-$), hidrojen perokside (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltmaktadır.

Bu reaksiyon, süperoksit anyonunun pH 11 ve altında oldukça stabil olmasına rağmen, enzim katalizi olmasa bile normal fizyolojik pH değerlerinde oldukça hızlı yürümektedir. H_2O_2 , SOD tarafından katalizlenen dismutasyon tepkimesi sonucu ortaya çıkar ki süperoksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluştururlar. Tepkime sonucu radikal olmayan ürünler (H_2O_2 ve O_2) meydana geldiğinden bu bir dismutasyon tepkimesi olarak bilinir (Fridovich 1975).

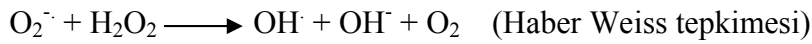
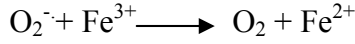


H_2O_2 bir serbest radikal olmadığı halde, ROS içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile tepkimeye girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan $\text{OH}\cdot$ oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Bannister 1980, İnan 1998).



Bu tepkimeye Haber-Weiss Tepkimesi adı verilir. Haber-Weiss tepkimesi ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz cereyan edebilir. Fakat katalizörsüz tepkime oldukça yavaş ilerler. Demir gibi geçiş metalleri ile katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır (Küçükaksu 1993, Adalı 1998, Yanbeyi ve Eren 1999). Bu tepkimede önce Ferri demir

(Fe³⁺) süperoksit tarafından Ferro demire (Fe²⁺) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak “Fenton Tepkimesi” ile hidrojen peroksitten OH⁻ ve OH[·] üretilir. Tepkime mekanizması aşağıdaki gibidir. (Basaga 1987)



Görüldüğü gibi süperoksit hem hidrojen peroksit kaynağı, hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. Bu tepkimeler (Fenton ve Haber-Weiss Tepkimeleri) Mn⁺ varlığında hızlanabilir. İndirgenmiş geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) okside şekillerine göre H₂O₂'den daha reaktiftir (Mısra ve Fridovich 1972, Bannister vd. 1987, Inan 1998).

Bununla birlikte, gerçekte tüm aerobik organizmaların SOD içerdiği belirlenmiştir. SOD enzimi reaksiyon hızını artırmak için yeterince güçlü bir katalisttir. Süperoksit anyonu (O₂⁻) da, H₂O₂ gibi bir oksidan olarak çoğu organik bileşikle direkt olarak reaktif değildir ancak muhtemelen daha reaktif ve yüksek toksisiteye sahip oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Tütün bitkisinin yaşlı yapraklarında membran hasarının bir işareti olarak SOD ve CAT enzim aktiviteleri azalma göstermektedir. Bu iki enzimin aktivitesi ve yapraklardaki lipid peroksidasyonunun derecesi arasında çok açık bir korelasyon belirlenmiştir. Bu enzimlerin, yaprağı lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerinden korumada önemli rolleri olduğu ileri sürülmektedir (Larson 1988). Oksijen radikallerine karşı en önemli savunma sistemi arasında SOD enzimleri bulunmaktadır (Fridovich 1995). SOD aerobik organizmalarda süperoksit radikallerini oksijen ve hidrojen peroksite katalizleyen bir metalloenzimdir (Fridovich 1975). Oksidatif strese karşı korumada önemli rol oynar (McCord ve Fridovich 1969, Bannister vd. 1987, Ahmad 1992, Felton ve Summers 1995). SOD ailesi sitozolde bulunan Cu/SOD, mitokondri de bulunan Zn/SOD ve ekstrasellüler enzim (EC-SOD) den oluşur (Bordo vd. 1994).

1.12.3 Glutasyon transferaz ve Glutasyon Peroksidaz (glutasyon:hidrojen peroksit oksidoredüktaz) (GSH-Px)

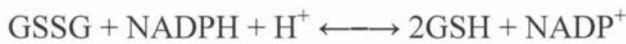
Oksidatif stres boyunca üretilen hidrojen peroksit için düzenleyici enzim olarak GSH özelleşmiştir (Zenkov vd. 2001). Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan aynı zamanda dokuları hasara karşı koruyup vücut ısısını sabit tutan hücresel antioksidanlardır (Sokolovskii 1988). Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutasyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutasyon, biyolojik membranları lipit peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir. Aktivitesi için Se mineraline ihtiyaç duyan GSHPx enzimi, glutasyonun indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş hale (GSSG) dönüştürmektedir (Sokolovskii 1988).



Glutasyon aynı zamanda hücre içinde singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit anyonu ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksi ($\cdot\text{OH}$) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir (Larson 1988).

1.12.4 Glutasyon redüktaz (glutasyon:NADP+ oksidoredüktaz) (GSH-Rd)

H_2O_2 'in detoksifikasyonu reaksiyonunda okside formuna dönüşen glutasyonun tekrar kullanılabilmesi için redükte GSH' a dönüştürülmesi gerekmektedir. Glutasyon redüktaz NADPH varlığında glutasyon disülfiti tekrar redükte glutasyona (GSH) çevirir (Hermes-Lima vd. 2001).



1.12.5 E vitamini

En önemli antioksidanlardan biri olarak kabul edilmiştir. E vitamini ROS ve lipit peroksil radikallerini inhibe eder. Böylece, fosfolipit membranları oksidatif hasar ve lipit peroksidasyonuna karşı korur, plazmada çok düşük dansiteli lipoprotein, hücrel proteinlerin, DNA'nın ve membranların dejenerasyonu engeller (Bendich vd. 1986).

1.12.6 C Vitamini

C vitamini ekstrasellüler sıvılarda bulunan suda çözünen ve belki de en önemli antioksidandır. Peroksil radikal tarafından başlatılan lipit peroksidasyonu inhibe eden en etkili antioksidandır (Nice 1997, El-Demerdash vd. 2005). Buna ek olarak askorbik asit peroksil radikal, süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikal ve singlet oksijen için etkili bir radikal tutucudur (Nice 1997). C vitamininin diğer bir özelliği de antioksidan özelliğinin yanı sıra oksidan olarak da görev yapmasıdır. Çünkü vitamin C ferri demiri ferro demire indirir böylece fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile etkileşmeye uygun olan ferro demir oluşur. Reaksiyon sonucunda ise $O_2^{\cdot -}$ nin oluşmasına yol açar. Bu özelliğinden dolayı bir prooksidan olarak değerlendirilir (Bendich vd. 1986, Lunec ve Blake 1990).

1.12.7 A Vitamini

A vitamini lipofiliktir, $O_2^{\cdot -}$ radikalini yok eder ya da peroksil radikali ile reaksiyona girerler (Nice 1997).

1.12.8 Ürik asit

Pürin metabolizmasının bir ara ürünüdür. Ürik asit, hidrofildir ve $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ ve peroksil radikallerini sönmeler. Geçiş metalleri ile bağ yaparak C vitaminin oksitlenmesini engeller (Nice 1997).

1.12.9 Albumin ve bilirubin

Albumin vücutta birçok fonksiyonuna ek olarak bakır iyonunu bağlama yeteneğine de sahiptir ve böylece bakır iyonuna bağlı lipit peroksidasyonunu ve OH[•] oluşumunu inhibe eder. Albumin kandaki yağ asitlerini de taşır, ayrıca bilirubin de albumine bağlanır. *In vivo* ortamda bilirubin, lipit peroksidasyonunda antioksidan olarak rol oynar. Muhtemelen *in vivo* ortamda bilirubin, albumine bağlı yağ asitlerinin peroksidasyonunu önleyebilmektedir (Reiter 1998).

1.12.10 Melatonin

Melatonin güçlü bir antioksidandır (Tan vd. 2007). Melatonin kolaylıkla hücre zarı ve kan-beyin bariyerine geçer (Reiter vd. 2009) Hidroksil radikalleri ile reaksiyona girdikten sonra indolil katyon radikaline dönüşür bu da ortamdaki O₂⁻ 'ni tutarak antioksidan aktivite gösterir (Reiter 1998).

1.13 İnsektisitlerin Etkileri

Tarımsal zarara sebep olan en önemli canlı grubu böceklerdir. Lepidoptera takımına ait türler bu grup içerisinde önemli bir yer tutmaktadır. Böcekler tarımsal ürünlerin çeşitlilik, kalite, verim, depolama, pazarlama kalitesini düşürürken aynı zamanda çeşitli hastalıkların taşınmasında aracı olduklarından halk sağlığı açısından da tehdit oluşturmaktadır. Lepidoptera takımına ait zararlı türlerin yapay besinler ile kültüre alınması ekoloji ve fizyolojilerinin yanında bunların farklı evrelerindeki bazı metabolik olaylarının moleküler düzeyde incelenmesine de olanak sağlar (Pohlon ve Badwin 2001, Büyükgüzel vd. 2002, Tunaz vd. 2003). Böylece geliştirilen yeni insektisitlerin arazi uygulamasından önce laboratuvar şartlarında böcek üzerindeki etkileri araştırılmış olur. *G. mellonella*, arı kovanlarına zarar veren en önemli güve türünden biridir. *G. mellonella* larvaları, yumurtadan çıktıktan sonra larva olarak 8 evre geçirirler ve son iki evrede maksimum büyüklüğe ulaşırlar. Olgunlaşan son evre larvaları çevrelerine koza örerek pupa evresine geçerler. Pupalardan da ergin kelebekler oluşur. Uygun koşullar altında larval gelişim süresi 40 günü bulmakla beraber çevre koşullarına bağlı olarak bu süre değişebilmektedir. Embriyonal gelişim optimum koşullarda 3-4 gün içinde

tamamlanabileceği gibi ortam koşullarına bağlı olarak bu süre 25 güne kadar uzayabilmektedir. Yumurtaların açılımı 8-10 günde tamamlanmaktadır. Yumurta kuluçka süresi sıcaklık, nem, besinin kalitesi gibi etkenlerden etkilenmektedir (Özer 1962). Her bir dişi yaşam süresi boyunca yaklaşık 500 kadar yumurta bırakır. Açılan yumurtalardan çıkan larvalar kovan içine dağılarak petek içerisinde beslenme tünelleri meydana getirirler. Ergin larvalar 2,2 cm' ye kadar ulaşabilirler. Bu evrenin sonunda kovan içinde veya dışında pupa oluşturarak hayat döngülerini devam ettirirler (Burges 1978).). Büyük bal mumu güvesinin ergin, pupa ve yumurta evresindeki bireyleri peteklerde zarara neden olmazken, larvaları önemli ölçüde zararlı olmaktadır. Peteklerin iç kısımlarında tüneller açarak peteğe zarar vermekte ve tekrar kullanılma ihtimalini yok etmektedir (Akyol vd. 2009).

G. mellonella'nın da dâhil olduğu bazı zararlı Lepidopter türlerini laboratuvarında yetiştirmek amacıyla ilk defa Haydak (1936) tarafından yapay bir besin ortamı geliştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda Bronskill (1961) tarafından kepek, petek, gliserin, bal ve su karışımlarından oluşan yapay bir besin geliştirilmiştir. Bu sayede kısa sürede kitle halinde üretim yapılabilir. Yumurta, larva, pupa ve ergin kelebek evrelerine sahip olan bu türün hayat döngüsü yumurtadan ergin evreye kadar yaklaşık 6 haftadır. *G. mellonella*, sıcak bölgelerde arı kovanlarında ve zayıf kolonilerde yaşamak için iyi adapte olmuştur. Ergin güveler yumurtalarını kovanlarda bal arılarının ulaşamayacağı ahşap kısımlardaki çatlaklara bırakırlar. Genç larvalar petekler içinde oyuklar açarak bal ve petekler ile beslenirler. Yaşlı larvalar, ördükleri ağlar ile petekleri birbirine yapıştırmak suretiyle tamamen yerler (Ali vd. 1973

Fizyolojik, immunolojik, biyokimyasal ve parazitolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan böceklerden biri olan mum güvesi *G. mellonella* besinsel ihtiyaçları, ekolojik adaptasyonu ve gelişme özellikleri ile entomolojik araştırmalarda tercih edilen bir türdür. Başta *Pimpla turionellae* olmak üzere birçok hymenopter türünün yetiştirilmesinde konak olarak kullanılmaktadır.

Doğada bulunan canlı organizmalar üzerine toksik maddelerin etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için, *G. mellonella* L. oldukça iyi bir fizyolojik model oluşturmaktadır. Bununla beraber çalışmada model organizma olarak *G. mellonella*'nın kullanılma nedenleri arasında hızlı yaşam döngüsü, larva büyüklüğü ve yapay besinlerle kolay

büyümesi sayılabilir. *G. mellonella* larvaları ve pupları parazitoid böceklerin laboratuvar şartlarında çoğaltılabilmesi için konak olarak kullanılmaktadır. Konak besin bileşimindeki değişimin böceklerin ergin dönemdeki fizyolojik parametreleri etkilediği bilinmektedir.

Bu bilgiler ışığında farklı oranlarda hazırlanan fenthion'nun birçok parazitoidin laboratuvardaki üretiminde konak olarak kullanılan *G.mellonella* 'nın SOD ile CAT aktivitesi ve MDA miktarı üzerine etkisi araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Vadhva ve Hasan 1986, farklı dozlarda dichlorvos etkisi altında kalan *Heteropneustes fossilis*' de beyin dokusunun farklı bölgelerinde lipit peroksidasyonunun doza bağımlı olarak arttığı bulunmuştur.

Kaur ve Ansal 1996, Phosphamidon, Fenitrothion ve Fenthion'a maruz kalan zooplanktonların hassasiyeti araştırılmıştır. Zooplankton gibi küçük omurgasız hayvanlarda oluşan stres olduğu üzerinde ve sudaki kirliliğe odaklanmışlardır. Ekosistemdeki kirlilik oranları hızlıca değişebilmektedir.

Pedrajas vd. 1996, Dieldrin enjekte edilen *Sparus aurata* karaciğerinden subselüler fraksiyonların hazırlandığı bir çalışmada 2 gün boyunca nukleusta CAT ve SOD aktivitesinin değişmediği belirtilmektedir. Aynı çalışmada 7 gün boyunca nukleus ta CAT artarken SOD aktivitesi değişmemiş, hafif mikrozomal fraksiyonda CAT ve SOD aktiviteleri artmış, sitosolde ise CAT aktivitesi artarken SOD aktivitesi değişmemiştir. Bu nedenle, bu ksenobiyobiyotikler oksidatif stresi indüklemelerine karşın farklı subselüler bölgelerde SOD ve CAT aktiviteleri üzerine farklı etkiler yapmaktadırlar.

Reiter 1998, canlılarda oksidatif etki genelde proteinlerin modifikasyonu, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, lipit peroksidasyonunun ve DNA'daki hasarın artması şeklinde gözlenmektedir.

Krishnan 2006, Mısır kurdu *Spodoptera littoralis* bağırsaklarında oksidatif radikalleri ve antioksidan enzim seviyeleri karşılaştırıldı. Ön ve ortabağırsak doku ve bağırsak içeriğinde oksidatif stres ile süperoksit radikal, toplam peroksit içerik ve protein karbonil içeriği değerlendirilmiştir. SOD, CAT, askorbat peroksidaz (APOX) ve glutatyon S-transferaz peroksidaz (GSTpx) ölçülmüşlerdir. Süperoksit radikal üretiminde belirgin bir artış, total peroksit artışı ve protein karbonil düzeyleri kaydedildi. Antioksidan enzimlerin SOD (ortabağırsak dokularında), CAT (ön bağırsak dokusu ve içeriği), APOX (ön bağırsak içeriği) ve GSTpx yarı-yapay diyet ile beslenenlerle bitki diyet ile beslenenler karşılaştırıldığında yüksek olduğu kaydedildi.

Büyükgüzel 2006, yaptığı çalışmada *G.mellonella* da malation ile oksidatif stres oluşturmuş ve konukçusu olan *Pimpla turionellae*'de ergin çıkışı, ömür uzunluğu ve oksidatif ve antioksidatif etkilerini incelemiştir. 100 ppm malation konsantrasyonunun *G. mellonella*'da pupa oluşturma oranını ve ergin *P.turionellae* çıkışını önemli ölçüde azalttığını, hem konakta hem de konukçuda MDA düzeyinin arttığını göstermiştir. Aynı çalışmada düşük dozdaki malation konsantrasyonunun (0,01, 0,1 ve 1 ppm) SOD aktivitelerini kontrole göre önemli ölçüde artırdığını ve ergin ömür uzunluğu ve fertilité ile SOD arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Dubovskiy vd. 2008, *G. mellonella*'da bakteriyel enfeksiyonu sonucu antioksidan enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyon seviyelerini araştırmışlardır, enfeksiyon sonucu SOD, GST ve MDA düzeyinin enfeksiyonun ilk günü arttığını buna karşın CAT aktivitesinin etkilenmediğini belirtilmiştir.

Dubovskiy vd. 2008, *G. mellonella* larvalarının ortabağırsağında oksidatif stres oluşumu sonucu süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon- S-transferaz (GST), katalaz (CAT), konsantrasyonlarının oksidasyonu yükseltgenmesi, (RSSR/TP) tiyoller ve MDA düzeyleri test edilmiştir. İlk günlerin sonunda MDA, SOD düzeyi artarken CAT düzeyinin azaldığı görülmüştür.

Kalender vd. 2009, streptomisin verilen *G. mellonella* larvalarında oksidatif ve antioksidatif yanıt oluşumunu araştırmışlardır. *G. mellonella*'nin 7. larval döneminde bağırsak dokularındaki MDA, SOD, CAT, GST ve GPx miktarları incelenmiştir. Yüksek streptomisin verilen larvaların bağırsak dokularında oksidatif stres oluştuğu belirtilmiştir. MDA konsantrasyonunun artışı, SOD ve GPx aktivitesine aynı zamanda CAT ve GST tüketimide eşlik etmiştir. MDA ile GST arasında negatif korelasyon olduğunu belirtmişlerdir.

Sak ve Uçkan 2009, Cpermethrinin *G. mellonella*'nın pupalaşma ve ölüm oranına etkilerini araştırmışlar, ağırlıklarına göre 2 gruba ayırdıkları larvalar da pupalaşma ve ölüm oranının büyük oranda benzerlik gösterdiğini, cipermethrin dozunun arttıkça larval gelişim ve pupalaşma süresinin geciktiğini, pupalaşma yüzdesinin azaldığını ve ölüm oranının arttığını belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Deney böceklerinin elde edilmesi

Çalışmada kullanılacak olan stok *G. mellonella* bireyleri, 30 ± 2 °C ve $\%65\pm 5$ bağıl neme sahip laboratuvar koşullarında Bronskill (1961) tarafından gösterilen besin ile yetiştirilen *G. mellonella* larvalarından elde edildi. Pestisit olarak fenthion [O, O-Dimethyl O-(3-methyl-4-methylthiophenyl) phosphorothioate, Lebaycid EC 50, Bayer (Bayer Türk Kimya Sanayi Ltd. Şti.), 525 g/L] uygulandı. Deneylere başlanmadan önce fenthion'un *G. mellonella* larvaları için LD₅₀ değerleri belirlendi. Deney böceklerinin beslenmesinde kullanılacak fenthion oranları LD₅₀ değerinin hesaplanmasından sonra saptandı.

3.1.2 Kontrol besinin hazırlanması

G. mellonella larvalarının beslenmesi için kepek, gliserin, bal, saf su ve petekten oluşan besin bileşenleri geniş bir kap içerisinde karıştırıldı. Daha sonra el yardımı ile uzun süre karıştırılarak gliserinin diğer bileşenlerce emilmesi sağlandı.

Büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) kültürünün devamı yumurtadan yeni çıkmış larvaların yapay besinde yetiştirilmesi ile sağlandı (Bronskill 1961). Kültür 30 ± 2 °C ve $\% 65 \pm 5$ nisbi nemde ve gün boyu devamlı karanlıkta yürütüldü. Hazırlanan besin bir litrelik plastik kavanozların yaklaşık 2/3'ne kadar dolduruldu. Stok kültürün devamlılığı, besin konulan kavanozların içerisine bırakılan *G. mellonella* ergin dişi ve erkek böceklerin çiftleşmesi sonucunda dişilerin bıraktığı yumurtaların açılmasıyla sağlandı. Bu şekilde erginlerin besin üzerine yumurta bırakmaları sağlandı. Bu yumurtalardan çıkan larvalar gelişimlerini tamamlayan 4. evre larvaları meydana geldi.



Şekil 2. Bronksil (1961) tarafından hazırlanan bal, petek, kepek, gliserin ve saf sudan oluşan yarı sentetik besini içerisindeki *G. mellonella* larvaları

3.1.3 Deney besinlerinin hazırlanması

Bu çalışmada yarı sentetik besin Bronksil (1961) tarafından belirtilen besinin değiştirilmesi sonucu hazırlandı ve 2, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100 µg konsantrasyonlarında fenthion içeren besinle *G.mellonella* larvaları beslendi.

3.1.3.1 Fenthion içeren besinlerin hazırlanması

Çizelge 3.1 Fenthion içerikli besin ve miktarları

Besin bileşeni	Bal	Petek	Gliserin	Kepek	Saf su	Fenthion
Kontrol	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	-
2µg fenthion	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
4µg fenthion	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
6µg fenthion	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
8 µg fenthion	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
10µg fenthion	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
20µg fenthion	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
50µg fenthion	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+
100µg fenthion	9,7 g	3,5 g	22 g	58 g	6,8 g	+

Deneyde kullanılan *G. mellonella* larvalarının beslenmesi için laboratuvar koşullarında besin hazırlandı. Fenthionun beslenme deneylerinde denenen konsantrasyonları $\mu\text{g}/100$ g besin olarak ifade edildi. 100 g besin için her kavanoza 58 g kepek, 3.5 g öğütülmüş petek, 22 g gliserin, 9.7 g süzme bal eklenerek karıştırıldı. Fenthion suda büyük oranda çözüldüğü için bu miktarlar besinin hazırlanması sırasında doğrudan besine ilave edildi. Çalışmanın başlangıcında kontrol besini hariç fenthionun 2, 4, 6, 8, 10, 20, 50 ve 100 $\mu\text{g}/100$ g olmak üzere 8 farklı konsantrasyonda hazırlandı.

Her serinin her tekrarı için kavanozlara 20 şer böcek konuldu. Bu amaçla *G. mellonella* larvaları fenthionun farklı miktarlarını içeren yapay besin ile beslendi. Böcekler kısa inceleme periyodu hariç sürekli olarak karanlıkta tutuldu. Deney sonunda her kavanozdaki böceklerden ölen ve yaşayan bireyler sayılarak her tekrar için son larva evresindeki 5 adet birey ependorf tüplere konuldu ve $-80\text{ }^\circ\text{C}$ de saklandı. Melanizasyonu engellemek için her tüpe fenilthioure kristali eklendi.

3.1.4 Kimyasal maddeler

Bovin serum albümin	BSA	Sigma
Amonyum sülfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sigma
Bakır sülfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck
Bakır klorür	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma
di-Potasyum hidrojen fosfat	K_2HPO_4	Merck
di-Sodyum etilendiamin tetraasetik asit	Na_2EDTA	Sigma
di-Sodyum hidrojen fosfat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
Etil Alkol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Sigma
Folin-Ciocalteu's fenol ayırıcı		Sigma
Fenilthioure kristali	$\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$	Aldrich
Ksantin	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$	Sigma
Nitrotetrazoliumbluechloride	NBT	Sigma
Ksantin oksidaz		Sigma
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Sigma

Potasyum dihidrojen fosfat	KH_2PO_4	Merck
Sodyum dihidrojen fosfat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
Sodyum hidroksit	NaOH	Carlo-Erba
Sodyum karbonat	Na_2CO_3	Merck
Sodyum klorür	NaCl	Merck
Sodyum potasyum tartarat		Merck
Trikloroasetik asit	TCA	Merck
Tiyobarbiturik asit	TBA	Fluka

3.1.5 Cihazlar ve Gereçler

İnkübatörlü Double Beam Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800
Analitik Terazî	Ohaus
Ependorf tüpleri	
-80°C Derin Dondurucu	New Brunswick U570
Buzdolabı	Vestel BZP-XL3442W
Su Banyosu	Daihan Wisd WB22
Soğutmalı Masaüstü Santrifüj	Hettich Universal 320 R
Genel Amaçlı Santrifüj	Hettich Eba 21
Farklı Ölçeklerde Otomatik Pipetler	Gilson
pH metre	Thermo Orion 2 Star
Vortex	LABART MVS-1
Etüv	Nüve EN 120
Saf Su Cihazı	Millipore Rios 8
Buz Makinası	Scotsman AF-80
Çelik Başlıklı Homojenizatör	İkka
Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı	Daihan Wisd MSH-20A

3.2 Yöntem

Deney böceklerinin protein miktarı, enzim aktiviteleri ve MDA miktarı tayini için -80 °C de saklanan larvalar kullanıldı.

3.2.1 Böceklerin Homojenizasyonu

Analizler için, yaş ağırlıkları alınıp dondurucuda stoklanan *G. mellonella* larvaları, deney tüplerine alınıp oda sıcaklığında bekletilip buzu çözüldükten sonra üzerlerine melaninleşmeyi önlemek için birkaç feniltioure kristali eklendi ve 1/5 oranında fosfat tamponu (pH 7.4) eklenerek 24000 devir/dk da homojenize edildi. Homojenizasyon işleminden sonra tüpler 10000 devir/dk da 30 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant deneylerde kullanıldı.

3.2.2 Protein Tayini

Prensip

Proteinlerin alkali CuSO_4 ilavesiyle fosfotungustik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması ilkesine dayanır.(Lowry vd 1951)

Kullanılan Çözeltiler

Çözelti A: [% 2 Na_2CO_3 (0.1 N NaOH içinde)] : 2 g Na_2CO_3 tartıldı ve 0.1 N NaOH içinde toplam hacim 100 ml olacak şekilde çözüldü.

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

Çözelti B2: (%2 Na-K-tartarat): 2 g Na-K-tartarat tartıldı ve çözelti bidistile saf su ile toplam hacim 100 ml olacak şekilde çözüldü.

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

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

Çizelge 3.2 Lowry ve ark. (1951) protein miktarı ölçüm prosedürü

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

Protein miktarlarının ölçümünden önce 100 ml de 1 gr albümin (Sigma; A- 2153) içeren bir stok çözelti hazırlandı ve bu çözülden seyreltme yöntemi ile 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 ve 0.8 mg/ml albümin içeren standart çözeltiler elde edildi. Her bir standart çözüteye Lowry vd (1951) protein tayini metodu kullanılarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800) 750 nm deki absorpsiyon değerleri okundu. Protein miktarlarının belirlenmesi için kör tüpüne 0.3 ml bidistile saf su üzerine 3 ml çözelti C eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0.3 ml Folin-ciocalteu ilave edildi. 30 dakika bekletildikten sonra 750 nm de okuma yapıldı. Örneklerin okunması için 0.3 ml örnek üzerine 3 ml çözelti C eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildi ve üzerine 0.3 ml Folin-ciocalteu ilave edilerek 30 dakika bekletildi. Daha sonra 750 nm de köre karşı absorbans değerleri okundu. Elde edilen ışık absorpsiyon değeri regresyon doğrusu denkleminde yerine konularak bir deney serisinin bir tekrarındaki böceklerin toplam protein miktarı elde edildi.

3.2.3 Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesinin tayini

SOD aktivitesinin belirlenmesinde Sun vd (1988) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır.

Prensip

Yöntem reaksiyon ortamında enzimatik bir reaksiyonla üretilen süperoksit radikallerinin, ortamda bulunan nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesinin örnekteki SOD tarafından engellenmesi esasına dayanır. Yöntemde O_2^- üretimi ksantin-ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile sağlanır. Bu şekilde oluşturulan süperoksit radikalleri NBT ile reaksiyona girerek maksimum absorbansını 560 nm de veren bir formazon oluşturur. Ortama ilave edilen enzimin üretilen radikalleri dismutasyona uğratması sonucunda NBT redüksiyon reaksiyonu yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorbans değeri düşer. Dolayısıyla formazon oluşumunun inhibisyonun tayiniyle SOD miktarı indirekt olarak saptanmaktadır.

Reaktif çözeltisinin bileşenleri

Ksantin çözeltisi (0,3 mM): 9.13 mg ksantin (Sigma; X7375) önce birkaç damla 1N NaOH ile çözüldü daha sonra hacim bidistile saf su ile 200 ml ye tamamlandı.

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

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

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

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

Reaktif çözeltisi (20 testlik): 20 ml ksantin çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml Na₂CO₃ çözeltisi ve 3 ml BSA çözeltisi alındı ve karıştırıldı.

Ksantin oksidaz [(EC:1.17.3.2) (Sigma; X1875) (167 U/l)] enziminden 48 µl alındı, 3 ml 2M buz soğukluğunda (NH₄)₂SO₄ de çözüldü.

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

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

Çizelge 3.3 Sun vd. (1988) SOD aktivitesi ölçüm prosedürü

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

SOD aktivitesinin tayini için her bir örnek için iki tüp alındı. Birinci tüp kör için ikinci tüp ise örnek için kullanıldı. Kör tüpüne 1,425 ml reaktif karışımı konuldu üzerine 0.025 ml ksantin oksidaz çözeltisi ilave edildi, karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi, süre sonunda 0.05 ml bakır klorür eklenerek reaksiyon durduruldu. Son olarak proteinden kaynaklanan absorbansın sonuçları etkilememesi için 0.05 ml örnek eklendi ve spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800) 560 nm de saf suya karşı okuma yapıldı. Örnek tüpüne yine 1,425 ml reaktif karışımı üzerine 0.05 ml örnek ve 0.025 ml ksantin oksidaz ilave edildi ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0.05 ml bakır klorür ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve 560 nm de absorbansları okundu.

Hesaplama:

$$(\text{Absorbans kör} - \text{Absorbans numune}) \times 100$$

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Absorbans kör} - \text{Absorbans numune}}{\text{Absorbans kör}} \times 100$$

Absorbans kör

%inhibisyon

$$\text{Aktivite(U/ml)} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{50 \times 0,1}$$

50×0,1

Aktivite(U/ml)

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

Protein miktarı (mg/ml)

3.2.4 Katalaz (CAT) aktivitesinin tayini

CAT aktivitesinin belirlenmesinde Aebi (1984) metodu kullanılmıştır.

Prensip

CATın hidrojen peroksiti (H₂O₂) nötrale etmesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tamponu (50 mM): 6.81 gr KH₂PO₄ ve 7.1 gr Na₂HPO₄ bidistile suda çözüldükten sonra pH 1N NaOH ile 7.4 e ayarlandı ve son hacim bidistile su ile 1 litreye tamamlandı.

H₂O₂ (30 mM): %30 luk H₂O₂ 'den 0.34 ml alınarak fosfat tamponu ile 100 ml ye tamamlandı.

Çizelge 3.4 Aebi (1984) CAT aktivitesi ölçüm prosedürü

	Kör	Numune
H ₂ O ₂ (ml)	2.8	2.8
Fosfat tamponu (ml)	0.2	-
Örnek (ml)	-	0.2

CAT aktivitesinin tayini için iki tüp alındı ve kör ve numune tüpü olarak ayrılan bu tüplerden kör tüpüne 2.8 ml 30 mM H₂O₂ ilave edildi ve üzerine 0.2 ml fosfat tamponu eklendikten sonra seri bir şekilde çalkalanarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800) 240 nm de 30 saniye aralıklarla iki kez okundu. Örnek için kullanılan tüpe yine aynı miktar 30 mM H₂O₂ konuldu ve üzerine 0.2 ml örnek elenerek hızlı bir şekilde çalkalanarak 240 nm de absorbansları okundu. İlk okuma A₁, ikinci okuma A₂ olarak adlandırıldı.

Hesaplama:

$$U = \frac{2,3}{\Delta \times} \times \log \frac{A_1}{A_2}$$
$$U = \frac{2,3}{30} \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

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

3.2.5 MDA(Malondialdehyde) tayini

Lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olarak oluşan MDA'nın ölçümü tiyobarbiturik asit (TBA) ile inkübasyonu sonucu oluşan kompleksin 535 nm'de absorbans ölçümü esasına dayanır. Ölçüm Bar-Or vd (2001) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır.

Çözeltiler:

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

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

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

Hesaplama:

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

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

$$= \text{nmol} / \text{mg protein}$$

3.2.6 Verilerin değerlendirilmesi

Deneyler değişik zamanlarda beşer kez tekrar edildi. Bir deney serisinde elde edilen veriler kontrol besini ve kendi aralarında karşılaştırılmak suretiyle değerlendirildi. Verilerin karşılaştırılmasında varyans analiz yöntemi, ortalamalar arası farkın önem kontrolünde ise Student Newman Keul's (SNK) testi, verilerin arasındaki ilişkinin

ortaya konmasında Pearson korelasyonu analizi bilgisayarda SPSS 20.00 istatistik veri paketi kullanılarak uygulandı.

4. BULGULAR

Farklı fenthion konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarının (2, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100 µg/100g besin) fenthionun SOD ve CAT aktivitesi, MDA ve Protein miktarlarına etkileri Çizelge 4.1 de verilmiştir.

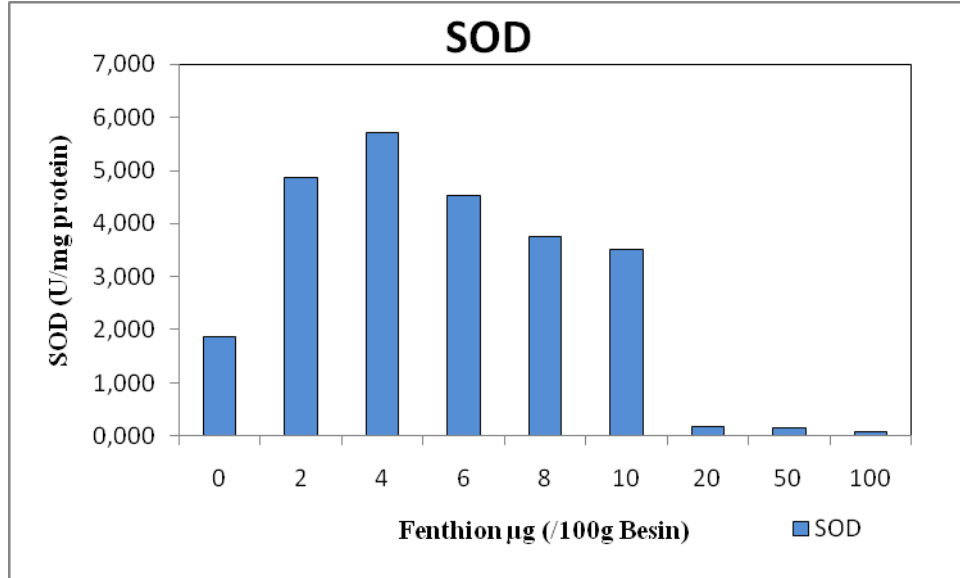
Çizelge 4.1 Fenthionun *G. mellonella* larvalarının SOD, CAT aktivitelerine ve MDA, Protein miktarlarına miktarlarına etkileri

Fenthion (µg/100g Besin)	SOD (U/mg protein) Mean±SE:	CAT (U/mg protein) Mean±SE:	MDA (nmol/mg) Mean±SE:	PROTEİN (mg) Mean±SE:
0.00**	1.86±0.18d	0.04±0.001d	7.28±0.32d	4.15±0.07a
2.00	4.88±0.41ba	0.16±0.01cb	8.06±0.05d	1.78±0.17d
4.00	5.71±0.11a	0.12±0.009c	10.42±0.46dc	1.50±0.04d
6.00	4.52±0.39cb	0.12±0.008c	9.44±0.17dc	2.00±0.13d
8.00	3.75±0.51c	0.13±0.02c	10.22±0.98dc	2.17±0.21dc
10.00	3.50±0.38c	0.11±0.009c	11.52±0.53c	2.50±0.16bcd
20.00	0.16±0.04e	0.22±0.03ba	11.73±0.90c	3.11±0.36cb
50.00	0.14±0.01e	0.20±0.01ba	14.48±1.54b	3.50±0.30ba
100.00	0.08±0.03e	0.26±0.02a	17.98±0.94a	3.05±0.53cb

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

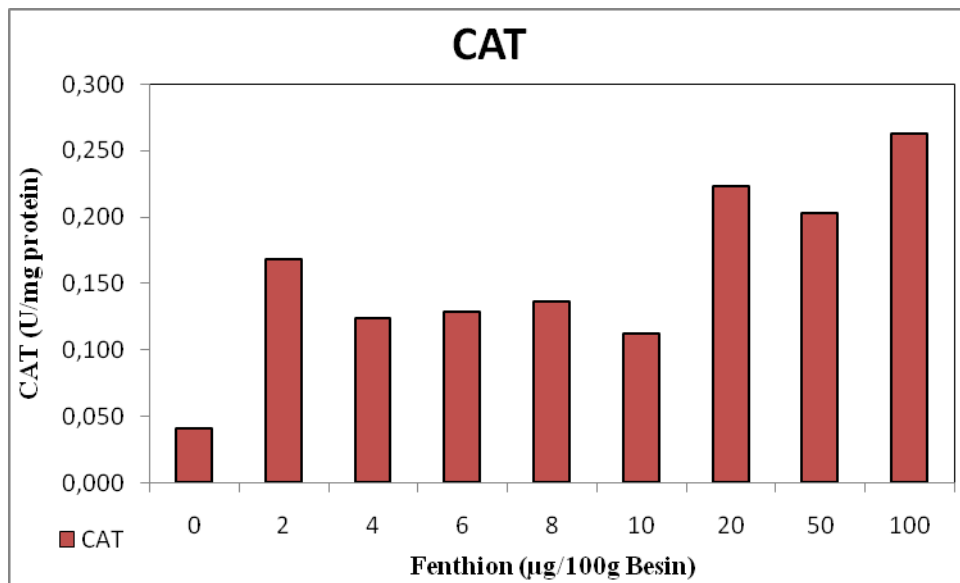
Mean±SE: Aritmetik ortalama ± Standart hata

** : Kontrol



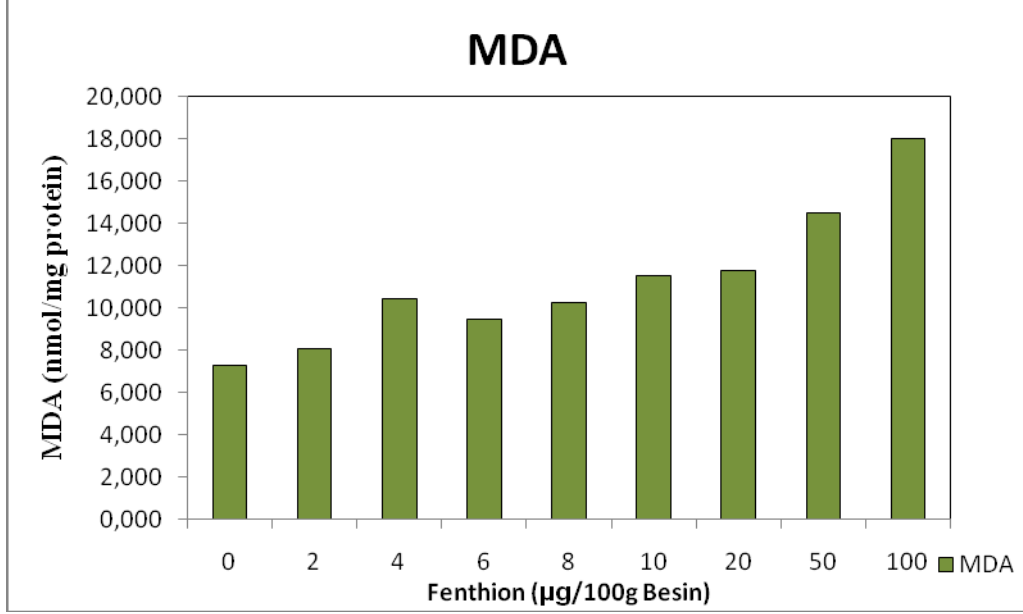
Şekil 4.1 Fenthionun *G. mellonella* larvalarında SOD aktivitesi üzerine etkisi

Besinin 2 ve 4 μg fenthion içermesi ile elde edilen veriler arasında en yüksek SOD aktivitesinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Besinin (6, 8, 10 μg) fenthion içermesi SOD aktivitesini kontrole göre artmış, fakat kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel fark gözlenmemiştir. Besinin 20, 50, 100 μg fenthion içermesi durumunda gerek kontrole gerekse diğer konsantrasyonlara göre SOD aktivitesi önemli ölçüde düşmüştür. Söz konusu değerler elde edilen veriler arasında en düşük değerler olarak tesbit edilmiştir. SOD aktivitesi fenthion artışına bağlı olarak 20, 50, 100 μg fenthion içeren gruplarda sırasıyla 0.16, 0.14, 0.08 U/mg protein olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).



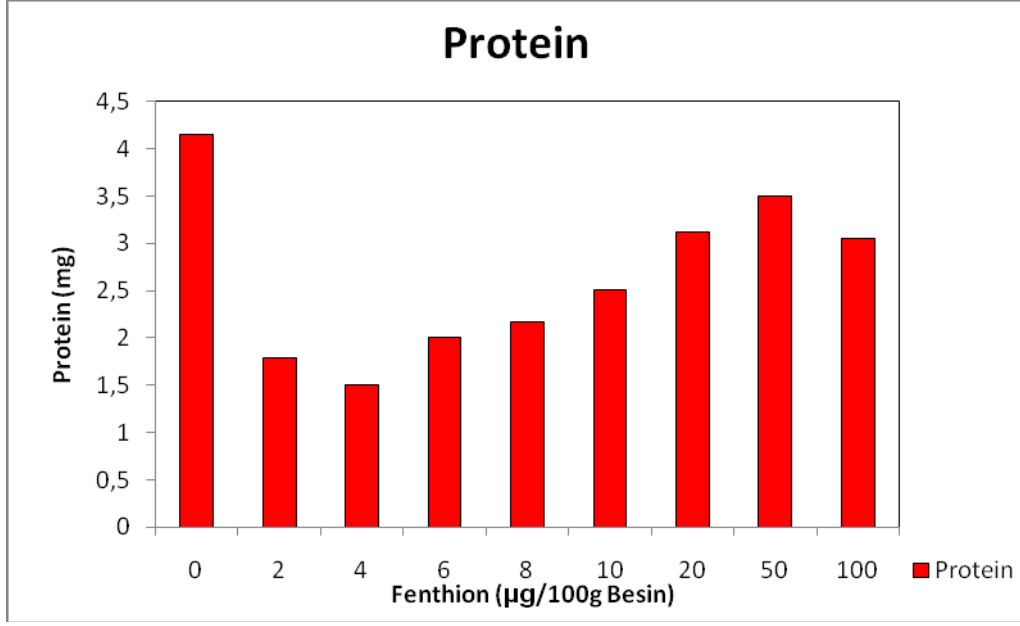
Şekil 4.2 Fenthionun *G. mellonella* larvalarının CAT aktivitesine etkisi

Denenen tüm fenthion oranları katalaz aktivitesini kontrole göre önemli ölçüde artırmıştır. Fenthionun yüksek konsantrasyonlarında (20, 50 ve 100 µg) katalaz aktivitesi kontrole ve diğer konsantrasyonlara göre önemli bir artış göstermiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.2). Besinin 2, 4, 6, 8 ve 10 µg fenthion içermesi durumunda katalaz aktivitesinde istatistiki bir ayırım söz konusu değildir.



Şekil 4.3 Fenthionun *G. mellonella* larvalarının MDA miktarına etkisi.

Besinin 2, 4, 6, 8 µg fenthion içermesi MDA miktarına kontrole göre önemli bir etkide bulunmamıştır. Denenen diğer fenthion oranları MDA miktarını kontrole göre önemli derecede artırmıştır. En yüksek MDA oranı besinin 100 µg insektisit ile kontamine olması durumunda elde edilmiştir. Bu oran deneyde kullanılan en yüksek fenthion konsantrasyonudur. Maksimum MDA miktarlarını 17.98 nmol/mg olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.3).



Şekil 4.4 Fenthionun *G.mellonella* larvalarının Protein miktarına etkisi.

Besindeki farklı fenthion konsantrasyonlarının (2, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100 µg), *G.mellonella* larvalarının protein miktarına etkileri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4’ de gösterilmiştir. Farklı fenthion konsantrasyonları protein miktarını etkilemiştir. Fenthionun 50 µg dışındaki bütün konsantrasyonlarında protein miktarı önemli ölçüde kontrole göre azalmıştır. Denenen insektisit oranlarından elde edilen veriler kendi aralarında incelendiğinde besindeki fenthion oranındaki artışa bağlı olarak protein miktarında artışlar gözlenmiştir. Bu artış bazı oranlar için istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır.

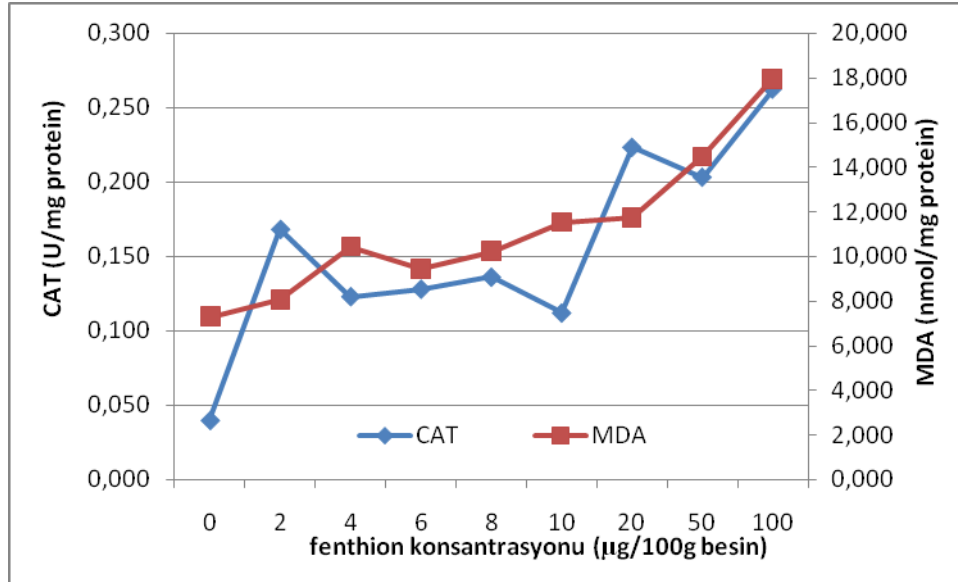
G. mellonella larvalarının besininde farklı konsantrasyonlardaki (2, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100 µg/100g besin) fenthionun protein miktarı, SOD, CAT aktivitesi ve MDA miktarları arasındaki Pearson Korelasyonu analizi sonuçları Çizelge 4.2 de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Fenthion'a maruz kalan *G.mellonella* larvalarına ait biyokimyasal parametrelerin arasındaki ilişkiye ait Pearson Korelasyonu analizi sonuçları

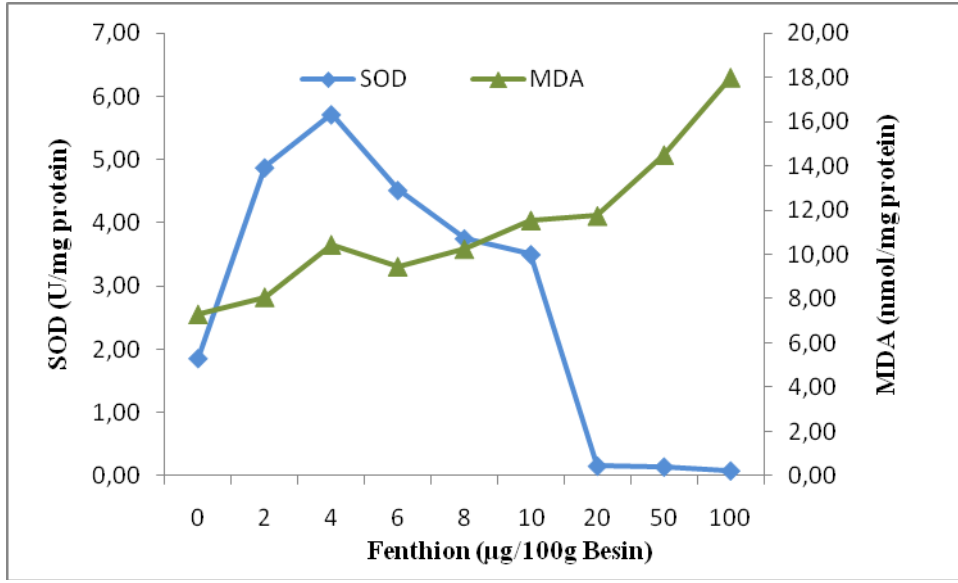
	Fenthion	Protein	MDA	CAT
Protein	0,285			
MDA	0,841**	-0,009		
CAT	0,660**	-0,240	0,772**	
SOD	-0,664**	-0,733**	-0,504**	-0,397**

** Korelasyon $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

G. mellonella larvalarının MDA miktarı ile CAT aktivitesi arasında istatistiksel olarak doğrusal bir ilişki olmasına rağmen MDA miktarı ile SOD aktivitesi arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

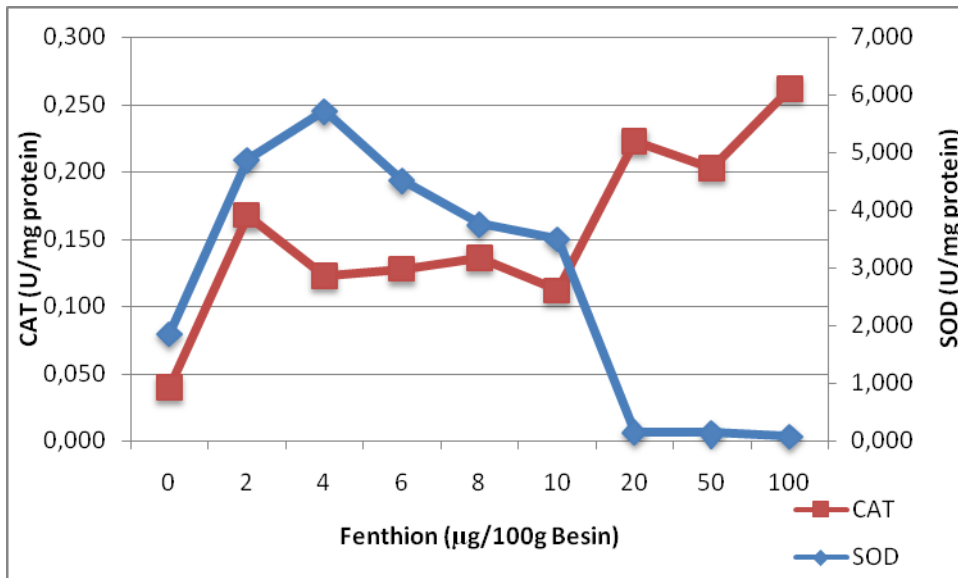


Şekil 4.6 Fenthionun *G. mellonella* larvalarının MDA miktarı ve CAT aktivitesi korelasyon grafiği.



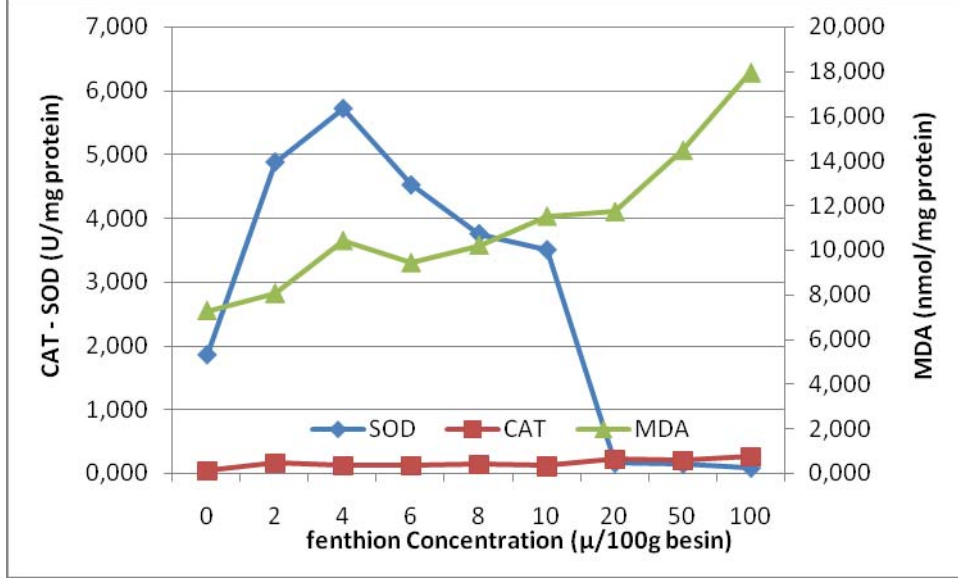
Şekil 4.7 Fenthionun *G. mellonella* larvalarının SOD aktivitesi ve MDA miktarı korelasyon grafiği.

Larvalarda artan fenthion konsantrasyonuna karşı MDA miktarı ve CAT aktivitesi artarken SOD aktivitesi azalmıştır. Çizelge 4.2 de korelasyon ilişkileri açıkça görülmektedir.



Şekil 4.5 Fenthionun *G. mellonella* larvalarının SOD ve CAT aktivitesi korelasyon grafiği.

Besindeki farklı fenthionun konsantrasyonlarına bağı olarak CAT ve SOD aktivitesi arasında negatif bir korelasyon vardır. Fenthionun yüksek konsantrasyonlarında CAT aktivitesi artarken SOD aktivitesi önemli derecede azalmıştır.



Şekil 4.8 Fenthionun *G.mellonella* larvalarının MDA miktarı, CAT ve SOD aktivitesi korelasyon grafiği.

Fenthionun düşük konsantrasyonunda CAT aktivitesi ve MDA miktarı artmaya artmaya başlamıştır. Konsantrasyonun artmasıyla CAT aktivitesi ve MDA miktarı artmıştır. Besinlerdeki düşük fenthion konsantrasyonlarında SOD aktivitesi ve MDA miktarı artmış fakat yüksek konsantrasyonlarında SOD aktivitesi azalmış MDA miktarı artmıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan çalışmada organofosforlu bir insektisit olan fenthionun farklı subletal konsantrasyonlarının (2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00 µg/100 g besin) *G. mellonella* larvalarında CAT, SOD aktiviteleri MDA, protein miktarları ve LD₅₀ değeri araştırılmıştır.

Serbest oksijen radikalleri ile antioksidan üretim arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak adlandırılır (Ranjbar vd 2005). Serbest oksijen radikallerinin çok fazla olması veya antioksidanların çok az olması oksidatif stres geliştirilir (Halliwell 1994)

Biyolojik sistemde serbest radikal potansiyeline sahip çok sayıda ksenobiyotik tespit edilmiştir (Kehrer 1993). Organizmada ksenobiyotikler süperoksit anyon radikalleri üreterek, sonuçta hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oksidatif stres oluşturur. Bu serbest radikallerin bazıları çeşitli doku hücreleriyle etkileşime girerek fonksiyon bozukluğu ile birlikte oksidatif strese neden olur. Ksenobiyotikler tarafından oluşturulan oksidatif stres, antioksidan enzim sisteminde bozulmaların oluşumunu indükler (Gabbianelli vd. 2002). Organofosforlu insektisitler ise serbest radikal oluşumunu artırmakta ve antioksidan enzimlerin yapılarında değişikliğe yol açarak oksidatif strese neden olmaktadır (Gültekin vd. 2001, Kovacic 2003, Birkhoj vd. 2004, Dettbarn vd. 2006). Organofosforlu insektisitlerin çeşitli toksik özellikleri vardır, en önemli etkisini AChE inhibe etmesiyle gösterir (Ansari ve Kumar 1984). Bu nedenle, insektisitlerin LD₅₀ değerleri belirlenmesi hedef organizmanın ortadan kaldırılmasında ve bunun yanında hedef dışı organizmaların korunmasında önemlidir. Bu çalışmada, *G. mellonella* larvalar için fenthion LD₅₀ değeri laboratuvar koşullarında 1348 µg/100 g olarak tespit belirlenmiştir.

Oksidanların neden olduğu hücredeki hasarlar seviyesi antioksidan enzimler (SOD, CAT) tarafından önlenir. Örneğin, SOD süperoksit radikallerini H₂O₂ 'te katalize eder, CAT ise H₂O₂ i H₂O ya dönüştürür. Bu sayede radikallerin hücreye zarar vermesi önlenir (Mates vd. 1999). Bu serbest radikallerin oluşum oranının bir göstergesidir (Yu 1994). Bu çalışmada besindeki fenthionun düşük konsantrasyonunda (2, 4, 6, 8, 10 µg/100 g) CAT ve SOD aktivitesi artmıştır.

Fenthionun yüksek konsantrasyonlarında (20, 50, 100 µg/100 g) ise CAT aktivitesi artarken SOD aktivitesi (0,082) önemli derecede azalmıştır.

Farklı Fenthion oranları etkisinde bırakılan *G. mellonella* larvalarının CAT aktivitesi, genel olarak bütün konsantrasyonlarda artmıştır. Fenthionun neden olduğu oksidatif stres sonucu artan hidrojen peroksitin ortamdaki uzaklaştırılabilmesi için katalaz aktivitesinin artan SOD aktivitesi ile birlikte lineer bir artış göstermiştir. Bu durum bazı böcek türlerinde ortaya konmuştur. CAT ve SOD aktivitesi oksidatif strese bağlı olarak genellikle birlikte artış veya azalma eğilimi gösterirler. Fakat bazı oksidatif stres ajanları bu durumun ortadan kalkmasına neden olabilmektedir. Söz konusu durum yapılan çalışmada da görülmektedir.

Fenthionun düşük konsantrasyonlarında SOD aktivitesi önemli ölçüde artmıştır. Bu durum SOD aktivitesinin antioksidan savunma sisteminde bariyer görevi gördüğünü desteklemektedir. Düşük konsantrasyonlarda süperoksit anyonlarının birikimi ile SOD aktivitesi ve bununla birlikte ortamdaki H₂O₂ miktarı artmış, ortamda artan H₂O₂ CAT aktivitesini artırmış olabilir. Fenthionun artan konsantrasyonlarında ise süperoksit anyonlarının fazla olması SOD aktivitesini inhibe etmiş olabilir. Fenthionun artan konsantrasyonlarında SOD aktivitesi azalmış ortamda süperoksit radikalleri birikmiştir ve oluşan H₂O₂ ler ile birlikte enzimin sistein yapısını bozarak aktivitesini engellemiştir. Oluşan H₂O₂ lerini yok etmek için CAT aktivitesi artmış olabilir. Bununla birlikte hidrojen peroksit CAT tarafından parçalanırken düşük dozlardaki hidrojen peroksiti Askorbat peroksidaz (APOX) enzimi de parçalar (Mathews vd.1997). APOX aktivitesine bakılmadığı için kesin bir yargıya varılmamakla birlikte bu yönde çalışmaların yapılması oksidatif strese bağlı enzim aktivitelerinin açıklanmasına büyük katkıda bulunacaktır.

SOD ve CAT ile ilgili bir çalışmada *Lymantria dispar* larvalarının ortabağırsağında istenmeyen bir bitki ile beslenmesiyle benzer sonuçlar bu enzimin aktivitesinde artış olduğunu rapor etmişlerdir (Periç-Mataruga vd. 1996). İnsektisitlerle yapılan çalışmada oksidatif stres sırasında süperoksit radikallerinin artmasıyla SOD aktivitesinin arttığı ve bununla birlikte CAT aktivitesinin de arttığı belirtilmiştir (Periç-Mataruga vd. 1996). Diazinonun etkilerinin araştırıldığı çalışmada; diğer insektisitler girmiş işin içine ve en son diazinon sıçan eritrositlerine etkisi araştırılmıştır. Klorpirifos-etil, malathion, methidathion, fenthionun ve fosalonun SOD aktivitesinde azalmaya sebep olduklarını

belirtmişlerdir (Yarsan vd. 1999, Gultekin vd. 2000, Gultekin vd. 2001, Altuntaş ve Delibaş'ın 2002, Altuntaş vd 2002a, 2002b, 2002c, Altuntaş vd. 2003, Altuntaş vd 2004). Ancak, dimethoat, phosphomidon ve diazinonun SOD aktivitesinde bir artışa sebep olduğu belirtmişlerdir (Banerjee vd 1999, Yarsan vd. 1999, John vd 2001).

Ksenobiyotikler dokularda MDA düzeyinde artışa neden olmaktadır (Banerjee vd. 1998, Hazarika vd. 2003). Bazı çalışmalar pestisidlerin dokularda MDA seviyesini arttırdığını bildirmiştir (Kehrer 1993, Banerjee vd. 1999, Hazarika 2003). Örneğin, bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, klorprifos ve diazinon uygulaması ile MDA düzeylerinin arttığını ortaya koymuştur (Gultekin vd. 2001, Altuntaş vd .2002, Altuntaş vd. 2003, Altuntaş vd. 2004). MDA; çoklu doymamış yağ asitlerinin nonlipofilik peroksidasyon ürünlerinden birisidir. MDA, oksidatif stres ile oluşan lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada özellikle yüksek konsantrasyonlar radikallerde ve lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. SOD aktivitesinin inhibisyonunun bir sonucu olarak süperoksit iyonlarının birikimi biyolojik zararın lipit peroksidasyonunu teşvik ettiği söylenebilir. Bu veriler bize hücre harabiyeti sonrası oluşan lipit peroksidasyonundaki artışın antioksidan savunma sistemini tahrip edebileceğini veya bozulan antioksidan sistemin lipit peroksidasyonunu indükleyip MDA seviyesini arttırabileceğini düşündürmektedir. Farklı insektisitlerin omurgalı ve omurgasız hayvaların MDA ve antioksidan savunma sistemi üzerine etkisinin gösterildiği birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda da farklı sonuçlara rastlanmıştır. Fenthiona maruz bırakılan *Rana ridibunda* dokularında MDA miktarının arttığı SOD enziminde ise dalgalanmalar olduğu ve bu sonucun canlının oksidatif strese girdiğinin göstergesi olduğu gösterilmiştir (Doyotte vd. 1997). Diazinonun *Cyprinus carpio* (L.) karaciğerinde SOD, CAT aktivitesi ve MDA miktarının araştırıldığı çalışmada SOD balıklar için hayati önem taşımaktadır, oksidatif strese karşı SOD enzim aktivitesinde ilk savunma olduğu gösterilmiştir. Bu sebepten dolayı SOD aktivitesinin ve lipit peroksidasyonun arttığı gözlemlenmiştir. (Peixoto vd. 2006, Hai vd. 1997, Lima vd. 2006). Benzer sonuçlar sunulan çalışmada da bulunmuştur.

Fenitrothion ve Lambda-cyhalothrine maruz kalan erkek sıçanlarda süperoksit radikallerinin artması sonucu SOD, CAT enzim aktivitelerinin azaldığı MDA miktarının

arttığı gözlemlenmiştir (Sinha vd. 2006, Kono ve Fridovich 1982, Calviello vd. 2006). Bununla birlikte methyl parathion maruz kalan tatlı su balığı *Brycon cephalus* 'ta SOD, CAT aktivitelerinde ve Lipit peroksidasyonunda önemli bir artış gözlenmiştir (Hermes-Lima 2004; John vd. 2001). Yapılan çalışmalar farklı insektisitlere maruz kalan canlı gruplarında benzer etkilerin ortaya çıkabileceğini gösterdiği gibi aynı insektisit antioksidan savunma sistemi üzerine farklı etkilerin olabileceğini açık bir şekilde belirlemektedir.

G. mellonella larvalarındaki protein miktarında kontrole göre azaldığı gözlenmiştir. Proteinin azalması insektisite maruz kalmasından ve buna bağlı olarak strese karşı koyma amacıyla ya da dokulardaki aşırı bozulmadan kaynaklandığı söylenebilir. Yapılan bir çalışmada bu azalmanın, stres karşısında zarar gören hücre ve doku organellerinin tamirinde kullanılmak üzere lipoprotein oluşumunun artmasına bağlı olabileceği fikrini desteklemektedir (Sancho vd. 1998, Rambabu vd. 1994). Yüksek konsantrasyonlarda, gözlenen düşük konsantrasyonlara göre proteinin artışı ise *G. mellonella*'nın stres durumunda, neslini devam ettirebilmesi için adaptif bir mekanizma ile heat shock proteinlerinde gözlenen bir artıştan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *G. mellonella*, bal peteklerine zarar veren Lepidoptera takımına ait bir türdür. Yıllardır arıcılar tarafından bu türle mücadele edilmekte ve bu mücadele yöntemlerinin birçoğu kimyasal maddelerden oluştuğu için doğaya ve insan sağlığına zarar vermektedir. Bununla birlikte son yıllarda özellikle immun sistemi ile ilgili çalışmalarda ve hedef olmayan canlı grupları üzerine insektisitlerin araştırılması konusunda yapılan çalışmalarda sıklıkla model organizma olarak kullanılmaktadır. Bu tür çalışmalardan elde edilen sonuçlar omurgalı hayvanlarla yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada insektisitlerin miktarına bağlı olarak oluşan oksidatif stres ortaya çıkmış ve lipit peroksidasyonunda bir artış sözkonusu olmuştur. Fenthion *G. mellonella*'nın biyokimyasal parametrelerini olumsuz etkilediği ortaya konmuştur. Bu nedenle, insektisitlerin bu tür model organizmalar üzerine etkilerinin gerek fizyolojik, gerekse moleküler düzeyde daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması, hedef olmayan organizmalar üzerine ortaya çıkabilecek muhtemel etkilerinin ayrıntılı bir şekilde araştırılması yararlı olacaktır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada zararlılarla mücadelede kullanılan organofosforlu bir insektisit olan, fenthionun *G. mellonella* nın SOD, CAT aktivitesi, MDA ve protein miktarları üzerine olan etkileri incelendiğinde; protein miktarının genel olarak kontrole göre azaldığı, MDA miktarının önemli seviyede arttığı, SOD'nin düşük konsantrasyonlarda arttığı ama yüksek konsantrasyonlarda azaldığı, CAT aktivitesinin ise bütün konsantrasyonlarda arttığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak fenthion gibi insektisitlerin antioksidan enzimleri, MDA ve protein gibi önemli biomarkerleri etkilediğini göstermektedir.

Fenthionun böcek üzerinde gösterdiği toksik etki mekanizmasının anlaşılması zararlı böceklerle mücadelede, hedef olmayan canlılara ve çevreye daha az olumsuz etkisi olan yeni kimyasal yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Bu araştırmadan elde edilecek bilgiler özellikle moleküler entomoloji çalışmalarına katkıda bulunması muhtemel sonuçlar arasındadır.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M. Jalali, N. and Sabzevari, O. 1999. Pesticide poisoning during an 18-month period (1995–1997) in Tehran. *Iran J Med Sci*,24; 77–81, Iran.
- Adalı, M. 1998. Hipertiroidli hastalarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan duruma propitiourasil, propanol ve vitamin E'nin etkisi. Osmangazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B. Dalı, Uzm. Tezi. Eskişehir.
- Aebi, H. 1974. Catalase, In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergemeyer, H U., ed) Academic Press, 673-684, New York-London.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro* *Methods Enzymol.* 105; 121–126.
- Ahmad, S. 1992. Biochemical defense of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects *Biochem Systematik Ecol.* 20; 269–296.
- Akertek, E. 1994. Characterization of immobilized catalase and their application in The milk sterilization with H₂O₂. Masters Thesis of DEU, İzmir.
- Akyol, E. Yeninar, H. Şahinler, N. ve Ceylan, D.A. 2009. Büyük Balmumu Güvesi *Galleria mellonella* L.'nin (Lepidoptera:Pyralidae) Kontrolünde CO₂ Kullanımı. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 9(1); 26-31.
- Ali, A.D. Bakry, N.M. Abdellatif, M.A. and El-Sawaf, S.K. 1973. The Control of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L., By Chemicals I. Susceptibility of the Wax moth Larvae and Honey-Bee Workers to Certain Chemicals. *Z. Ang. Ent.* (74); 170-177.
- Altuntaş, I. and Delibas, N. 2002. Effects of organophosphate insecticide fenthion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Biomedical Research*,(13); 43–47.
- Altuntaş, I. Delibas, N. and Sutcu, R. 2002a. The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Human of Experimental Toxicology*,(21); 681–85.
- Altuntaş, I. Delibas, N. Yonden, Z. Orhan, H. and Sutcu, R. 2002b. Effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in erythrocytes (*in vitro*). *Biomedical Research*, (13);11–14.
- Altuntaş, I. Delibas, N. Can, M. Yonden, Z. Orhan, H. and Sutcu, R. 2002c. Effects of organophosphate insecticide fenthion on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocyte (*in vitro*). *Ibni Sina Dergisi*, (7); 90–95.

- Altuntaş, I. Delibas, N. Doguc, D.K. Ozmen, S. and Gultekin, F. 2003. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes *in vitro*. *Toxicology in Vitro*,(17); 153–57.
- Altuntaş, I. Kilinc, I. Orhan, H. Demirel, R. Koylu, H. and Delibas, N. 2004. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes *in vitro*. *Human and Experimental Toxicology*,(23); 9–13.
- Ansari, B.A and Kumar, K. 1984. Malathion toxicity: *In vivo* inhibition of acetylcholinesterase in the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *Toxicology Lett*,(20);283–287.
- Arakawa, T. 1994. Superoxide Generation *in vitro* in Lepidopteran Larval Haemolymph, *J. Insect. Physiology*. Vol, (40); 165.171.
- Aydın, A. Sayal, A. ve Işimer, A. 2001. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Kitabı.
- Bagchi, D. Bagchi, M. Hassoun, EA. and Stohs, SJ. 1995. *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species. DNA damage and lactatede hydrogen aseleakage by selected pesticides. *Toxicology*,104; 129-140.
- Banerjee, B.D. Seth, V. Pasha, S.T. Chakraborty A.K. 1998. Malathion induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Immunologist suppl*, (1); 496.
- Banerjee, B.D. Seth, V. Bhattacharya, A. Pasha, S.T. and Chakraborty, A.K. 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*,107; 33–47.
- Bannister,W. H. And Bannister, J. V. 1980. Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase. *Proceedings of the Federation of European Biochemical Societies Symposium No: 62*, Elsevier/ Biomedical Press,North- Holland.
- Bannister, J. V. Bannister and, W. H. and Rotilio, G. 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem*, (22); 111–180.
- Bar-Or, D., Rael, L.T., Lau, E.P., Rao, N.K.R., Thomas, G.W., Winkler, J.V., Yukl, R.L., Kingston, R.G.and Curtis, C.G., 2001. An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala -His- Lys) prevents formation of copper induced reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Comm*. 284, 856–862.
- Basaga, H. 1987. Proteinlerin radikaller tarafından inaktivasyonu. *Antioksidan maddelerin rolü. Biyokimya dergisi*, 12,(3); 25-33.
- Bendich, A. Marchlin, L.J. Scandurra, O.Burton, G.W. and Wayner, D.D.M. 1986. The Antioxidant Role of Vitamin C. *Adv. Free Radical Bio*,(2); 419–444.
- Birkhoj, M. Nellemann, C. Jarfelt, K. Jacobsen, H. Andersen, H.R. Dalggard, M. and Vinggaard, A.M. 2004.The Combined Antiandrogenic Effects of Five Commonly Used Pesticides.*Toxicol. Appl. Pharmacol*,(201);10-20.

- Bordo, D. Djinovicand K. and Bolognesi, M. 1994. Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol.* 238; 366–386.
- Bronskill, J.K. 1961. A cage to simpllify the rearing of greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *J. Lep. Soc.*, 102-104.
- Burges, H.D. 1978. Control of wax moth: Physical and biological methods. *Bee World*, 59: 129-138
- Buyukguzel, K. 2006. Malathion-Induced Oxidatif ve Stress in a Parasitoid Wasp: Effect on Adult Emergence , Longevityand Oxidative and Antioxidative Response of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera:Ichneumonidae). *J. Econ. Entomol*, 99(4); 1225-1234.
- Buyukguzel, K. Tunaz, H. Putnam, S.M. and Stanley, D.W. 2002. Prostaglandin biosynthesis by midgut tissue isolated from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Insect Biochem. Molec.* 32 (4); 435-443.
- Calviello, G. Piccioni, E. Boninsegna, A. Tedesco, B. Maggiano, N. Serini, S. Wolf, F.I.and Palozza, P. 2006. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism.*Toxicol. Appl.Pharmacol.* (211); 87–96.
- Chance, B., Sies, H.and Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiological Reviews*, 59(3); 527-605.
- Cheeseman, K.H. and Slater, T.F.1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry.*Br. Med. Bull.* Jul, 49(3);481-93.
- Chelikani P. Fita I,and Loewen P. 2004.Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*, 61 (2); 192–208.
- Davies, M. J. and Dean R. T. 1997. Radical-Mediated Protein Oxidation. From Chemistry to Medicine, Oxford University Press, Oxford. 443 pp.
- Deaton, C.M. and Marlin, D.J. 2003. Exercise-Associated Oxidative Stress, *Clin. Tech. Equine Pract.* 2,(3); 278-291.
- Dettbarn, W.D. Milatovic, D. and Gupta, R.C. 2006. Oxidative Stress in Anticholinesterase-Induced Excitotoxicity. In: R.C. Gupta, Editor, *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Academic Press/Elsevier, 511–532, Amsterdam.
- Doyotte, A. Cossu, C. Jacquin, MC. and Babut Vasseur MP. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipit peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*,39 (1-3); 93–110.
- Dubovskiy, I.M. Martemyanov, V.V. Vorontsova, Y.L. Rantala, M.J.Gryzanova, E.V. and Glupov, V.V. 2008. Effect of Bacrterial Infection on Antioxidant Activity and Lipit Peroxidation in the Midgut of *G. mellonella* L. Larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comp. Biochem. Physiol*, Part C, (148); 1-5.

- Duthie, G.G., Wahle, K.W.J. and James, W.P.T. 1989. Oxidants, Antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.*, (2); 51-62.
- Ecobichon, D.S. 1991. Toxic effects of pesticides, Ref: Casarett and Doull's Toxicology, 4 th. ed., Pergamon press, New York.
- El-Demerdash, F.M. Yousef, M.I. and Zoheir, M.A. 2005. Stannous chloride induces alterations in enzyme activities, lipid peroxidation and histopathology in male rabbit: antioxidant role of vitamin C. *Food and Chemical Toxicology*, (43); 1743–1752.
- Ellenhorn, M.J. Schonwald, S. Ordog, G. and Wasserberger J. 1997. *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, Williams & Wilkins, (1614)–63, Maryland.
- Exttoxnet, 2003. *Pesticide information Profile for Fenthion*. Cooperative Extension Offices of Cornell University, Michigan State University, Oregon State University, and University of California at Davis.
- Felton, G. W. and Summers, C. B. 1995. Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, (29); 187–197.
- Ferreira, M. Moradas-Ferreira, P. and Reis-Henriques, MA. 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary. Portugal, *Aquat Toxicol.*, (71); 39–48.
- Fridovich, I. 1975. Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.*, (44); 147–159.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase. *Annu. Rev. Biochem.*, (64); 97-112.
- Gabbianelli, R. Falcioni, G. Nasuti, C. and Cantalamessa, F. 2002. Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity. *Toxicology*, (175); 91–101.
- Gebicka, L. Metodiewa, D. and Gebicki, J.L. 1989. Pulsed radiolysis of catalase in solution. I. Reactions of O₂ With catalase and its Compound I, *Int. J. Radiat. Biol.*, 55(1); 45- 50.
- Gultekin, F. Ozturk, M. and Akdogan, M. 2000. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (*in vitro*). *Archives of Toxicology*, (74); 533–38.
- Gultekin, F. Ozturk, M. Yasar, S. and Akdogan, M. 2001. *In vivo* changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocyte induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Archives of Toxicology*, (75); 88–96.

- Hai, DQ. Varga, SI. and Matkovics, B. 1997. Organophosphate effects of antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp Biochem Physiol*, (117); 83–88.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Neut Rev*, (52); 235–65.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, causes or consequence, (344); 721–724, *Lancet*.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition, Oxford University Pres. Inc., 936s, New York.
- Harman, D. 1999. Aging and oxidative stress. (10); 24–47
- Haydak, M.H., 1936. A Food for Rearing Laboratory Insects. *J. Econ. Entomol.* 29,(5), pp. 1026.
- Hazarika, A. Sarkar, S.N. Hajare, S. Kataria, M. And Malik, J.K. 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, (185); 1–8.
- Hermes-Lima, M. Storey, J.M. and Storey, K.B. 2001. 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, pp. 263–287, Amsterdam.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.*, pp. 319–368, Wiley, Hoboken.
- Hermes-Lima, M. and Zenteno-Savín T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol*, (133C); 537–556.
- Hyršl, P., Büyükgüzel E, and Büyükgüzel K. 2007. The Effects of Boric Acid-Induced Oxidative Stress on Antioxidant Enzymes and Survivorship in *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 66; 23–31.
- İnan, D. 1998. Cu Zn SOD, GSH-Px ve TAS düzeylerinin diabetik vakalara verilen antioksidan tedavi sonrası değişimi. T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara Numune Hastanesi Biyokimya Uzm. Tezi.
- John, S. Kale, M. Rathore, N. And Bhatnagar, D. 2001. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J. Nutr. Biochem*, (12); 500–504.
- Johnson, F. and Giulivi, C. 2005. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*, 26 (4–5); 340–52
- Kale, M. Rathore, N. John, S. and Bhatnagar, D. 1999. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a

- possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicology Letters*,(105); 197–205.
- Kalender, Y. Buyukguzel,E. 2009.Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, (94); 112–118.
- Kaur, C. and Kapoor, H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Tech*, (36); 703-725.
- Kaur, ve K. Ansal, M. D.1996. Sensitivity of Selected Zooplankton Exposed to Phosphamidon, Fenitrothion, and Fenthion *Bull. Environ. Contam. Toxicol* (57);199-203, New York.
- Kavas, G.Ö. 1989.Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri.*Türkiye Klinikleri*, (9); 1-8.
- Kehrer, J.P. 1993. Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol*, (23); 21–48.
- Kono, Y. and Fridovich, I. 1982. Superoxide inhibits catalase. *J. Biol. Chem*,(257); 5751–5754.
- Kovacic, P. 2003. Mechanism of Drug and Toxic Actions of Gossypol: Focus on Reactive Oxygen Species and Electron Transfer. *Curr. Med. Chem*,(10); 2711-2718.
- Krishnan,N. 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *Journal of Insect Physiology*, (52); 11–20
- Küçükaksu, A. C. 1993. Rekombinant insan eritroproteini uygulanan ve uygulanmayan hemodiyaliz hastalarında lipit peroksidasyonu ve antioksidan sistem göstergelerinin karşılaştırılması. T.C. Sağlık Bak. Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi. Biyokimya Uzm.Tezi.
- Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higherplants. *Phyto chemistry*, 27(4); 969-978.
- Lima, PL, Benassi, JC. Pedrosa, RC. Dal Magro, J. Oliveira, TB. Wilhelm Filho, D. 2006. Time course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. *Arch Environ Contam Toxicol*,(50);23–30.
- Lowry, O. H. Rose Brough, N. J. Farr, A. L. and Randall, V. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol. *J. Biol. Chem*,(193); 265.
- Lunec, J. and Blake, D. 1990. Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes. In: Cohen R.D., Lewis, B., Albert, K.G.M.M. *The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease*. Balliere Tindall, 189-212, London.
- Mates, J.M. and Sanchez-Jimenez, F. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes, *Front. Biosci*, (4); 339–D345.

- Mathews, M.C., Summers, C.B., and Felton, G.W. 1997. Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 34, 57–68.
- Mccord, J. M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte cytochrome c (hemocuprin), *J. Biol. Chem.*,(224); 6049–6055.
- Misra, H. P. and Fridovich, I. 1972. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.*, 247(10); 3170-3175.
- Nice, D. 1997. Antioxidant based nutraceuticals. In: Yalpani, M. (Ed.), *New Technologies for Healthy Foods and Nutraceuticals*. Science Publishers, 105–123, Shrewsbury.
- Nordberg, J. and Arner, E.S.J. 2001. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biol. Med.*,(31); 1287-1312.
- Orr, W. C. and Sohal, R. S. 1994. Extension of life-span by over expression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*,(263); 1128–1130.
- Özer, M. 1962. Arı kovanlarında önemli zarar yapan balmumu güvesi *Galleria mellonella* L' nin morfoloji, biyoloji ve yayılışı üzerine araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 2:12, 26-36.
- Pedrajas, J.R., Lopez-Barea, J and Peinado, J. 1996. Dieldrin induces peroxisomal enzymes in fish (*Sparus aurata*) liver. *Comparative Biochemistry and physiology*, 115C (2); 125-131.
- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D and Fontainhas-Fernandes, A., 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pestic Biochem Physiol.*,(85);91–96.
- Peric-Mataruga, V. Blagojevic, D. Spasic, M.B. Ivanovic, J and. Jankovic-Hladni, M. 1996. Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of population origins. *J. Insect Physiol.* (43); 101–106.
- Phillips, M., Cataneo, R.N., Greenberg, J., Gunawardena, R and Rahbari-Oskouie, F. 2003. Increased oxidative stress in younger as well as in older humans. *Clinica Chimica Acta*, (328); 83-86.
- Pohlon, E. and Baldwin, I.T. 2001. Artificial diets 'capture' the dynamics of jasmonate induced defenses in plants, *Entomol. Exp. Appl.* (100); 127-130.
- Rambabu, J.P. and Rao, M.B. 1994. Effect of Organochlorine and Three Organophosphate Pesticides on Glucose, Glycogen, Lipid and Protein Contents in Tissues of the Freshwater Snail *Bellamya dissimilis* (Müller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, (53); 142-148.

- Ranjbar, A. Solhi, H. Mashayekhi, F.J. Susanabdi, A. Rezaie, and Abdollahi, M. 2005. Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, (20) ; 88–91.
- Reiter, R.J. 1998. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin, *Progress in Neurobiology*, (56); 359-384.
- Reiter, Russel J. Paredes, Sergio D. Manchester, Lucien C and Tan, Dan-Xian. 2009. Reducing oxidative/nitrosative stress: A newly-discovered genre for melatonin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44 (4); 175–200.
- Sak, O and Uçkan, F. 2009. Cypermethrinin *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)' nin Puplaşma ve Ölüm Oranına Etkisi. *U. Arı Derg*, 9(3); 88-96.
- Sancho, E. Fernando, M.D. Fernandez, C. and Andreu, E. 1998. Liver Energy Metabolism of *Anguila anguila* After Exposure to Fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, (41); 168-175.
- Sinclair, A.J. Barnett, A.H. and Junec, J. 1990. Free Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease. *Brit. J. Hos. Med.*,(43); 334-344.
- Sinha, C. Seth, K. Islam, F. Kumar, R. Shukla, C.S. Mathur, N and Srivastava Agrawal, K. 2006. Behavioral and neurochemical effects induced by pyrethroid-based mosquito repellent exposure in rat offsprings during prenatal and early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, (28); 472–481.
- Sokolovskii, V.V. 1988. Thiol Antioxidants in the Molecular Mechanisms of Nonspecific Reaction of an Organism to Extreme Actions (Review), *Vopr. Med.Khimii*, (6); 2-11.
- Song, O. 2004. Oxidative Stress: A Theoretical Model or Biological Reality. *C. R. Biologies*, (327); 649-662.
- Sun, Y. Oberley, L.W. and Li, Y. 1988. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin. Chem*, 34(3); 497–500.
- Tan, D. Terron, C. Maria, P. Flores, Luis J. Reiter and Russel J. 2007. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?. *Journal of Pineal Research*, 42 (1); 28–42.
- Thomas, M. 1995. The Role of Free Radicals and Antioxidants: how do we know that they are working. *Critical Rev. Food Sci. Nutr*, 35 (1); 21-39.
- Tunaz, H. Park, Y. Buyukguzel, K. Bedick, J.C. Nor Aliza, A.R. and Stanley, D.W. 2003. Eicosanoids in insect immunity: Bacterial infection stimulates hemocytic phospholipase A₂ activity in Tobacco hornworms, *Arch. Insect Biochem.*, Vol. 52 (1); 1-6.
- Vadhva, P., Hasan, M. 1986. Organophosphate dichlorvos induced doserelated differential alterations in lipid peroxidation in various regions of the fish brain and spinal cord. *Journal of Environmental Science and Health*, B21(5); 413-424.

- Yanbeyi, S. ve Eren, Z. 1999. Aspirin ve antioksidant but late dhydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total CAT, SOD ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri adlı tez. Onokuz Mayıs Üniversitesi.
- Yarsan, E. Tanyuksel, M. Celik, S. and Aydin, A. 1999. Effects of aldicarb and malathion on lipit peroxidation. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 555–81.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev*, (74) ; 139–162.
- Zámocký M. and Koller F. 1999. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol* ,72 (1); 19–66.
- Zenkov, N.K. Lankin, V.Z. and Men.shchikova, E.B. 2001. Oksidatif stress: biokimya patofizyolojik aspect (Oxidative Stress: Biochemical and Pathophysiological Aspects), Moscow.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adıyaman'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adıyaman'da tamamladım. 2008 yılında Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji öğretmenliği Bölümü'nden mezun oldum. 2010 yılında Adıyaman'ın Besni ilçesinde öğretmenliğe ve Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans çalışmasına başladım. 2013 yılında da Organofosforlu insektisit fention'un *Galleria mellonella* L'nin antioksidan savunma sistemi ve lipit peroksidasyonu üzerine etkileri adlı tezi bitirdim.