

54841

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇUKUROVA BÖLGESİNDEKİ SİVRİSİNEKLERDE
GELİŞEN FİZYOLOJİK İNSEKTİSİT
DİRENCİNİN İNCELENMESİ

T 54841

Bilim Uzmanı
Ümit LÜLEYAP

Doktora Yöneticisi
Prof. Dr. Halil KASAP

DOKTORA TEZİ

ADANA- 1996

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA MERKEZİ

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ç.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ümit LÜLEYAP'ın DOKTORA Tezi olarak hazırladığı "Çukurova Bölgesindeki sivrisineklerde gelişen Fizyolojik insektisit direncinin incelenmesi" başlıklı bu çalışma, Jürimizce Lisanüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

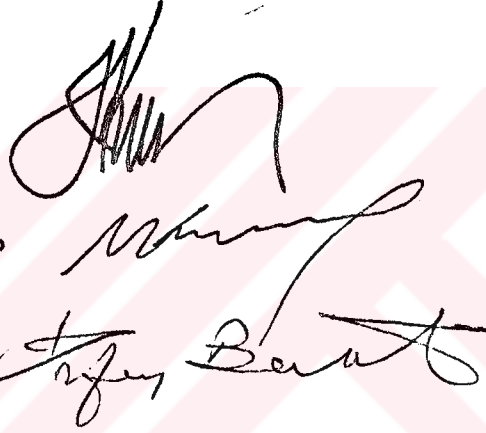
Gereğini arz ederim.

31 / 10 / 1996

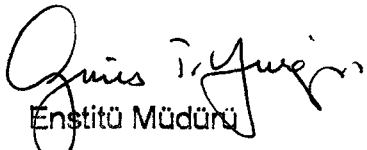
Başkan : Prof. Dr. Halil KASAP

Üye : Prof. Dr. Mülkiye KASAP

Üye : Prof. Dr. İrfan BATAT



Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
gün. 11.12.1996 ve 30/2 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Enstitü Müdürü
Prof. Güneş YÜREĞİR

TEŐEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında katkı ve desteği ile her türlü yardımlarını esirgemeyen değerli hocam ve Anabilim Dalı BaŐkanımız sayın: Prof.Dr. Halil KASAP'a; Bölüm hocalarımızdan Prof.Dr. Mülkiye KASAP ve Prof.Dr. Ali MATUR'a Biyokimyasal konulardaki yardımları için Prof.Dr. Levent KAYRIN'a sonsuz saygı ve Őükranlarımı sunarım.

Tezin yazılıp bitirilmesini sağlayan, Anabilim Dalımız Sekreteri Aysel Aslan, arazi çalıŐmalarında yardımlarını gördüğüm Teknisyen Ömer Demir ile çalıŐmalarım esnasında bana sabırla katlanan eŐim Hülya Lüleyap, kızım Doğa ve yeni doğan oğlum Uzay ile birlikte tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Personeline teŐekkür ederim.

S.B.E. 94/16 E No'lu bu alıŐma Rektörlük Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Sivrisineklerin Genel Özellikleri.....	4
2.2. İnsektisitler.....	5
2.2.1. İnsektisitlerin Sınıflandırılması.....	5
2.3. İnsektisit Metabolizması.....	8
2.3.1. Toksik Etkinin Azalması ve Ortadan Kalkması.....	9
2.3.1.1. Redistribüsyon.....	9
2.3.1.2. Biyotransformasyon.....	9
2.3.1.3. Eliminasyon.....	20
2.4. İnsektisitlerin Zararlı Etkileri.....	21
2.5. Halk Sağlığı Bakımından Önemi Olan Böceklerde İnsektisitlere Karşı Dirençlilik.....	21
2.6. İnsektisitlere Karşı Direnç Gelişim Mekanizmaları.....	22
2.7. Kimyasal İzomerizm ve Çapraz Direnç.....	27
2.8. Davranış Direnci.....	27
3. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	29
3.1 ARAÇ VE GEREÇLER.....	29
3.1.1. Araçlar.....	29
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	29
3.1.3. Biyolojik Materyalin Toplanması ve Testlere Hazırlanması.....	30
3.1.4. Ayıraçların Hazırlanması.....	31
3.2. YÖNTEMLER.....	37
3.2.1. Hasasiyet Testleri.....	37
3.2.2. Örneklerin Hazırlanması.....	38
3.2.3. Asetilkolin Esteraz Tayini.....	39
3.2.4. Glutasyon S. Transferaz Tayini.....	40

3.2.5.	Genel Esteraz Tayini.....	41
3.2.6.	Protein Standart Eğrisinin Elde Edilmesi.....	41
3.2.7.	Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	43
4.	BULGULAR.....	45
4.1.	Hassasiyet test sonuçları.....	45
4.2.	Asetilkolin Esteraz.....	48
4.3.	Glutasyon S. Transferaz.....	51
4.4.	Genel Esteraz.....	57
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	63
6.	KAYNAKLAR.....	70
	ÖZGEÇMİŞ.....	78



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo I :	α ve β naftol için yapılan dalgaboyu taraması.....	34
Tablo II:	Enzim aktivitelerinin analizi için, aktiviteyi etkileyen faktörlerin ve alt gruplarının "SPSS for Windows" istatistik programına uygun olarak kodlanması.....	44
Tablo III:	Değişik insektisitlere karşı farklı sezonlarda farklı lokalitelerden getirilen <i>An.sacharovi</i> ' lerle yapılan hassasiyet testleri sonucu elde edilen ortalama yüzde ölüm oranları.....	46
Tablo IV:	Hassasiyet testlerine etki eden tüm faktörlerin çok-yönlü varyans analiz sonuçları.....	47
Tablo V:	Hassasiyet test sonuçlarına etki eden tüm faktörlerin tek-yönlü varyans analiz sonuçları.....	47
Tablo VI:	Ach Esteraz aktivitesi saptanan örneklerin gruplandırmasında etkili olan tüm faktörlerin tanımlayıcı istatistik değerleri.....	48
Tablo VII:	Ach E enzim aktivitesine etki eden tüm faktörlerin Çok-yönlü varyans analiz sonuçları.....	49
Tablo VIII:	Ach E enzim aktivitesine etki eden tüm faktörlerin Tek-yönlü varyans analiz sonuçları.....	49
Tablo IX:	AchE enzimine ait diskriminant analiz sonuçları.....	50
Tablo X:	Glutasyon S. Transferaz Enzim aktivitesi saptanan Örneklerin gruplandırılmasında etkili olan tüm faktörlerin tanımlayıcı istatistikleri.....	51
Tablo XI:	Glutasyon S. Transferaz enzimine etki eden faktörlerin Çok-yönlü varyans analiz sonuçları.....	52
Tablo XII:	Glutasyon S. Transferaz enzimine ait tüm faktörlerin Tek-yönlü varyans analiz sonuçları.....	53
Tablo XIII:	Gonoaktif ve yağlanmış sezonlarda tüm lokalitelerde DDT, Deltamethrin ve Permethrin insektisitlerinin Glutasyon S-Transferaz aktivitelerine ait istatistik sonuçları.....	53

Tablo XIV:	Farklı sezonlarda farklı lokalitelerdeki dirençli ve hassaslara ait Glutasyon S. Transferaz aktivitesine göre; DDT, Deltamethrin ve Permethrin insektisitler arasındaki farklılığın Sheffe çoklu karşılaştırma testine göre önemlilik test sonuçları.....	55
Tablo XV:	Glutasyon S. Transferaz enzimine ait diskriminant analiz sonuçları.....	56
Tablo XVI:	Genel Esteraz aktivitesi saptanan örneklerin tüm faktörlere göre grup ortalamaları.....	57
Tablo XVII:	Genel Esteraz aktivitesine etki eden tüm faktörlerin Çok-yönlü varyans analiz sonuçları.....	58
Tablo XVIII:	Genel Esteraz aktivitesi için tüm faktörlerin tek yönlü varyans analiz sonuçları.....	59
Tablo XIX:	Farklı insektisitlere ait hassas ve dirençliler arasındaki farklılığın tüm faktörlere göre yapılan Student T-testi sonuçları.....	59
Tablo XX:	Her iki sezonda, α ve β esteraz enzimlerine ait temel istatistiki bilgiler ve esterazlar arasındaki farklılığın önemlilik testleri.....	60
Tablo XXI:	Genel Esteraz enzimine ait diskriminant analiz sonuçları.....	62

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1:	Biyotransformasyonun Prensipleri..... 10
Şekil 2:	Organoklorlu insektisit Aldrin'in oksidasyonu..... 11
Şekil 3:	Malathion'un memelilerde ve böceklerdeki biyotransformasyonu..... 13
Şekil 4:	Asetilkolin'in etki mekanizması..... 13
Şekil 5:	Asetilkolin Esteraz enziminin yapısı..... 14
Şekil 6:	Asetilkolin Esteraz enziminin reaksiyonu..... 15
Şekil 7:	Asetilkolin Esterazın normal substratı ve organofosfatlı veya karbamat inhibitörle reaksiyonunun şematik gösterimi..... 16
Şekil 8:	DDT'nin DDT Dehidroklorinaz enzimi ile Dieldrine yıkımı..... 17
Şekil 9:	Bir Ksenobiyotiğin biyotransformasyon reaksiyonları ile atılması..... 20
Şekil 10:	Bir Ksenobiyotiğin Faz I ve Faz II reaksiyonlar sonucu etkisizleştirilmesi..... 20
Şekil 11:	Detoksifikasyonda rol alan enzimlerin transkripsiyonuna ilişkin hipotetik model..... 26
Şekil 12:	Alfa naftol standart ürün eğrisi..... 35
Şekil 13:	Beta naftol standart ürün eğrisi..... 36
Şekil 14:	Protein Standart eğrisi..... 42
Şekil 15:	Propoksura hassas ve dirençli olan gruplarda AchE enzim aktivitesinin frekans dağılımı..... 50
Şekil 16:	Yağlanmış dönemde tüm insektisitlere ait hassas ve dirençlilerin Glutasyon S-Transferaz aktiviteleri..... 54
Şekil 17:	Gonoaktif dönemde; tüm insektisitlere ait hassas ve dirençlilerin Glutasyon S-Transferaz aktiviteleri..... 54
Şekil 18:	Hassas ve dirençli örneklere ait Glutasyon S-Transferaz aktivitelerinin frekans dağılımı..... 56
Şekil 19:	Farklı insektisitlerin yağlanmış dönemine ait α ve β esteraz aktiviteleri..... 61
Şekil 20:	Farklı insektisitlerin gonoaktif dönemine ait α ve β esteraz aktiviteleri..... 61
Şekil 21:	Genel Esteraz aktivitesi bakımından hassas ve dirençlilerin frekans dağılımı..... 62

ÖZ

Türkiye'de ve özellikle Adana bölgesinde 1957 yılından itibaren halk sağlığı ve tarımsal mücadele amacıyla vektör ve zararlı türlere karşı yoğun bir şekilde farklı gruplardan insektisitler kullanılmıştır.

İnsan sıtma hastalığının vektörü olan *An. sacharovi* ve benzer böceklerde insektisitlere karşı gelişen direnci tespit etmek için günümüzde uygulanan hassasiyet testleri başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem ile fizyolojik direnç konusunda detaylı bilgi alınamadığı için biyokimyasal ve genetik temele dayanan alternatif yöntemler geliştirilmiştir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında; farklı sezonlarda insektisit uygulamalarının yoğun olduğu Tabaklar, Herekli köyleri ile nispeten az insektisit kullanılan Menekşe köyü ile hiçbir insektisit baskısı altında bulunmayan ve tüm yıl boyunca aktif olan Laboratuvar Kolonisine ait *An.sacharovi* ergin dişileri de arazi örnekleriyle kıyaslanması amacıyla teste maruz bırakıldılar. Hassasiyet testlerinde; DDT %4, Malathion %5, Propoxur %1, Deltamethrin %0.025 ve Permethrin %0.25 insektisitlerinin letal dozları kullanılarak örnekler hassas ve dirençli olarak gruplandırıldı.

Çalışmanın ikinci aşamasında üç enzim çalışılmış olup, bunlar; Organofosfat ve Karbamat insektisit direncinde hedef yapı olan Asetilkolin Esteraz (AChE) enzimi ile Organoklor ve Pyrethroid insektisitlerin etkisizleştirilmesinde çok büyük rolü olan Glutatyon S-Transferaz (GST) ve tüm insektisit gruplarının etkisizleştirilmesinde rolü olan non-spesifik Genel Esteraz enzimleri çalışıldı. Hassasiyet test sonuçlarına göre yaptığımız gruplandırma ile aynı örneklerde 3 enzim için ölçtüğümüz aktivite oranları arasında uyumun nasıl olduğunun anlaşılması için yaptığımız diskriminant analizinde; AChE enzimi için %76.6, GST az enzimi için % 74.1 ve Genel Esteraz enzimi için de %62.2 gibi oldukça yüksek bir uyumluluk tespit edildi.

Her üç enzim için de saptadığımız aktivitelerin, dirençlilerde hassaslardan anlamlı derecede daha yüksek olmasının yanında gonoaktif döneme ait enzim aktivitelerinin de yağlanmış sezondan anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulundu. Ayrıca çok yoğun insektisit kullanılan lokalitelere ait AchE, GST ve Genel Esteraz enzim aktivitelerinin, nispeten az ve hiç insektisit kullanılmayan lokalitelere nazaran daha yüksek aktivite gösterdikleri bulundu.

Anahtar Kelimeler : *An.sacharovi*, İnsektisitler, Direnç enzimleri, Hassasiyet testleri.



ABSTRACT

Since 1957, a considerable amount of different groups of insecticides has been used in Turkey especially in Adana, for the control of agricultural pests and vectors of Public Health importance

The susceptibility tests have been successfully applied for many years to determine the insecticide resistance raised in pest and vector insects including *An. sacharovi*, the most important human malaria vector in Turkey. As this method does not allow to obtain sufficient information about physiological resistance, an alternative method of enzyme tests based on biochemical and genetic evaluations has been developed.

In this study both methods were used for comparison. First of all the susceptibility for insecticides were tested in adult females of *An.sacharovi* collected in various seasons from Tabaklar and Herekli villages where insecticides are used intensively for both agricultural and vector control purposes and from Menekşe village where insecticide applications are more limited. Samples taken from laboratory colonies representing the mosquitoes under non-insecticide pressure during gonoactive season were also tested to compare with the field material. By the susceptibility test using lethal doses of DDT 4%, Malathion 5%, Propoxur %1, Deltamethrin 0.025% and Permethrin 0.25% each sample was divided into resistant and susceptible groups.

Secondly the changes in the activity levels of enzymes were studied in these groups. Three enzymes were tested; Acetylcholine Esterase (AChE) which is the target site in the organophosphate and carbamate insecticide resistance, Glutathione S-Transferase (GST) which has a significant role in detoxification of organochlorine and pyrethroide insecticides and non-specific General Esterase which has a role in detoxification of all insecticides. The discriminant analysis which was used to understand the fitness between the grouping by susceptibility tests and the enzyme activity levels in these groups showed considerably high fitness rates 76.6% for AChE, 74.1 for GST and 62.2% for General Esterase.

The activities of the three enzymes were found in higher levels in resistant groups than susceptibles and also higher levels in gonoactive period than in hibernation season. It was also found that AchE, GST and General Esterase enzyme activities were higher in the localities under intensive insecticide application than in the localities where insecticides are used in lesser quantities or none.

Keyword : *An. sacharovi*, Insecticides, Resistance enzymes, Susceptibility tests



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye'de ve özellikle Adana bölgesinde 1957 yılından itibaren halk sağlığı ve tarımsal mücadele amacıyla vektör ve zararlı türlere karşı yoğun bir şekilde insektisit uygulanmıştır. İlk önce klorlu hidrokarbonlar kullanılmış (10,11,37,38 ve 56) ve gelişen direnç nedeniyle bu insektisitlerin kullanımından 1971 yılında vazgeçilmiştir (58, 67). Daha sonra organofosfatlı insektisitlere geçilerek 1984 yılında Malathion'un, 1990 yılında da Pirimiphos methyl'in kullanımından vazgeçilmiştir (37, 41). 1995 yılına kadar karbamatlılar grubundan Bendiocarb kullanılmış ve günümüzde tekrar Pirimiphos methyl'in kullanımına geri dönülmüştür.

Birinci Dünya Savaşından bu yana canlıların sistematiğinde farklı yerler işgal eden farklı türlerin kontrolü amacıyla kullanılan değişik kimyasal maddelere karşı hedef canlılarda bu kimyasal maddeleri etkisizleştiren savunma mekanizmalarının (**direnç**) geliştiği gözlenmektedir.

Böceklerin kimyasal kontrolü amacıyla kullanılan insektisitlere karşı gelişen direnci: fizyolojik direnç ve davranış direnci olarak sınıflandırabiliriz. Her iki direnç mekanizması da kalıtsal olup genlerle kontrol edilir. Direnç bir kez ortaya çıktığında aynı insektisit kullanılmaya devam edilirse dirençli bireylerin sayısı popülasyonda hızla artar (**negatif seleksiyon baskısı**). Bu nedenle direncin esası genetik ve biyokimyasal kaynaklıdır.

Halk sağlığı ve tarım için zararlı böceklerin kimyasal mücadelesi için hazırlanan insektisitlerin kullanımında; hedef canlının genomunda meydana gelen spontan mutasyonlarla değişik direnç tiplerinin ortaya çıkması, negatif seleksiyon baskısı ile direnç genlerinin popülasyonda etkin duruma gelmesi, insektisit seçiminin iyi yapılamaması ve insektisit uygulandığı söz konusu ülkenin özel durumuna uygun letal doz tayininin yapılmamış olmasından kaynaklanan başarısızlıklar vardır. Genelde tüm ülkelerde direnç gelişiminin takip edilmesi amacıyla, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) nün belirlediği hassasiyet testleri uygulanmaktadır.

Ancak her tür'ün biyolojik yapısının ve dirençle ilgili gen frekansının farklı olmasından dolayı WHO'nun vektör türler için belirlediği letal doz, benzer bir tür için yetersiz olabilmektedir. Değişik ülkelerde zararlı böceklere karşı kullanılacak, potansiyel insektisitlerin sayısı iki önemli nedenden dolayı hızla azalmaktadır. Bunlar; daha önce hiç uygulanmamış insektisit gruplarına bile kimyasal yapı benzerliğinden (izomerizm) kaynaklanan çapraz dirençin gelişimi ve direnç gelişimi saptanan bir insektisite karşı alternatif yeni bir insektisit üretilmesinin getireceği ekonomik yükten kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, direnç gelişimini sürekli izlemek için tüm ülkelerde WHO tarafından geliştirilen **İmpregne insektisit kağıdı tüpleri** ile yapılan hassasiyet testleri kullanılmaktadır. Çok pratik olan bu yöntemle, direncin kaynağına bakılmaksızın dirençli bireylerin oranı kolayca saptanabilmektedir.

Bir insektisit veya insektisit grubuna hassas olan bir böcek popülasyonunun bazı bireylerinin insektisitten etkilenmemesi durumunda, tolerans veya dirençlilik söz konusudur. Yani daha önce tamamen öldürücü olan bir insektisitinin diagnostik =letal (% 99 ölüm veren doz) dozunun bazı bireyleri öldüremez hale gelmesi durumunda tolerans gelişiminden söz edilir. Tolerans, bazı durumlarda genetik temele dayalı olabilmekle birlikte yaş ve mevsime bağlı bazı fizyolojik özellikler (yağlanma ve hibernasyona girme gibi) nedeniyle dirençle ilgili mutant geni taşımaları bile insektisitlerden daha az etkilenmektedir. Fizyolojik direnç ise tamamen genetik temele dayanmaktadır. Fizyolojik direncin saptanması; farklı insektisit gruplarına karşı gelişen dirençle ilgili direnç geninin saptanması, İnsektisit alımının azaltılmasına dayalı direnç gelişiminde aktif rol oynayan reseptör yapısının ve sayısının tayini, İlgili insektisitinin hedef etki gösterdiği enzimin yapısında meydana gelen konformasyonel değişikliğin saptanması ve İnsektisitlerin biyotransformasyona uğratılarak etkisizleştirilmesinde primer rol oynayan detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerindeki değişikliklerin incelenmesi ile mümkündür. Ancak pratikte tüm bu yöntemlerin kullanılması oldukça zordur.

Bu yöntemlerden; dirençli böceklerde, detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerindeki değişikliklerinin ölçümüne dayanan ve çeşitli dirençli türlerde yapılan çalışmalarla geliştirilmiş olan biyokimyasal teknikler kullanılmaktadır (1,12,18,29,50 ve 77). Klasik bir uygulama olan insektisit emdirilmiş test kağıtları ile yapılan hassasiyet test ölçümlerini daha ayrıntılı incelemek için geliştirilen ve **Metabolik direnç testi** diyebileceğimiz bu yöntemde, detoksifikasyon enzimlerinden Asetilkolin Esteraz, Glutasyon S-Transferaz ve Genel Esteraz aktivitelerindeki değişiklikler saptanmaktadır.

Bu çalışmada, pratikte daha çok kullanılabilen klasik hassasiyet testi ile biyokimyasal test yöntemlerinin; Çukurovada insektisitlere karşı direnç gösteren insan sıtma vektörü *An. sacharovi* için kullanılabilirliğinin ve iki testin birbiri ile uyumunun araştırılması planlanmıştır. Bunun için; Çukurova bölgesinde, insektisit uygulamalarının (seleksiyon baskısı) farklı olduğu bölgelerden farklı mevsimlerde toplanan ergin *An. sacharovi* örnekleri önce klasik hassasiyet testi yapılarak hassas ve dirençli olarak gruplandırılarak daha sonra bu gruplara ait Asetilkolin Esteraz, Glutasyon S-Transferaz ile Genel Esteraz enzim aktiviteleri ile bu gruplandırma arasında uyumlu ilişkiler olup olmadığını incelemek ve insektisit direncinin son durumu hakkında daha güvenilir bilgilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sivrisineklerin Genel Özellikleri

Sivrisineklerin bağılı bulunduğu *Culicidae* Familyası, içerdiği 2500 kadar tür ile insan ve hayvan yaşamında oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu familya içerisinde *Anopheles*, *Culex* ve *Aedes* gibi insan sağlığını tehdit eden cinsler yer almaktadır. Sivrisinekler tam metamorfoz geçiren Holometabol böceklerdir. Yumurta, larva ve pupa evreleri suda, ergin evreleri ise karada geçer. Sivrisinekler, sıtma ve filarya gibi paraziter hastalıklar ile sarı humma, ensefalitler gibi Arthropod (Eklembacaklı) kökenli viral hastalık etkenlerinin de vektörüdür.

Subtropikal kuşakta yer alan ülkemizde, iklimsel ve doğal koşullar, sivrisineklerin yaşaması ve üremesi için son derece uygundur. Ülkemizde *Anopheles* cinsinin on türü bilinmektedir. Bu türlerden, sıtmanın yayılması bakımından en önemli olan *An. sacharovi*'nin hem doğada hem de laboratuvarında birinci derecede sıtma vektörü olduğu saptanmıştır (39, 57). Vektör, Çukurova bölgesinde oldukça yaygın olup, tüm yıl boyunca görülmekte, hatta kış aylarında bile kan emmiş dişilerine rastlanmaktadır (38).

An. sacharovi larvalarına deniz seviyesinden 1720 metre yüksekliğe kadar olan bölgelerde rastlanması (23) ve 21-32 C° arasındaki sıcaklıklara uyum sağlayabilmeleri, ayrıca erginlerin yüksek sıcaklığa ve nem'e toleranslı olmaları (2, 8) ülkemizde ve özellikle Çukurova bölgesinde bazı *Anopheles* türlerinin yaygın olarak bulunmasına ve sıtmanın yayılmasına neden olmaktadır. *An. sacharovi* dişileri, Çukurova bölgesinde tüm yıl boyunca bulunmakta ve yumurta gelişiminin durması (**Gonodotrofik Dissosiasyon**) çok kısa bir periyoda (sadece Aralık-Şubat ayları) rastlamaktadır (8,38). Vektör, kış aylarında sıcak ve kuru olan insan barınaklarından ziyade kuytu, nemli ve sıcaklığı 15-16° C olan, içinde hayvan bulunan barınakları tercih etmektedir.

2.2 İsektisitler

Halk sağlığı ve tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen haşerele, kemiriciler, mantarlar gibi genelde hayvansal kökenli zararlılara karşı kullanılan kimyasal maddelere **pestisit** denir. Pestisitler içinde yer alan ve İsekta (**Insecta**) sınıfını oluşturan böcekleri, herhangi bir biyolojik safhada öldürmek için kullanılan kimyasal madde ve madde gruplarına ise **isektisit** denir.(39)

2.2.1 İsektisitlerin Sınıflandırılması

İsektisitleri, etkili olduğu böceğin biyolojik evrelerine, böceğin vücuduna giriş biçimine ve kimyasal yapılarına göre değişik biçimde sınıflandırmak mümkündür. Etkili olduğu böceğin biyolojik evrelerine göre **adultisit** ve **larvisit** olarak isimlendirilir.

Böceğin vücuduna giriş biçimine göre; mide zehirleri, solunum zehirleri ve temas zehirleri olarak sınıflandırılır. Günümüzde kullanılan isektisitlerden, mide zehirleri inorganik, diğerleri ise organik bileşiklerdir.

1.Mide Zehirleri: Arsenikli bileşikler ve paris yeşili bu gruptan olup genel protoplazma zehirleridir. Etkilemesi için orta barsağa alınması gerekir.

2.Solunum Zehirleri: Kolayca buharlaşabilen, eriticiler içerisinde çözeltisi hazırlanan organoklorlu ve organofosfatlı bileşikler buharlaşarak solunum zehiri olarakta kullanılırlar. Örneğin diclorvos bu gruptan etkili bir isektisittir

3.Temas Zehirleri:Temas yoluyla doğrudan doğruya böceğin kutikulasından, vücudun içine giren zehirli maddelerdir. İnorganik temas zehirleri önemli derecede çevre kirlenmesine neden olduğundan bugün, mümkün olduğunca kullanılmamaktadır.

Pratikte daha yaygın olarak, isektisitlerin kimyasal yapılarına göre yapılan sınıflandırması kullanılmaktadır. Buna göre; İsektisitler, **doğal** ve **sentetik** bileşikler olmak üzere iki grupta toplanır.

A. DOĞAL ORGANİK BİLEŞİKLER

A.1 Bitkisel Kökenli Bileşikler

Bu gruptaki bileşikler temas yolu ile vücuda girerek sinir-kas sistemi üzerine zehir etkisi yaparlar. Pyrethrum (**Pyrethrine**) ve rotenon bu gruba örnek olarak verilebilir. Pyrethrum  eŐitli *Chrysanthemum* türlerinin çiçeklerinden elde edilir. Ancak bu madde hava ile temas edince okside olur, su ile temas edince de hidrolize olur ve ayrıca fotolabildir (Günümüzde sentetik olarak üretilen pyrethroid insektisitlerde bu gibi olumsuzlukların giderilmesine ve fotostabil olmasına çalıŐılmaktadır). Bu nedenle kalıcılık süresi kısadır. Kalıcılık s resinin kısılalığı ve pahalı oluŐu nedeniyle ancak diğer insektisitlere karşı direnç kazanmıŐ olan böceklere karşı uygulanmaktadır. Bazı baklagillerin kökünden elde edilen rotenone ise hem temas hem de mide zehiri olarak etkilidir.

A.2 Petrol Bileşikleri

Su yüzeyine dökülerek bir tabaka oluştururlar. Havanın serbest oksijeni ile solunum yapan böceklerin boğularak ölmelerine, kutikuladan ge erekte zehirlenmelerine neden olur. Petrol bileşikleri diğer insektisitlerin eriticisi olarak da kullanılırlar.

B. SENTETİK ORGANİK BİLEŞİKLER

Son 10-15 yıl içinde vektör böceklerin kontrolünde organoklorlu, organofosfatlı, karbamatlı olmak üzere 3 esas grup insektisit kullanılması ağırlık kazanmıŐtır (71, 72).

B.1 Organoklorlu Insektisitler

Organoklorlu insektisitler asiklik ve siklik çeşitli hidrokarbonların klorlanmasıyla elde edilirler.  nemli  l de yağda erir özelliklerinden dolayı kas-sinir sistemi üzerinde zehir etkisi yaparlar. Bu grup insektisitlerin çoğu temas yolu ile

bazıları da mide zehiri ya da solunum yolu ile vücuda girerek etki gösterirler. Etki sürelerinin uzunluğu organofosfor bileşiklerden daha fazladır. DDT, DLN (Dieldrin), BHC (Benzen heksaklorid) bu gruptandır. Bu bileşiklerin çoğu uzun ömürlü olduklarından çevrede kimyasal madde birikimine yol açarak besin pramidinin değişik basamaklarına artan konsantrasyonlarda (**biyolojik yükseltgenme**) aktarılır.

B.2 Organofosfatlı İsektisitler

Çok toksik olan organofosforlu isektisitler yaygın olarak tarımda kullanılmaktadır. 1942 yılından günümüze kadar 50.000 den fazla türevi sentez edilmiştir. Bunlar halojenli ya da halojensiz fosfat, tiyofosfat, ditiyofosfat v.b. bileşiklerdir.

Organofosforlu isektisitlerin başlıca etki mekanizmaları Asetilkolin Esteraz (AchE) aktivitesinin inhibisyonu şeklindedir. Organofosfor bileşikleri AchE enzimini irreversibl (geriye dönüşümsüz) olarak inhibe edip periferde bütün kolinerjik kavşaklarda ve sinapslarda asetilkolin birikmesine neden olarak impuls iletiminin sürekli olmasından kaynaklanan paralizle etkilidirler (15, 32, 78)

Organoklorlu isektisitlere göre daha az dayanıklıdırlar ve suda kolay hidrolize uğramalarından dolayı kalıcılık süreleri kısadır. Malathion, Fenitrothion, Parathion, Dichlorvos, Fenithion, Pirimiphos methyl (Actellic) ve Temephos (Abate) bu gruptandır. Alkali yüzeylerde yapısal bozukluğa uğradıklarından taze kireç badanası yapılmış yüzeylere uygulanmamalıdır (39).

B.3 Karbamatlı İsektisitler

Bitkilerde mantar hastalıklarının önlenmesi amacıyla 1930 yılından günümüze kadar fungusit ve herbisit olarak **karbamikamid** (karbamad) türevi bileşikler yaygın olarak kullanılmaktadır (15). Etki mekanizması organoklorlu bileşiklerde olduğu gibi kas-sinir sistemi üzerine ve organofosfatlılar gibi Asetilkolin Esteraz aktivitesinin bloke edilmesi şeklindedir. Ancak AchE enzimi üzerinde reversibl inhibisyon yaptıklarından sadece AchE yönünden organofosforlu isektisitlere nazaran toksik etkileri nispeten azdır. Bunlar sadece adultisit olarak kullanılırlar. Temas zehirleridirler. Bendiocarb, Karbaryl ve Propoxur bu gruptandır (39).

Karbamat bileşiklerinin metabolitleri, organizmada SH-enzim gruplarıyla reaksiyona girerek metal kelatları oluştururlar. Bu etkileriyle; α - ketoglutaroksidaz, Purivat dehidrojenaz, Süksin dehidrojenaz, Tirozinaz, Sitokromlar ve Krebs siklusunun enzim sistemlerini in vivo ve in vitro inhibe ettiklerinden diğer insektisit gruplarına nazaran memelilere olan toksisitesi daha fazladır (15).

B.4- Pyrethroid İsektisitler

Sentetik olarak elde edilmiş olan Pyrethrinlerdir. Etki mekanizmaları doğal pyrethrinlerinki gibi kas-sinir sistemi üzerinde etki gösterirler. Bunlar genel olarak ani etki (**krock-down**) yaparlar. En çok kullanılanları Allethrin, Resmethrin, Permethrin ve Deltamethrindir. (17)

Sentetik organik bileşikler grubuna dahil olan böcek büyüme hormonları, Feromonlar ve Mikrobial insektisitlerin ise günümüzde kullanımları çok sınırlıdır.

2.3 İSEKTİSİT METABOLİZMASI

Pestisitler zehirli olan "Etkili Madde" içerirler. Bu etkili maddeye "**aktif madde**" denir. Etkili madde çok zehirli olduğundan ve doğrudan doğruya suda çözülemediğinden saf olarak kullanımı zordur. Bu yüzden aktif maddeye kullanım amaçlarına göre uyuşturucu katı veya sıvı dolgu maddeleri karıştırılır. Aktif maddenin uyuşturucu, dolgu ve katkı maddeleriyle karıştırılmasına "**formulasyon**" adı verilir.

Kimyasal bir maddenin canlı organizmalar üzerindeki etkisi "**Biyolojik aktivite**" olarak ifade edilir. Bir pestisidin biyolojik aktivitesi, etkili madde ile yakından ilgilidir. Ancak etkili maddenin formulasyonunda kullanılan dolgu ve katkı maddesi de o maddenin biyolojik aktivitesine olumlu veya olumsuz etki yapar.

2.3.1 Toksik Etkinin Azalması ve Ortadan Kalkması

Organizmaya giren toksik maddenin oluşturduğu etkinin azalması yada ortadan kalkması, redistribüsyon, biyotransformasyon ve eliminasyon olmak üzere başlıca üç şekilde olur

2.3.1.1 Redistribüsyon

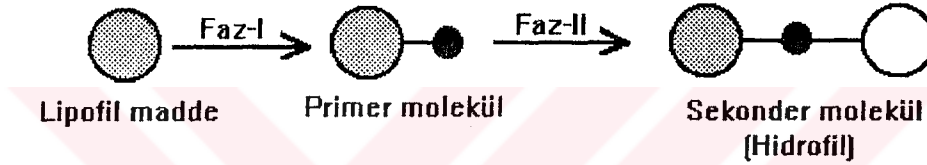
Yağda eriyen herhangi bir kimyasal madde metabolize olup vücuda dolaşım yoluyla dağıldıktan sonra yağ dokusuna geçerek konsantrasyonu düşer ve bu dağılım evresine **redistribüsyon** adı verilir. Madde sık sık ve yüksek dozda verilirse yağ dokusunda satüre(=doymuş) olacağından redistribüsyon gerçekleşemez ve maddenin etkisi ortaya çıkar. Aynı durum liposolübl diğer toksik maddeler, solventler ve gazlar için de geçerlidir.

2.3.1.2. Biyotransformasyon

Genel olarak metabolizma, hayatın devamı için gerekli olan ve organizmada oluşan tüm kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir. Diğer taraftan bir organizma için yabancı olan kimyasal maddelerin (**ksenobiyotiklerin**) kimyasal değişimleri de metabolizma olarak tanımlanırsa da biyotransformasyon kelimesi bu tür reaksiyonlar için daha uygundur. Çeşitli yollarla organizmaya giren kimyasal maddeler, enzimlerin katalitik etkisi ile kimyasal reaksiyonlara girerler ve böylece "**metabolitlere**" dönüşürler. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu organizma için birçok açıdan önem taşımaktadır. Yağda çözünen apolar kimyasal maddeler enzimatik reaksiyonlarla daha polar metabolitlere dönüşerek atılımları kolaylaşır. Diğer taraftan yabancı kimyasal bir madde ancak organizmada enzimatik reaksiyonlar sonucu "aktif metabolite" dönüşerek toksik etki gösterir. Örneğin, organikfosfat tiyoester yapısındaki insektisitlerin **okso** bileşiklerine (**aktif metabolit**) değişmesinden sonra AchE enzimini inhibe etmeleri örnek olarak verilebilir.

Yabancı kimyasal madde, biyotransformasyona uğramadan önce ister biyolojik aktif ana madde olsun, isterse biyolojik aktivitesi olmasın (=inaktif ana madde), organizmada önce değişik mekanizmalarla değişik etki gösteren metabolitlere dönüşür sonra da konjugasyonla inaktif hale geçerek atılır. Bu konjugasyon basamağı, biyotransformasyonun toksisite azalması ile ilgili olduğu için bu basamağa **detoksifikasyon** (=zehirsizleştirme) denilmektedir(5).

Biyotransformasyon reaksiyonları genel olarak iki safhada meydana gelir. Önce moleküle bir fonksiyonel grup sokulur (**Faz.I**); Bu grup suda çözünürlüğü arttırmakla birlikte esas olarak, primer maddenin aşırı polar bir ligand (bağlayıcı molekül) ile birleşmesi (**Faz II**) imkanını sağlar (Şekil-1).



Şekil- 1 Biyotransformasyonun prensibi

A. Faz- I Reaksiyonları

Yükseltgenme (oksidasyon), indirgenme (redüksiyon) ve hidroliz reaksiyonlarını kapsar.

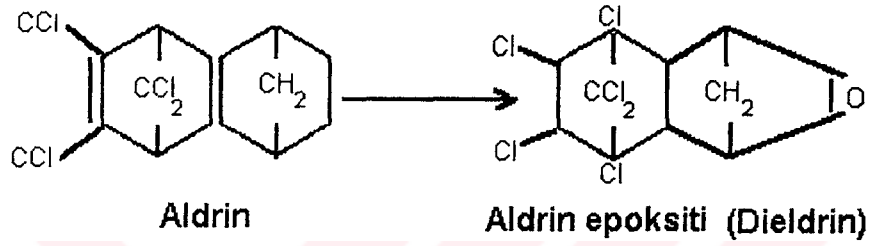
A.1. Oksidasyonlar

Oksidasyon reaksiyonları, ilaç ve ksenobiyotik moleküllerinin polaritesini artırır. Bunun sonucunda moleküllerin suda erirliği (hidrofilliği) artar ve eliminasyon kolaylaşır. Oksidaz, monooksijenaz ve dioksijenaz enzimlerinin katalize ettiği oksidasyon reaksiyonları, biyotransformasyon prosesinde en ağırlıklı olanlardır. Bu multi enzim sistemi, hücrenin endoplazmik retikulumundan meydana gelen mikrozomlarda yerleşmişlerdir. Mikrozomları elde etmek için doku homojenatı 9000-12.000 g'de 30 dakika santrifüj edilir. Supernatant alınarak 105.000 g de 1 saat

santrifüj edilir. Sediment mikrozom fraksiyonu olup, karışık fonksiyonlu oksidaz (**KFO=MFO=mix function oxidase**) enzimlerini içerir. Bu enzim sisteminin başlıca komponenti olan sitokrom P-450 bir hemoproteindir. Birçok oksidasyon reaksiyonlarının en son oksidasyon basamağında (**terminal oksidaz**) rol alır. 450 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon verir.

Aromatik Hidroksilasyon ve Epoksit Oluşumu.

Organoklorlu bir insektisit olan aldrinin epoksidi olan dieldrine dönüşümü, Naftalinin naftol'e dönüşümü aromatik halka oksidasyonlarına örnektir. (Şekil-2).



Şekil- 2 Organoklorlu insektisit, Aldrin'in oksidasyonu

Ksenobiyotiklerin oksidasyonu ile ilgili diğer oksidasyon reaksiyonları ise şunlardır:

Alifatik zincir hidroksilasyonu

-Dealkilasyon

-n-Oksidasyon

-Oksidatif Deaminasyon: Amfetaminlerin Fenilasetona dönüşmesi

-S-Oksidasyon

-Oksidatif Dearilasyon (Paratiyon'un Paraoxon'a dönüşmesi)

A.2. Redüksiyon (İndirgenme) Reaksiyonları

Redüksiyon reaksiyonları oksidasyon reaksiyonlarından daha az meydana gelmektedir. Başlıca redüksiyon reaksiyonları:

-Aromatik Nitro İndirgenmesi

-Disülfürlerin İndirgenmesi

-Azo İndirgenmesi

-Keton ve Aldehitlerin İndirgenmesi

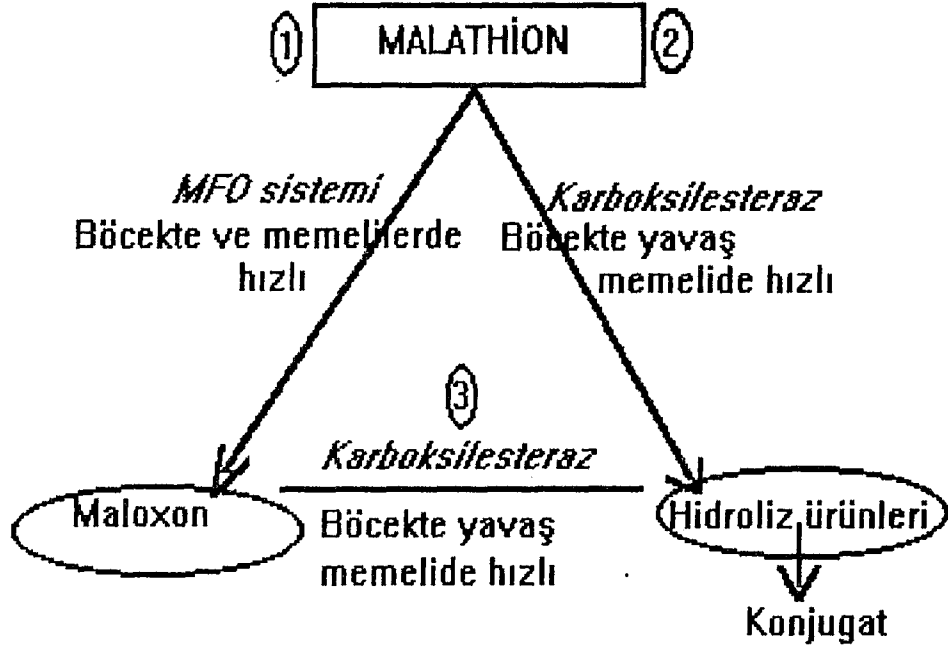
A.3. Hidroliz

Ester, amid veya fosfat ester bağını içeren ksenobiyotiklerin büyük bir kısmı organizmada hidrolize uğrarlar. Böylece bir ester veya amidin hidrolizi ile oluşan asit, alkol veya amin ya doğrudan veya faz II. reaksiyonları ile konjuge olarak atılırlar

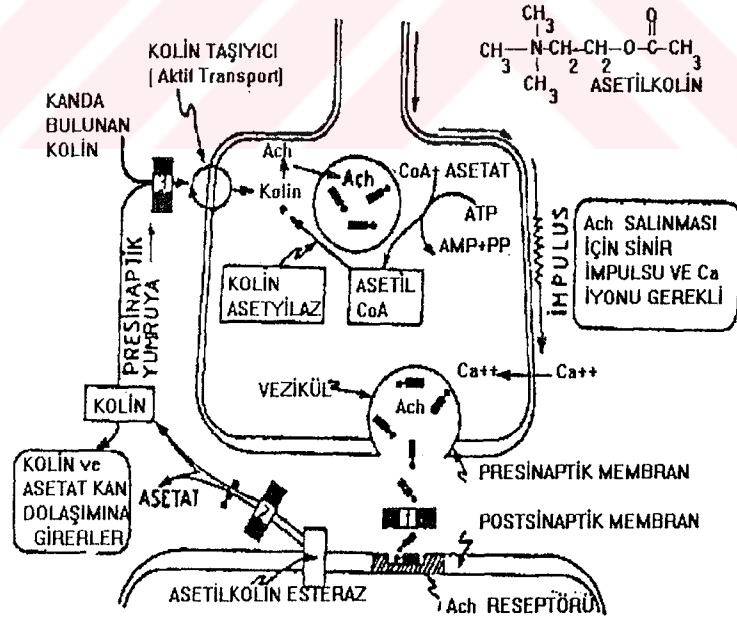
A.3.1 Esterazlar

Doku esterazları "A-tip esterazlar" ve "B-tip esterazlar" olmak üzere iki sınıftır. Birinci sınıf esterazlar, nonspesifik aril esterazlar olup kısa zincirli aromatik esterleri hidroliz ederler (Paration=Organofosfat tiyo esterleri). B-tip esterazlar ise plazmadaki kolinesterazları, karboksil esterazları ve lipazları içerir. Birçok hidrolazlar, sinir gazlarını (sarin, tabun), insektisitleri (malathion) ve herbisitleri (Fenoksiasetik asit) hidrolitik reaksiyonlarla detoksifiye ederler(33).

Bazı karasinek ve sivrisinek türleri organofosforlu insektisit olan malathion'a karşı dirençlidir. Çünkü bu türlerde malathion'u etkisizleştiren **karboksilesteraz** enzimi gelişmiştir. Günümüzde insektisit veya benzeri kimyasal maddelerin canlılar üzerinde yaptığı olumsuz etkiler gözönüne alınarak seçici etkili kimyasal maddeler geliştirilmiştir. Böceklerde ve memelilerde, Malathion'un biyotransformasyon yolları aynı fakat hızları farklıdır (şekil-3).Memelilerde karboksilesteraz aktivitesi yüksek olduğu için çabuk inaktif hale geçer.

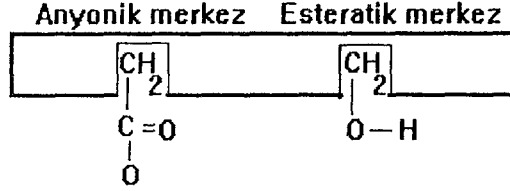


Şekil- 3 Malathion'un memelilerde ve böceklerdeki biyotransformasyonu



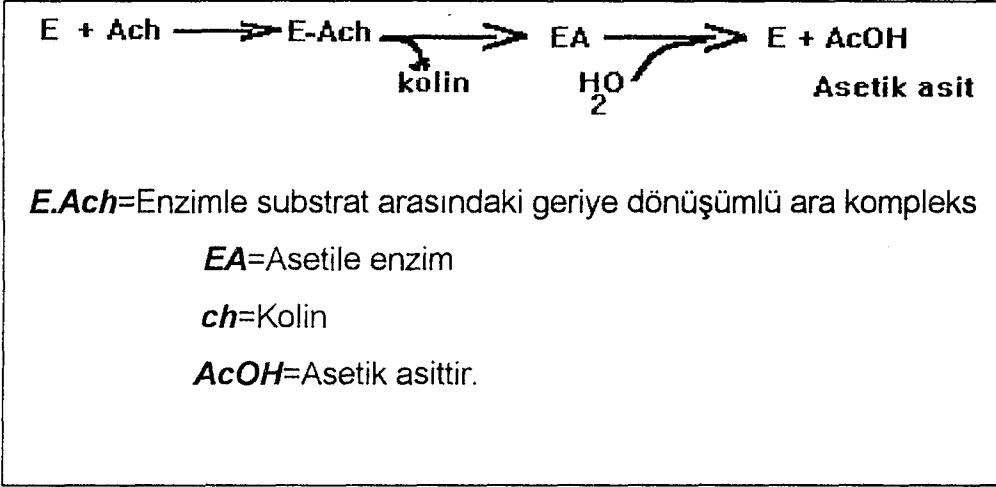
Şekil- 4 Asetilkolin'in etki mekanizması

Omurgalılardaki AchE enziminin etki mekanizması detaylarıyla çalışılmış ve oldukça iyi anlaşılmıştır (Şekil-4) (19). Buna göre;Omurgalı enziminin iki bağlama bölgesi içerdiğine dair bir görüş hakimdir (Şekil-5) (19, 76).



Şekil-6. Asetilkolin Esteraz enziminin yapısı

Bu bağlama bölgelerinden bir glutamat grubu içerebilen anyonik uç, asetilkolinin pozitif yüklü nitrojen atomuyla etkileşim halindedir. (Anyonik uç, pozitif yüklü quaterner amonyumunu kendisine çeker), 0.5 nm kadar uzağında bulunan esteratik uç (43, 75) dört değerli bir kök içerir ve asetilkolinin ester bağının ayrılmasından sorumludur. Esteratik merkez bir serin grubu içerir ve asetilkolinin, asetil grubunu kendisine çeker. Reaksiyon esnasında serin grubunun asetile olduğu düşünülmektedir. Anyonik kutupta, asetilkolinin hidrolizi sonucu kalan kolinin de buradan kopmasıyla Asetilkolinesteraz yeni asetilkolinleri hidrolize etmeye hazır duruma geçer Böceklerdeki Asetilkolinesteraz enzimi ile ilgili bilgiler omurgalılardaki enzime büyük benzerlik göstermektedir (26, 43). Karasineğin baş asetilkolinesterazı için bir etki mekanizması önermişlerdir (Şekil-7). Bu mekanizma omurgalı enziminin mekanizmasına oldukça benzemektedir (26, 43).



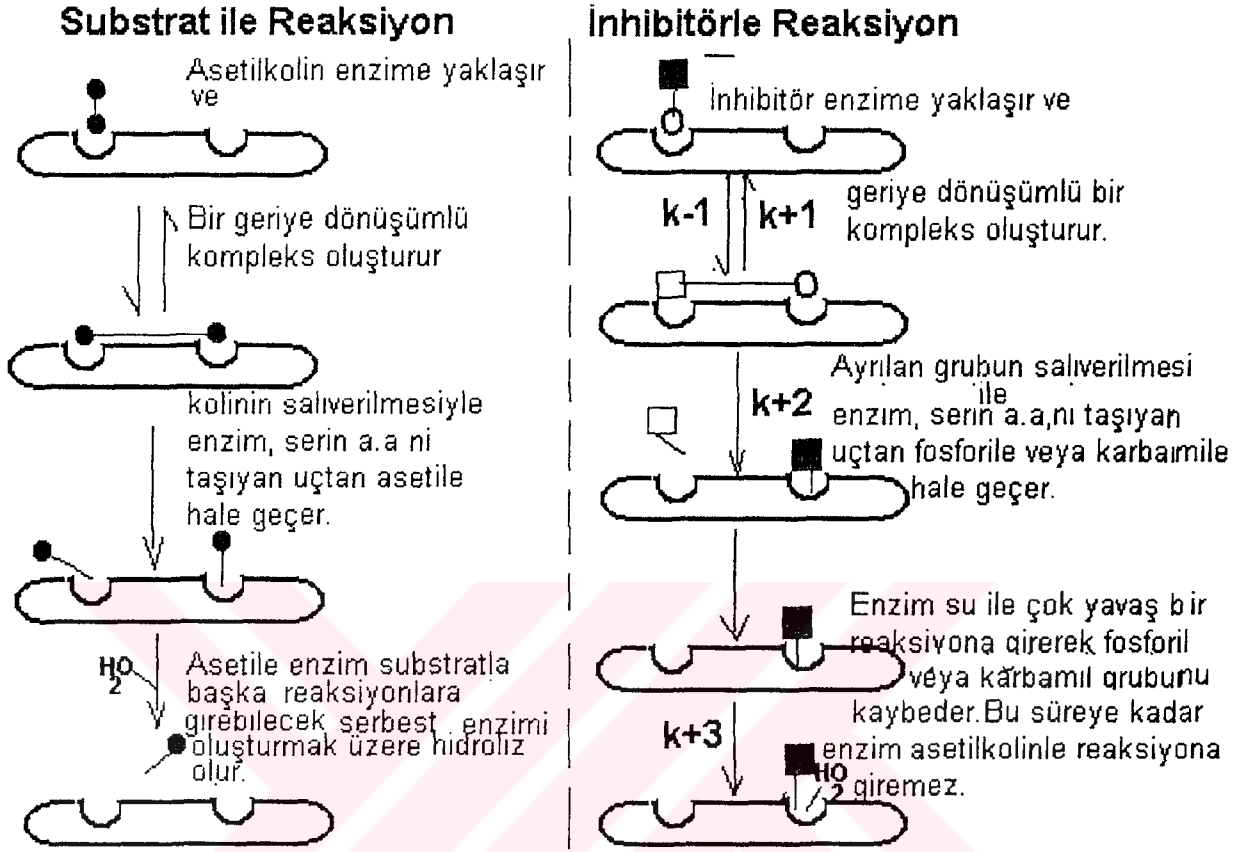
Şekil- 6 Asetilkolin Esteraz enziminin reaksiyonu

Organofosforlu bileşikler asetilkolinesteraz enziminin aktif merkezi ile sadece esteratik kutupta dört değerli kök ile kovalent bağla birleşir. Asetil kökü esteratik kutupta su ile kimyasal reaksiyon yaparak kolaylıkla asetil kökünü atabilir. Fakat organofosfor bileşiklerini atamaz. Çok yavaş ilerleyen bu kimyasal reaksiyon pratik olarak irreversibl kabul edilir (15). Yani enzim başlangıçta substrat ile bir kompleks oluşturur, sonra kolinin serbest bırakılmasıyla enzim asetile hale gelir.

Su ve asetile enzimin reaksiyonu ile asetik asit ve orijinal serbest enzimi oluşturmak üzere deasetilasyon gerçekleşir (Şekil-7).

Asetilkolinesteraz'ın inhibisyonu üzerine modern çalışmalar Aldridge ve Wilson tarafından özetlenmiştir (1, 75).

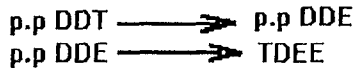
Organofosforlu ve karbamatlı bileşiklerin herikisi tarafından üretilen inhibisyonun esas özelliği, enzimle normal substratın bir analogu olarak reaksiyona girmeleridir (9).



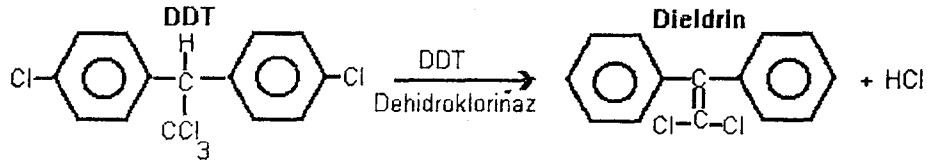
Şekil-7 Asetilkolin esterazın normal substratı ve organofosforlu veya karbamat inhibitörle reaksiyonunun şematik gösterimi

A.3.2 DDT Dehidroklorinaz

1950 yıllarında, DDT'ye rezistans kazanan ev sineklerinin DDT'yi insektisit özelliği olmayan bir metabolitine çevirdikleri gösterilmiştir. DDT dehidroklorinaz enzimi, bu aktivasyonu sağlamaktadır. Enzim böceklerde olduğu gibi memelilerde de bulunmaktadır.



dönüşümünü gerçekleştirdiği halde O-P (Orto - Para) izomerlerini çevirmez (şekil-8). DDT dehidroklorinaz enzimi, indirgenmiş glutatyon (GSH) ortamında etkisini gösterir. Ancak reaksiyon sonunda GSH düzeyi değişmez.



Şekil- 8 DDT'nin DDT Dehidroklorinaz enzimi ile Dieldrin'e yıkımı

B. Faz II. Reaksiyonları

Çeşitli konjugasyon veya sentez reaksiyonlarını içerir. Konjugasyon reaksiyonları, kimyasal maddelerin organizmadaki endojen maddelerle (Glukuronik asit, metil grubu, sulfat, Glutatyon, aminoasit ve asetil grupları ile) birleşmesi şeklinde gerçekleşir. Enerji isteyen reaksiyonlar da ya konjugasyon maddesi ile aktive olur ve toksik madde ile birleşir; veya substrat aktive olur ve endojen konjugasyon maddesi ile birleşerek konjugat oluşur.

I. Aktif konjugasyon maddesi + Substrat → Konjugat

II. Aktif Substrat + Konjugasyon maddesi → Konjugat

B-1 Glukronid asitle konjugasyon

Bu tip reaksiyonlar sonucunda alkol, fenol, amin ve eter gibi glukronidler; asitlerle ester tipi glukronidler oluşur.

B-2 Sulfat Konjugasyonu

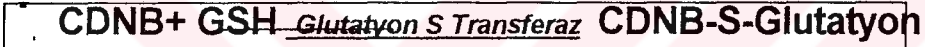
Primer sekonder, tersiyer alkoller, fenoller ve arilaminler endojen sülfat ile "sulfat esterlerini" oluşturur. Bu konjugatlar iyonize ve suda çözüldükleri için hızlı bir şekilde organizmadan atılırlar. Aktif sulfat ile konjugasyonu sulfotransferazlar kataliz eder.

B-3 Metilasyon

Birçok toksik element çevrede biyolojik sistemlerde metilasyona uğrarlar (Biyometilasyon), civa, kurşun, kalay, palladyum, platin, talyum ve kükürt gibi maddeler metile olabilirler. Bu biyometilasyonda S-adenozilmetiyonin veya B₁₂ vitamini metil dönörü görevi yaparlar.

B.4. Merkapturik asit oluşumu

Bir tripeptid olan, redükte glutatyon (GSH) elektrofilik karbon atomu içeren kimyasal maddelerle tiyoeter bağı oluşturur. Tiyoeter bağı, karbon atomu ile glutatyonun sülfidril grubu arasında oluşur. Bu şekilde aktif substrat (kimyasal-SG), **Glutatyon S.Transferaz** enzimlerinin katalizörlüğü ile hidroliz olur. Glutatyon transferaz enzimi, toksik bileşiklerin metabolitlerinin glutatyon ile konjugasyonunu katalizleyerek biyolojik savunma oluşturan önemli bir enzimdir. Bu konjugasyon reaksiyonu genel olarak şu şekilde özetlenebilir;



Glutatyon S-Transferazlar elektrofilik merkez içeren bileşiklerin, Glutatyon (redükte=GSH) ile konjugasyonunu sağlayarak hücreyi mutajenlerin, karsinogenlerin ve diğer yabancı zararlı (ksenobiyotik) kimyasal maddelerin toksik etkisinden korur. Ayrıca hücreyi endojen maddelerin oksidatif etkisine karşı da koruyan GST'ler hücrede organik molekül taşıyıcısı olarak da görev yapan enzimlerdir (66).

İncelenen bütün türlerde GST'lerin çok çeşitli izoenzimlerinin varolması, bu enzimlerin biyolojik fonksiyonlarının çok önem taşıdığını gösterir

GST'lerin farklı formlarının adlandırılması ilk kez 1969 yılında Boyland ve Ghassaeud tarafından yapılmış ve enzimler substrat özgüllüğüne göre yapılan bu adlandırmada beş gruba ayrılmışlardır (6).

-GSH-S-aritransferaz

-GSH-S-epoksittransferaz

-GSH-S-alkiltransferaz

-GSH-S-aralkiltransferaz

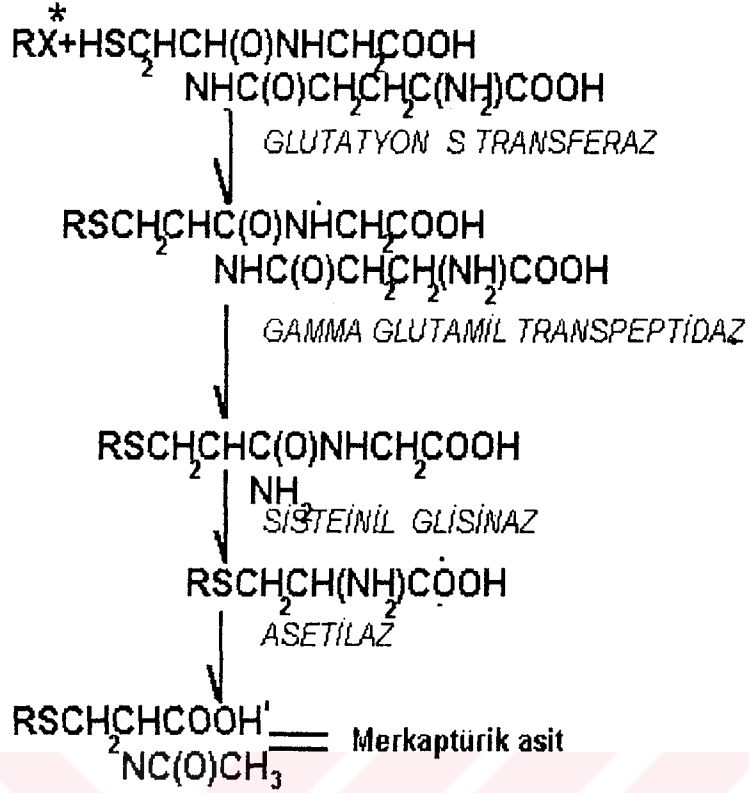
-GSH-S-alkenttransferaz

Bazı alken ve aren bileşiklerinin epoksitleri enzimatik olarak hidrate olurlar. Bu reaksiyonları kataliz eden enzimler; Glutasyon-epoksit-S-transferaz enzimleridir.

Birçok reaktif bileşiminin biyotransformasyonunda rol oynayan, ikinci dönem (Faz II) ile ilgili bir izoenzim topluluğudur. 25.000 molekül ağırlıklı iki subuniteden oluşan dimer yapısındaki GST izoenzimleri esas olarak hücrenin sitozol fraksiyonunda bulunurlar

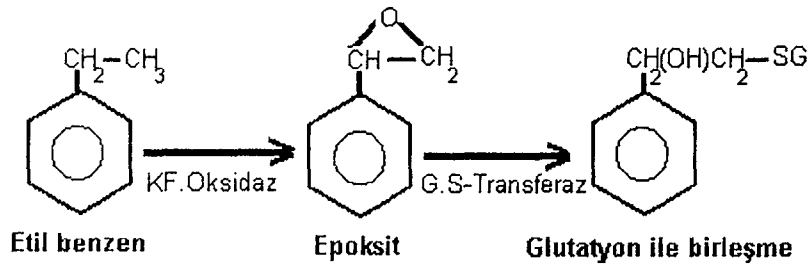
Bütün izoenzimler substrat olarak kullanılan diğer bütün elektrofil bileşiklere kıyasla 1 kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB) ile daha yüksek spesifik aktiviteye sahiptirler. Bu nedenle bu substrat ile yapılan ölçümlerin bütün transferaz izoenzimlerinin aktivitesini yansıttığı kabul edilmektedir (42, 48).

Organizmada elektrofil karbon atomu taşıyan yüzlerce bileşik GSH ile reaksiyona girerek kendisine karşılık gelen GSH tioeterini oluşturur. Bu konjugat daha sonra gamma-glutamil grubunu kaybederek transpeptidasyona uğrar, glisin uzaklaşır ve sistein kısmının azot grubu asetillenir (47,51). Oluşan merkapturik asit organizmadan dışarı atılır (Şekil-9).



* X ile gösterilen grup, Ksenobiyotiğin glutatyon ile reaksiyona giren aktif grubudur
Şekil- 9 Bir ksenobiyotiğin biyotransformasyon reaksiyonları ile atılması

Organizmaya giren çok sayıda farklı ksenobiyotiklerden bazıları non-enzimatik olarak yıkılırken bazılarında Biyotransformasyon'un Faz -I ile Faz-II reaksiyonları veya her ikisinin birlikte kullanımı ile etkisizleştirilirler (Şekil-10).



Şekil-10 Bir ksenobiyotiğin Faz-I ve Faz-II reaksiyonları ile etkisizleştirilmesi.

2.3.1.3 Eliminasyon

Eliminasyon olayı omurgasız canlılarda fazla incelenmediği için bu konuda verilen örneklerin çoğunluğu omurgalılara aittir.

2.4. İsektisitlerin Zararlı Etkileri

1940' lı yıllarda geliştirilen kalıcı etkili insektisitlerin, vektör ve zararlı böceklerle karşı geniş çapta kullanılması çeşitli problemleride beraberinde getirmiştir (70). Bunlar arasında böceklerde direnç oluşumu ve davranış değışiklikleri, çevre kirliliği canlı organizmalar üzerindeki toksik etkiler ve ekolojik dengenin bozulması sayılabilir. İsektisitlerin en önemli yan etkilerinden biri Arthropodlarda (eklembacaklılarda) bunlara karşı direnç gelişmesidir (4). Pek çok önemli hastalık vektörü bir veya birçok ilaca karşı direnç kazanabilmekte ve bu durum hızla yaygınlaşmaktadır. Yeni insektisitlerin kullanılmasına paralel olarak dirençli arthropod türlerinin sayısında belirgin bir artış tespit edilmektedir .

Dirençli vektörlere insektisitler etki göstermediği halde bunların doğal düşmanları olan diğer canlıları etkileyerek ortamı büsbütün vektörlerin lehine bozabilmektedir. Bunun sonucu vektörlerle bulaşan hastalıklarda yeniden artışlar olabilmekte ve kontrol güçleşmektedir.

2.5 Halk Sağlığı Bakımından Önemli Olan Böceklerde İsektisitlere Karşı Dirençlilik

Son 40 yıl içinde, sivrisineklerde dahil halk sağlığı bakımından önemli olan böceklerin kontrolü genel olarak kimyasal yöntemlerle yapılmaktadır (71, 72, 74). İsektisitlerin gereksiz şekilde bol ve artan oranlarda kullanılmaları geniş çapta insektisit direnci oluşmasına neden olmuştur. Halk sağlığı yönünden önemli olan Arthropodlar arasında dirençli olanların sayısı gün geçtikçe artmış ve artmaktadır 1946 yılında dirençli arthropod sayısı iki iken bu sayı 1968 de 102 ye, 1980 de 155'e ve 1982 lerde 168'e ve 1986 da 463'e yükselmiştir. Bu arada dirençli olan sivrisineklerin sayısında 1957 de yedi iken 1980 de 93'e yükselmiştir. Bazı türlerde, çoklu veya çapraz direncin ortaya çıkışı ise mevcut kimyasal yöntemlerle korunmayı engellemektedir (72).

2.6. İsektisitlere Karşı Direnç Gelişim Mekanizmaları

Bir insektisit veya insektisit grubuna hassas olan bir böcek populasyonunun bazı bireylerinin insektisitten etkilenmemesi durumunda **tolerans** veya **dirençlilik**'ten söz edilir. Yani daha önce tamamen öldürücü olan o insektisitin diagnostik dozunun (%99 ölüm veren doz) bazı bireyleri öldüremez hale gelmesidir.

Tolerans, doğrudan direnç genlerine bağılı olmaksızın bazı biyolojik ve çevre faktörleri nedeniyle de ortaya çıkabilir. Bu faktörler yüzünden, böcek tarafından insektisit alımı azaltılarak kısmi bir dirençlilik (tolerans) ortaya çıkar. Bu faktörler şunlardır; **a)** Mevsimsel değişikliklere bağılı olarak canlının kış aylarına girerken yağlanması veya aktivitesinin azalması yani diyapozaya girmesi veya yaz aylarında sıcaktan etkilenmemesi için estivasyona girmesi, **b)** Böceğin fizyolojik durumu, beslenmesi (aç veya kan emmiş olması) ve yaşı (yumurta geliştirip geliştirmemiş olması), **c)** Uygulanan insektisitle hedef canlının temas derecesi ve kutikül yapısı gibi. Tüm bu faktörler hedef organizmanın gen yapısında herhangi bir değişiklik olmadan bile insektisit alımını azaltabilir.

Tolerans bazen genetik temele dayalı olabilir; Rezistanslığın görüldüğü bir populasyonda homozigot dirençli olanlar tam dirençli olduğu halde heterozigotların bazıları canlı bazıları ölü olabilir. Yani heterozigotlar tolerans sınırları içinde yer alır. Direnç bir kez ortaya çıkınca aynı insektisit kullanılmaya devam edilirse dirençli bireylerin lehine seleksiyon olur (**negatif seleksiyon baskısı**) ve dirençli bireylerin sayısı populasyonda hızla artar.

Fizyolojik Direnç:

Tamamen genetik temele dayanan fizyolojik dirençlilikten, ancak farklı gruplardan insektisitlere karşı yapılan hassasiyet test sonuçlarında % 90 dan az ölüm olması durumunda söz edilir (13) Bu konuda yapılan çalışmalara göre dirençlilikte birden fazla genin etkili olduğu ve poligenik kalıtım gösterdiği saptanmıştır (55). Bunlar;

- I. İnsektisit alımının azaltılmasıyla meydana gelen dirençlilik
- II. Hedef Bölge Direnci
- III. Metabolik Direnç

I. İnsektisit Alımının Azaltılmasıyla Meydana Gelen Dirençlilik

Ev sineklerinde (*Musca domestica*) insektisit alımının azaltılması ile ilgili genlerin III. kromozomda lokalize olduğu saptanmıştır. Fakat bundan sorumlu genlerin, dirençte tek başına küçük miktarda etkili olduğu bulunmuştur. Son çalışmalar ise dirençliliğin kitin yapısında yer alan lipidlerin değişikliği ile ilgili olduğu yönündedir (55). Ayrıca, insektisit alımının azaltılması genlere bağlı olmadan da tolerans da belirtilen özel durumlarla da meydana gelebilmektedir.

II. Hedef Yapı Direnci

Hedef yapı direnci: İnsektisit metabolizmasında rol alan enzimin kendi yapısında meydana gelen ve kalıtsal olan değişikliklerle ortaya çıkmaktadır. Hedef yapı direncinin 3 türü bilinmektedir.

II.a Altered Asetilkolin Esteraz

Organofosfat ve karbamat direncinde hedef yapı olan Asetilkolin esteraz enzimini kodlayan genin *Musca domestica* ile yapılan çalışmalara göre II.ci kromozomda yer aldığı bulunmuştur.

Orta Amerika'da bulunan *Anopheles albimanus*ta karbamatlı ve organofosfatlı insektisitlere karşı gelişen dirençliliğin bu kimyasallardan daha az etkilenen bir Asetilkolinesteraz çeşidinin ortaya çıkması ve populasyonda seleksiyona uğramasından ileri geldiği bilinmektedir (14,29). Nitekim son zamanlarda, *An. atroparvus*, *An. nigerrimus*, *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus* gibi sivrisineklerde de bu mekanizmanın işlediği bulunmuştur (73). Ancak Asetilkolinesteraz'ın yapısındaki değişikliklerin niteliği henüz tam olarak bilinmemektedir.

Tüm anofeller Asetilkolinesteraz'ın membrana bağlı ve solubl olmak üzere iki tipini taşımaktadır. Dirençlilikte etkisi düşünülen Asetilkolinesteraz enzimi; solubl tipin dimerik veya tetramerik formlarından veya enzimin bir veya daha fazla formuna ait iki veya daha fazla polipeptid zincirinin birleşmesinden oluşabileceği düşünülmektedir.(73).

Enzimin değişik formunu (Altered AchE) genomunda taşıyan dirençli bireylerin substrat ile yapacağı bağı organofosfatlı ve karbamatlı bileşiklerin bozmadığı ve enzimin normal işlevini yürüterek bu kimyasallara dirençli hale geldiği düşünülmektedir.

II-b DDT ve Pyrethroid Direnci

DDT direncinde *Musca domestica'* da en azından dirençle ilgili 3 mutant genin rol oynadığını Plapp'ın araştırmalarından biliyoruz (55).

Birinci gen: 2 nci kromozomda yer almakta ve DDTaz aktivitesini kontrol etmekte

İkinci gen: 3 üncü kromozomda yer almakta ve sinir dokusunun DDT ve Pyretroidlere karşı etkisizleşmesinde fonksiyoneldir.(İnsektisit alımının azaltılmasında da bahsedildi)

Üçüncü gen: 5 inci kromozomda yer almakta ve DDT'nin DDE'ye dönüştürülmesinde ve diğer insektisitlerin degradasyonunda rol oynayan (**kdr**) knock-down rezistans genidir.

Bu bilgiler doğrultusunda DDT direncinin sadece birinci genin ekspresyonu olan DDTaz aktivitesiyle meydana gelmediği ancak yüksek DDTaz aktivitesinin direnç'e yol açabildiği düşünülmektedir.

DDT ye karşı gelişen dirençte kdr geninin etkili olduğu ve bunun pyreteroid grubundan insektisitlere karşı çapraz dirençlilik gösterdiği bilinmektedir.

Pyretroidler tarafından seçilen rezistant bireylerin, DDT ye karşı da dirençli olduğu ve her iki insektisite karşı meydana gelen direncin aynı gen tarafından kontrol edildiği bulunmuştur.(21).

Günümüzde kdr geninin işleyiş mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen kdr geni için bir allelomorfizmin sözkonusu olabileceği ve kdr genine sahip ırklarda DDT ve pyretroidlere karşı normal ırklara kıyasla daha az hedef bölge reseptörlerinin bulunduğu ve dolayısıyla daha az insektisit bağlanması nedeniyle insektisitten daha az etkilendiği düşünülmektedir.

II-c) Cyclodin Direnci

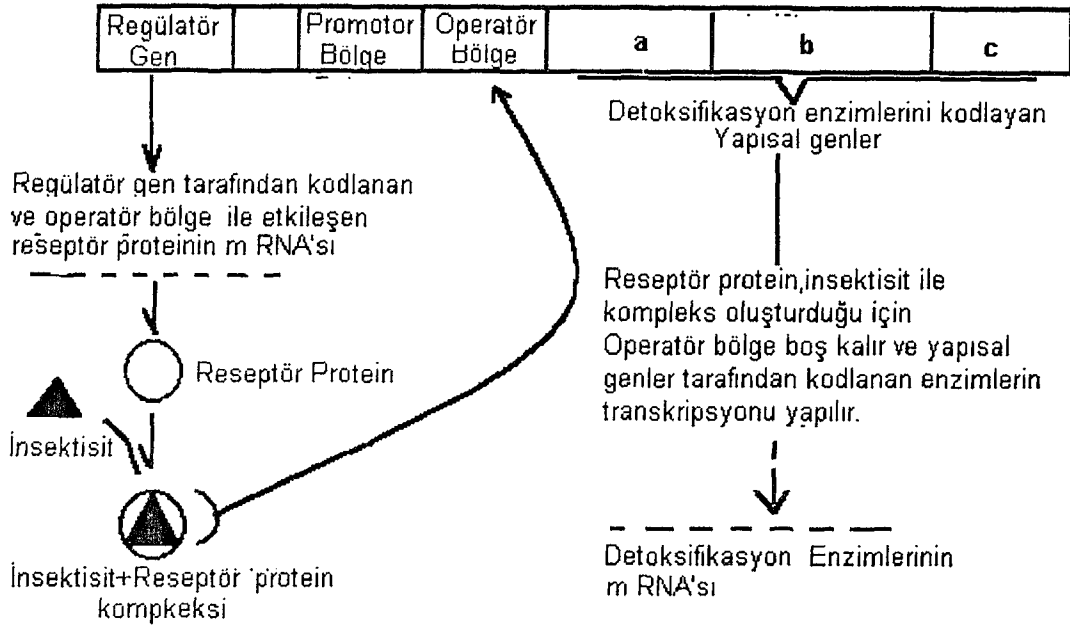
Cyclodin'e karşı dirençten sorumlu gen, *Musca domestica* nın IV. kromozomunda yer almaktadır. Kdr dirençliliğinde olduğu gibi cyclodine dirençlilerde de reseptör sayısında azalma söz konusudur. Reseptör sayısındaki azalma toksik maddenin hedef bölgeye ulaşmasını imkansız kılar.

III Metabolik Kapasite Değişiminden Kaynaklanan Dirençlilik

Metabolik dirençte:kullanılan insektisitın zararsız hale getirilmesinde (**detoksifikasyonunda**) bir veya daha fazla farklı gen tarafından kodlanan bazı enzimlerin rol oynadığı bilinmektedir (22).

Esteraz ve Glutasyon S. Transferaz enzimlerinin çeşitli insektisitlere karşı çeşitli türlerde direnç gelişiminde rolü olduğu ve özellikle sivrisineklerde metabolik dirençten sorumlu olduğu bilinmektedir (61, 62, 68).

Metabolik kapasiteye dayalı direncin genetik regülasyonu konusunda ileri sürülen hipoteze göre: metabolik dirençten sorumlu gen, reseptör proteinin sentezini sağlar. Reseptör proteinin, insektisiti tanıma ve bağlama özelliği vardır. Bu işlemden sonra, reseptör proteine bağlanan insektisitın hidrolizinden sorumlu Oksidaz(MFO) Esteraz ve Glutasyon S-Transferaz gibi enzimleri kodlayan yapısal genlerin transkripsyonu için gerekli uyarı yapılmış olur ve bu şekilde detoksifikasyonda rol alan enzimlerin sentezi ve insektisitlerin metabolik parçalanması gerçekleşir (Şekil-11)



Şekil-11 Detoksifikasyonda rol alan enzimlerin transkripsiyonuna ilişkin hipotetik model (Plapp'ın, 1984 yılındaki görüşlerinden yararlanılarak çizilmiştir (55).

Plapp'ın önerisine göre: insektisitler böcekler tarafından tanınmakta fakat bu tanıma ve tanımlama işlemi dirençlilerde daha iyi olmaktadır. Dirençlilikte etkili regülatör gen'in ürünü olan reseptör protein büyük olasılıkla böceğin yağ dokusunda ve orta bağırsağında konsantre olmaktadır. Reseptör proteinin fonksiyonu, insektisiti tanımak ve nukleusa taşımak için bağlamaktır. Nukleusta yapılan işlem ise ilgili insektisit'in detoksifikasyonundan sorumlu enzimlerin transkripsiyon işleminin başlatılmasıdır. *Musca* ve *Drosophila* ile yapılan genetik çalışmalar; bu süreçte bir veya birbirine yakın bağımlı bir gen ailesi tarafından reseptör proteinlerin kodlanması yapılmaktadır. İnsektisit reseptörlerinin memelilerdeki aromatik hidrokarbon reseptörlerine benzediği düşünülmektedir (55). Eğer bu hipotez doğru ise insektisitlerin hedef yapı proteinlerine bağlanmasını arttıran ve insektisit'in reseptör protein tarafından tanınmasını sağlayan, onunla başarılı bir şekilde yarışan kimyasal maddelerin araştırılması gerekmektedir.(73).

Genel olarak insektisitlerin metabolik parçalanmasıyla etkisizleştirilmesinde: **esterazlar, hidrolazlar, karışık görevli oksidazlar ve glutatyon'a bağlı transferazlar** rol oynar.

Çeşitli organoklorlu ve karbamatlı insektisitlere dirençte esteraz enzimlerinin artışının rol oynadığı bilinmektedir (3, 4). Esteraz adı altında farklı reaksiyonları kataliz eden enzimler bulunmaktadır. Öm. Malathion insektisindeki karboksilester bağlarını kıran karboksilesteraz ve α, β Naftil asetat'ı substrat olarak kullanan non-spesifik genel esteraz enzimi gibi.

2.7 Kimyasal İzomerizm ve Çapraz Direnç

Kimyasal yapı benzerliği olarak tanımlanan **izomerizm** özellikle pyretroid ve organofosfatlı bileşiklerde yaygın olup direncin spektrumunu etkiler. Örnek olarak izomerin etkisini Etilparanitrofenilbenzen fenilfosfanat ve profenofes serisinde görebiliriz. Bu insektisitlerin sahip olduğu fosfor atomuna, 4 farklı grubunun bağlı olmasından dolayı stereoizomeriktirler. Pyretroidlerde dirençliliğin hızı izomerizmle artar. Nitekim ülkemizde Pyretroid grubundan insektisitler çok yaygın olarak kullanılmamasına rağmen hassasiyet testlerinde bu gruba ait kimyasallara direnç saptanması da izomerizm ile açıklanmaktadır (16, 59, 73).

2.8 Davranış Direnci

Araştırmacılar tarafından, uzun süreli insektisit kullanımının hedef populasyonun davranışlarında onları avantajlı kılacak davranış değişikliklerine yol açabileceği ileri sürülmektedir. Bununla birlikte insektisit uygulamalarında eksiklik veya yetersizlik olduğu zaman çoğu kez davranış değişikliklerinin nasıl olduğu ve hangi davranış değişikliklerini kapsadığı pek net değildir. Genel olarak bir insektisit farklı sivrisinek türlerinde farklı davranışlara neden olabileceğini söyleyebiliriz. Ortaya çıkan davranış değişikliklerini **fenotipik** ve **genotipik** davranışlar şeklinde gruplandırmak mümkündür.

a- Fenotipik Davranış

Bu konudaki klasik örnek; DDT'nin neden olduğu irritan etki sonucu bazı böceklerin öldürü dozu almadan DDT ile temasını keserek canlı kalmayı başarmasıdır. Yani, yüzeylerle temas etmeden ilaçlı bölgeleri terk ederek dirençli hale gelirler..Bu durum, genelde sıtma kontrolü amacıyla, hassas, ergin anofel sivrisineklerine karşı evlerde yapılan DDT püskürtmesiyle ortaya çıkan bir davranıştır. Dirençli böcekler ise genellikle irrite olmazlar (73).

b-Genotipik Davranış

Ekzofili ve zoofili gibi beslenme amacıyla canlının genetik temeline dayanan ve insektisit bulaşı olan çevreden kaçması şeklinde ortaya çıkan davranışlardır. Buna benzer davranışlar, uzun süre insektisit baskısı altında kalmış bazı populasyonlarda doğal olarak ortaya çıkabilir.

3. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. ARAÇ VE GEREÇLER

Çalışmalarda kullandığımız araçlar, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında mevcut olup sadece kimyasal maddeler **Sigma** firmasından satın alınmıştır.

3.1.1 Araçlar

Denemelerde kullanılan araçlar, hassasiyet testlerinde kullanılan test tüpleri homojenizasyon işleminde kullanılan sonik homojenizatör (Virsonik 300), pH ölçümünde kullanılan EDTA marka PH metre, Enzim aktivitesinin saptanmasında kullanılan Shimadzu UV-160 spektrofotometre, Sartorius terazi, Siemens derin dondurucu, Vorteks, Scorex marka otomatik pipetler ve Ben-mari'den oluşmaktadır.

3.1.2 Kimyasal Maddeler:

Ayırıcıların hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler, Analitik kalitede olup, **Sigma** firmasından satın alınmıştır. Araştırmada kullanılan önemli kimyasal maddeler aşağıda verilmiştir.

α -Naftil asetat, β -Naftil asetat, Glutasyon, Asetiltiyokolinyodid, 1 kloro, 2-4 dinitrobenzen (CDNB), Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), Tris Baz, Trizma hidroklorid, Sodyum Dodesil Sulfat, Fast Blue B tuzu (Boya), Dithiobis (Dinitrobenzoik asit=DTNB), Potasyum dihidrojen fosfat, Disodyumhidrojen fosfat, protein tayin kiti, Triton-x-100, gliserol, phenythiourea ile Dünya Sağlık Örgütü'nden sağlanan DDT, Deltamethrin, Permethrin, Malathion ve Propoxur insektisitlerinin impregne test kağıtları.

3.1.3 Biyolojik Materyalin Toplanması ve Testlere Hazırlanması

Biyolojik materyal olarak deneylerimizde, Türkiye'de sıtmanın primer vektörü olan türü sivrisineklerin ergin dişileri kullanıldı Adana ilinde, ekilebilir arazilerinin çok fazla ve uygun olması nedeniyle tarımsal mücadele amacıyla çok yoğun insektisit kullanılan, Tabaklar (Karataş-ADANA), Herekli (Ceyhan-ADANA) köyleri ile coğrafik konumu itibariyle ekilebilir arazi oranı nispeten az ve insektisit kullanımı çok fazla olmayan Menekşe (Merkez-ADANA) köyü ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı İnsektaryumunda standart laboratuvar koşullarında ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ ve %60-80 nispi nem'de) 1983 yılından itibaren kolonizasyonu yapılan koloni örneklerinden alınmıştır.

Biyolojik materyaller, adı geçen bölgelerden (köyler ve laboratuvar kolonisi), 1)- yağlanmanın olmadığı gonoaktif dönemi kapsayan Mayıs-Eylül ayları arası ile 2)- mevsimsel değişimin etkisiyle yağlanmanın olduğu Ekim-Nisan ayları arası olmak üzere iki dönem için gerçekleştirildi (38). Gonoaktif ve yağlanma dönemlerinde toplanan sineklerin kan emmiş ve yumurtalı olanları, Glutatyon S. Transferaz ve Genel Esteraz enzimlerine ait aktivitenin spesifik aktivite olarak (Spesifik aktivite= Unite/mg protein) değerlendirilmesinden dolayı, enzim aktivitelerinin ölçümünde, yüksek protein değeri vererek hataya neden olabileceği için kullanılmadı. Sinek sayısının az olduğu dönemlerde ise, kan emmiş ve yumurtalı ergin dişiler, yumurtlamaya bırakılarak F1 döllerinde elde edildi, Asetilkolin esteraz enzim aktivitesi ise, Unite/ml (mikromol / dk/ ml) olarak değerlendirildi.

Farklı sezonlarda değişik lokalitelerden getirilen sivrisineklere; 1) Organofosfat ve karbamatlı insektisitlerin yaptıkları inhibisyon etkisinden dolayı hedef yapı olan AchE enziminin aktivitesinde, dirence bağlı olarak meydana gelen değişikliği gözlemek amacıyla, malathion %5 ve propoksur %1 insektisitlerinin letal dozlarına karşı hassasiyet testi, 2) organoklor (DDT) ve pyrethroid (Deltamethrin ve Permethrin) insektisitlerinin etkisizleştirilmesinde (dirence) çok büyük rolü olan *Glutatyon S-transferaz* enzim aktivitesinde dirence bağlı olarak ortaya çıkan değişimi gözlemek amacıyla da DDT%4, Permethrin %0.25 ve Deltamethrin %0.025 dozlarına

karşı hassasiyet testi ve 3) tüm insektisit gruplarının etkisizleştirilmesinde rolü olan non-spesifik Genel Esteraz enziminde dirence bağılı olarak meydana gelen değişimi gözlemek için de, DDT %4, Malathion %5, Propoksür %0,1, Deltamethrin %0,025 ve Permethrin %0,25 dozlarına karşı hassasiyet testleri uygulandı. Adı geçen insektisitlerin, letal dozlarına karşı elde edilen % mortalite değerleri hesaplandıktan sonra, ölenler (**hassas**), ölmeyenler (**dirençli**) olarak etiketlenerek dirençle ilişkisi olan **Asetilkolin Esteraz**, **Glutasyon S-transferaz** ile **Genel Esteraz** enzim aktivitelerinin saptanması amacıyla, içinde 0,2 mililitre homojenizasyon tamponu olan 1ml'lik ependorf tüplerin içinde derin dondurucuda saklandı (13, 27, 34).

3.1.4 Ayıraçların Hazırlanması:

A Homojenizasyon Tamponu

50 mM Tris

10 mM EDTA

%15 Gliserol

% 0.0005 Phenylthiourea

PH= 7.8 olacak şekilde ayarlandı.

B Asetilkolin esteraz ölçümünde kullanılan ayıraçlar

B1 Triton Tamponu

0.1 M, PH=7.8 Sodyum Fosfat Tamponu içinde %1 Triton X-100'ün hazırlanması amacıyla: Molekül ağırlıkları 136,09 olan KH_2PO_4 ile 174,18 olan K_2HPO_4 'tan kaç gramın kaç mililitrede hazırlanacağını bulmak için Handerson-Hasselbach denkleminde yararlanıldı . Denkleme göre;

$$\begin{aligned}
\text{PH} &= \text{PK} + \log\left(\frac{\text{Tuz}}{\text{Asit}}\right) \\
7,8 &= 7,21 + \log\left(\frac{\text{Tuz}}{\text{Asit}}\right) \\
7,8 - 7,21 &= \log\left(\frac{\text{Tuz}}{\text{Asit}}\right) \quad (x) \\
0,59 &= \log\left(\frac{x}{0,1-x}\right) \longrightarrow 3,89 = \frac{x}{0,1-x} \\
0,389 - 3,89x &= x \quad 0,389 = 4,89x \quad x = 0,08 \text{ M Tuz} \\
0,1 - 0,08 &= 0,02 \text{ Asit} \quad n = \text{M.V} \quad \frac{m}{\text{Mol Aç}} = \text{M.V} \\
\frac{m}{136,09} &= 0,02 \cdot 0,1 = \mathbf{0,272 \text{ gr KH}_2\text{PO}_4 \text{ Asit}} \\
\frac{m}{174,8} &= 0,08 \cdot 0,1 = \mathbf{0,386 \text{ gr K}_2\text{HPO}_4 \text{ Tuz}}
\end{aligned}$$

Handerson-Hasselbach denkleminde göre hesaplanan asit ve tuz miktarları 100 ml saf su içinde, % 1 triton X-100 olacak şekilde hazırlandıktan sonra PH'nın 7,8 olup olmadığı PH metrede kontrol edildi.

B2 DTNB Tamponu:

PH= 7,2 de fosfat tamponu hazırlamak için 100 ml de 1,1876 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml de 0,9078 gr $\text{K H}_2 \text{PO}_4$ olacak şekilde stok hazırlanır. Bu stoktan 10 ml ye tamamlanacak şekilde; KH_2PO_4 'ten 2.7 ml ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'ten ise 7.3 ml. alınır ve + 4°C'de ışık alamıyan koyu şişede buzdolabında saklandı.

B3 0.01 M DTNB

0.0396 gr DTNB, .10 ml. DTNB tamponunda çözüldükten sonra buzdolabında saklandı

B4 Asetiltiyokolin iyodid

Asetilkolin Esteraz enziminin substratı olan bu kimyasal 2.9 mg/ml olacak şekilde 0.02M, PH=7,4 fosfat tamponu içinde günlük olarak hazırlanır ve +4°C de buzdolabında saklandı.

B5 Asetiltiyokolin iyodid Tamponu

0.02 M ve PH=7.4 olması için 0.21 gr K_2HPO_4 ile 0.1088 gr KH_2PO_4 100 ml. saf su içinde hazırlandıktan sonra pH metrede okundu.

C- Glutasyon S. Transferaz aktivitesinin saptanmasında kullanılan Kimyasallar

C1 CDNB (1 kloro, 2.4 Dinitrobenzen) Tamponu

100 mM KH_2PO_4

%15 Gliserol

PH=6.8 olacak şekilde ayarlandı.

C2 CDNB

6 mg/ml Metanol içinde CDNB hazırlanır. Daha sonra 1:1 oranında CDNB tamponu ile dilue edilerek CDNB konsantrasyonu'nun 3 mg/ml olması sağlanır. Günlük olarak hazırlandı.

C3 Glutasyon

30 mg redükte glutasyon , 5 ml. PH=7.8, %15; gliserol olan fosfat tamponu içinde günlük olarak hazırlandı.

D Genel Esteraz aktivitesinin saptanmasında kullanılan kimyasallar

D1 α ve β Naftil asetat için fosfat tamponu'nun 0.02 M, pH=7.2 olması amacıyla

KH_2PO_4 = 0.138 gr. ile K_2HPO_4 =0.172 gr tartılır ve 100 ml distile su içinde karıştırılır. pH metrede okuma işlemi yapıldı.

D2 30 mM α -naftil asetat için

0.2793 gr. α -N.A(Naftil asetat) 50 ml asetonda stok olarak hazırlandı. Kullanılmadan önce 1:100 oranında, 0.02 M -pH=7,2 olan fosfat tamponu ile dilue edilerek, taze olarak hazırlandı.

D3 30 mM β Naftil asetat için

0.2793 gr β N.A. (Naftil asetat) 50 ml Asetonda stok olarak hazırlandı. Kullanılmadan önce 1:100 oranında 0.02 M pH= 7.2 olan fosfat tamponu ile dilue edilerek taze olarak hazırlandı.

D4 Boya Solüsyonu

0.3 gr. Fast Blue β tuzu

3.5 gr. Sodyum dodesil sulfat

100 ml. saf suda çözüldükten sonra ışık almıyacak bir şişede buzdolabında saklandı.

E Genel Esteraz Aktivitesinin saptanmasında kullanılan α ve β Naftol standart ürün eğrileri.

Genel Esteraz enzim aktivitesinin saptanması amacıyla, daha önce yapılan çalışmalarda dalga boyu olarak 450, 500,550 ve 570 nm dalga boyları önerildiği için kendi çalışmamızda hangi dalga boyunun, naftol ürünü için en iyi absorbans verdiğini bulmak amacıyla ;450,500,550,570 ve 630 nm dalga boylarında dalga boyu taraması yaptık (25, 30). 550nm 'nin çalışmamıza en uygun dalga boyu olduğunu saptadık (Tablo -1).

Tablo-1 α ve β naftol için yapılan dalga boyu taraması

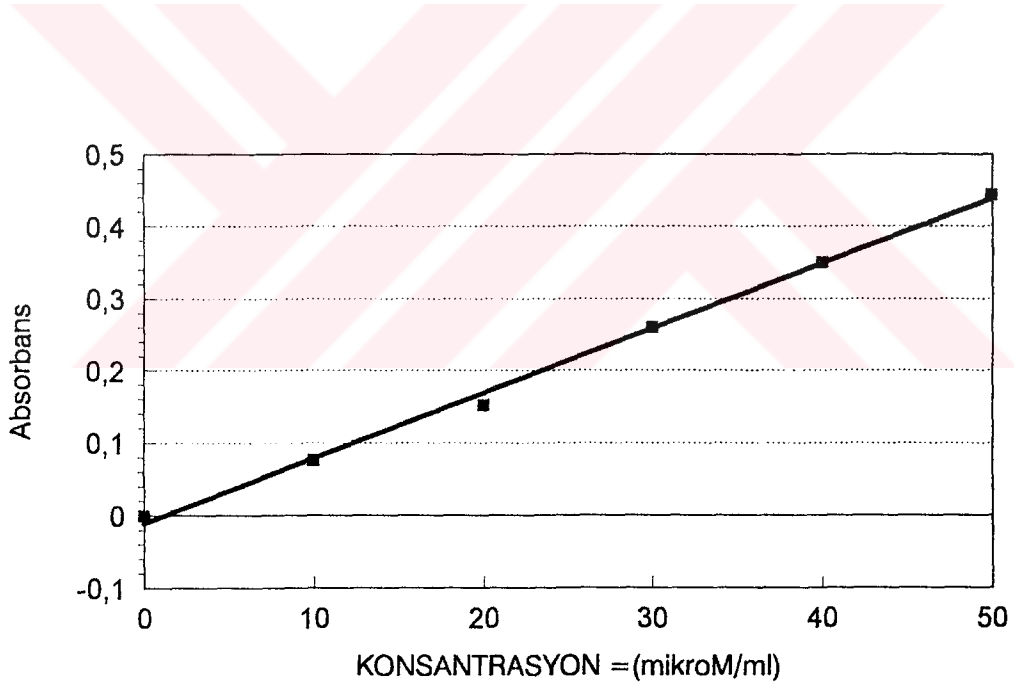
<u>Konst.</u>	<u>450 nm</u>	<u>500 nm</u>	<u>550 nm</u>	<u>570 nm</u>	<u>630 nm</u>	
10 mM	0.030	0.024	0.076	0.064	0.012	α Naftol
20 mM	0.016	0.065	0.152	0.132	0.033	"
30 mM	0.003	0.117	0.261	0.242	0.087	"
40 mM	0.010	0.152	0.350	0.328	0.123	"
50 mM	0.027	0.196	0.444	0.422	0.166	"
10 mM	0.019	0.061	0.066	0.055	0.026	β Naftol
20 mM	0.045	0.134	0.172	0.152	0.074	"
30 mM	0.081	0.214	0.293	0.268	0.134	"
40 mM	0.114	0.288	0.414	0.383	0.125	"
50 mM	0.145	0.355	0.519	0.486	0.250	"

E1 α Naftol Standart ürün eğrisinin elde edilmesi

0.01 M'lık stok α naftol solusyonundan 50 μ l alıp 50 μ l boya ilavesinden sonra su ile 1 ml ye tamamladık 0.5 mM olan bu stoktan 40, 80, 120, 160 ve 200 μ l aldık ve suyla 2 ml'ye tamamladıktan sonra bilinen α naftol konsantrasyonlarına karşı 550nm de elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek α naftol için standart ürün eğrisi elde edildi(Şekil -12).

Konsantrasyon Absorbans

0.5 mM. 0.04 ml= 2ml. x= 10 mikroM	0.076
0.5 mM. 0.08 ml= 2ml. x= 20 mikroM	0,152
0.5 mM. 0.12 ml= 2ml. x= 30 mikroM	0.261
0.5 mM. 0.16 ml= 2ml. x= 40 mikroM	0.350
0.5 mM. 0.20 ml= 2ml. x= 50 mikroM	0.444



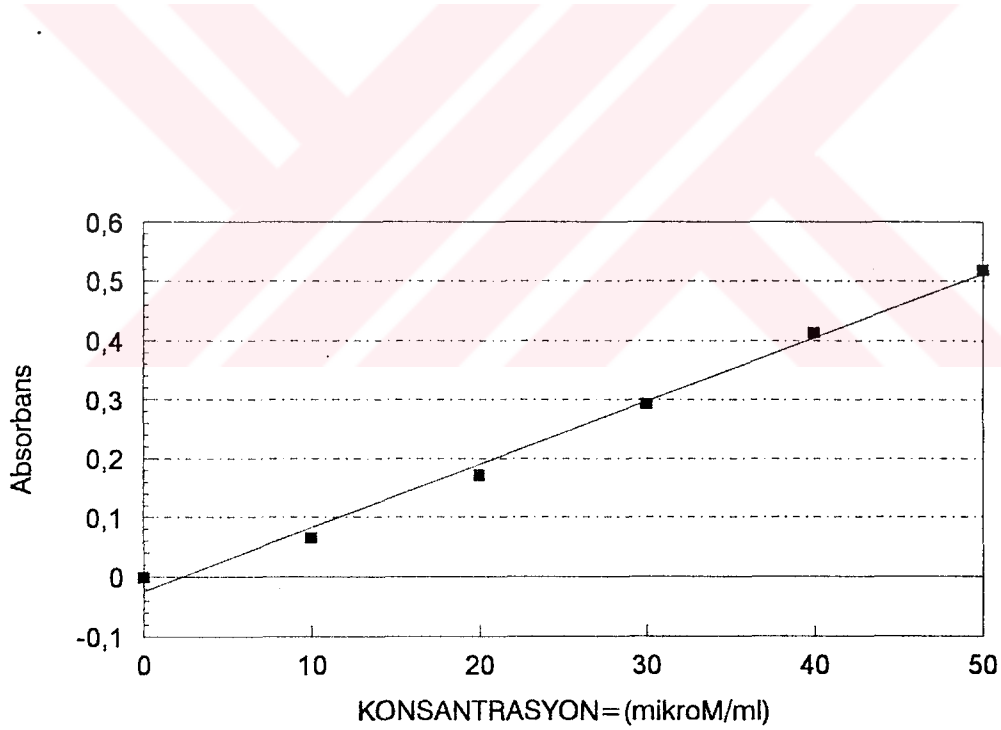
Şekil- 12 α Naftol standart ürün eğrisi

E2 β Naftol Standart ürün eğrisinin elde edilmesi

0.01 M'lik stok β Naftol solusyonundan 50 μ l alıp üzerine 50 μ l boya solusyonu ilave ettikten sonra suyla 1 ml'ye tamamlandı. 0.05 mM' olan bu stoktan alınan 40, 80, 120, 160 ve 200 μ l suyla 2 ml'ye tamamlandıktan sonra 550 nm de okuma işlemi yapıldı

<u>Konsantrasyon</u>	<u>Absorbans</u>
0.5 mM. 0.04=2 ml. x= 10 mikroM	0.066
0.5 mM. 0.08=2 ml. x= 20 mikroM	0.172
0.5 mM. 0.12=2 ml. x= 30 mikroM	0.293
0,5 mM 0,12 =2 ml x= 40 mikroM	0,414
0.5 mM. 0.20=1 ml. x= 50 mikroM	0.519

550 nm de yapılan okumadan sonra bilinen konsantrasyonlara karşı elde edilen optik dansite değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle β naftol için Standart ürün eğrisi elde edildi (Şekil-13).



Şekil.13 β - Naftol standart ürün eğrisi

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1 Hassasiyet Testleri

Hassasiyet testleri, WHO tarafından standardize edilen, insektisit emdirilmiş(empregne) test kağıtları yöntemi ile yapıldı (13, 68). Bu test tüpleri birbirine bağlanabilen iki mika tüp ile aradaki bir perdeden oluşur. Bu mika perde içindeki levhanın sağa sola hareketiyle iki tüp birbirine açılabilir, böylece sinekler bir tüpten diğerine aktarılabilir. Karşılıklı gelen iki tüpten birinin içine insektisit emdirilmiş (uygulama tübü) diğerine de insektisit emdirilmemiş beyaz kağıtlar (dinlenme tübü) yerleştirilir. Her bir test için uygulama tübüne konulan 10 sinek 1 saat süre ile bırakıldıktan sonra dinlenme tübüne aktarıldı ve şekerli su ile beslendiler. 24 saat sonra ölenler sayılarak % ölüm oranı saptandı. Her deneme için, sözkonusu insektisit çözündüğü solvent maddeden oluşan kağıtlar yerleştirildi (69) Kontrollerde, %20 ye kadar ölüm varsa **Abbott** formülü ile düzeltme hesabı yapıldı. Test işlemleri; 24+-2 °C ve %78 nispi nemi olan bir ortamda yapıldı.

Abbott formülü: $(\% \text{ Deney ölümü} - \% \text{ Kontrol ölümü} / 100 - \% \text{ Kontrol ölümü}) \times 100$

Bu test tüplerinde kullanılan 15x12 cm boyutlarındaki impregne test kağıtları 1m²'ye karşılık gelecek letal doza göre hesaplanmış olup letal dozu verecek solüsyonun Whatman kağıtlarına homojen olarak emdirilmesi ile hazırlanmaktadır. Bu işlem güç olduğundan çoğu insektisitlere ait test kağıtları, Dünya Sağlık Örgütü'nün Vektör kontrol birimince hazırlanıp ilgili ülkelere satılmaktadır.

3.2.2 Örneklerin Hazırlanması

Homojenizasyon İşlemi

Hassasiyet testlerinde değişik gruplardan insektisitlerin letal dozlarına maruz kalmış hassas veya dirençli olarak gruplandırılmış sinekler tek tek homojenize edildi. Bunun için her sinek üzerine 200 µl (=0.2 ml) homojenizasyon tamponu ilave edildi ve derin dondurucuda sıvının donması için bir süre bekletildi. Bu dondurma işlemi, homojenizasyon işlemi esnasında açığa çıkan ısının enzim denatürasyonunu ve inaktivasyonunu önlemek için yapıldı. Homojenizasyon işleminde, sonik homojenizatör ile numuneler, 1 dk. süreyle enzim inaktivasyonunun önlenmesi için buzlu ortamda homojenize edildi. Sivrisineklerin zor parçalanan kitin yapısının uzaklaştırılması için 1 dk. süreyle 1000 g de santrifüj edildi. Bu işlemden sonra, G.S-Transferaz ve Genel Esteraz enzim aktivite tayinleri için homojenat 12.000 g de 5 dk. süreyle tekrar santrifüj edildi. Örneklerle ait enzimlerin aktivite tayinleri spektrofotometrik olarak yapıldığından kimyasal madde sarfını azaltmak amacıyla normal 3 ml'lik küvetler yerine 0,4 ml'lik kuartz küvetler kullanıldı . Bu işlem normal küvetlere nazaran ışık yolunu 1/10 oranında kısalttığı için 0,4 lük küvetlerde elde edilen absorbans değeri 10 ile çarpılarak düzeltme yapıldı.

3.2.3. Asetilkolin Esteraz Tayini

Örneklerin Asetilkolin esteraz tayini Ellman yöntemine göre spektrofotometrik olarak yapıldı (18). Bu işlemler için sırasıyla;

- 1- Kör tüpü hariç tüm örnek tüplerine 30 µl homojenat konuldu.
- 2- DTNB Tamponu içinde hazırlanmış 0.01 M DTNB ayırıcından 30 µl hem örnek hem de kör tüplerine konuldu.
- 3- 0.1 M, PH=7.8 Sodyum Fosfat Tamponu içinde hazırlanmış %1 lik Triton x100 Tamponundan 140 µl hem örnek hem kör tüplerine ilave edildi.
- 4- 2,9 mg/ml olacak şekilde 0.02M PH=7.4 fosfat tamponu içinde hazırlanmış Asetiltiyokolin iyodid substrat solusyonundan 30 µl sadece örnek tüpüne konuldu.
- 5- Bu işlemden sonra örnek ve kör tüpleri oda ısısında 5 dk. inkübasyona bırakıldı.
- 6- Sürenin bitiminde örnekler 405 nm dalga boyunda kör tüpüne karşı okundu.

AchE Aktivitesi;

AchE aktivitesi Ünite olarak değerlendirildi. Uluslararası Enzim Komitesine göre 1 enzim ünitesi; 1 dakika içinde 1 mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarı olarak kabul edilmiştir. Buna göre

$$U/ml = (X \times \text{Absorbans (bilinmiyen)}) / (y \times e \times z)$$

x= 0.22 ml= Total Reaksiyon hacmi

Absorbans= Köre karşı okunmuş reaksiyon absorbansı

y= 0.03 ml= Dilusyonsuz örnek hacmi

e=13,6= 1 cm'lik küvetteki 5 thio 2 nitrobenzoatın milimolar absorbtivitesi'dir. e.katsayısı mM olarak verildiği için bunun mikromol'e çevrilmesi amacıyla 1000 ile çarpıldı.

z= 5 dk= Inkübasyon süresi

$U/ml = (0.22 \times \text{Absorbans}) / (0,03 \times 13,6 \times 5 \times 1000)$ Bu işlemin sonucunda 107,84 sabit katsayısı elde edildi Örneklere ait absorbans direkt bu katsayı ile çarpılarak enzim unitesine çevrildi $U/ml = 107.84 \times \text{Absorbans}^*$

Ünite= U/ml= mikromol/dk/ml olarak değerlendirildi.

3.2.4 Glutasyon S. Transferaz Tayini

Örneklerin, Glutasyon S.Transferaz aktivitesi Hemingway yöntemine göre tayin edildi (30).

1-Örnek ve kör tüplerine 30 µl homojenat konulur

2-Örnek ve kör tüplerine 100 er µl CDNB Substrat tamponu ilave edilir.

3-Örnek ve kör tüplerine PH= 7,8, %15 Gliserol olan fosfat tamponu içinde hazırlanmış Glutasyon çözeltisinden 40 µl konulur ve 30 C su banyosunda 5 dk. inkübasyona bırakıldı

4- 3 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış CDNB substrat solüsyonundan 40 µl sadece örnek tüpüne ilave edilir ve 340 nm dalga boyunda 5 dk içindeki Absorbans değişimi kaydedildi.

GST Tepkimesi:

Tamponda ve oda sıcaklığında GSH ile dengelenmiş enzim üzerine CDNB substrat ilavesi ile başlatıldı.

GST Enzim Ünitesi

Oda sıcaklığında ve PH= 6.8 de dakikada 1 mikromol konjugasyon yapan enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlandı. Buna göre;

$$\text{Unite} = (X \times \text{Absorbans} \times 1/5) / (y \times e \times 1000)$$

X= Total reaksiyon hacmi=0,2 ml

Absorbans=spektrofotometrede elde edile optik dansite

1/5= 5 dakika içindeki absorbans değişimi

y=dilusyonsuz örnek hacmi = 0,03ml

e= sabite= 9,5 mM/cm

1000= mM olarak verilen sabitenin mikromol'e dönüştürülmesi için yapılan dönüştürme katsayısı

$$\text{Unite} = (0,2 \times 1/5 \text{ Absorbans}) / (0,03 \times 9,5 \times 1000)$$

Bu işlemlerin sonucunda 147,36 sabit katsayısı elde edildi ve örneklere ait absorbans bu katsayı ile çarpılarak G.S-T enzim ünitesi elde edildi.

$$U=147,36x \text{ Absorbans}$$

Bu enzimin aktivitesi spesifik aktivite olarak değerlendirildiğinden, enzim ünitesi, örneklere ait solubl protein değerine (çalışmamızda mikrogram= μg olarak tayin edildi) bölündü. Buna göre;

$$\text{Spesifik Ak} = (\text{Unite} / \mu\text{g protein})$$

ve aktivite; *Unite / $\mu\text{g Protein} / \text{dk}$* cinsinden değerlendirildi.

3.2.5 Genel Esteraz Tayini

Örneklerin Genel Esteraz aktivitesi Van Asperen yöntemine göre spektrofotometrik olarak tayin edildi (77). Bunun için sırasıyla şu işlemler yapıldı;

1 -Örnek ve kör tüplerine 20 μl homojenat konuldu

2 -30 mM olarak hazırlanan α ve β Naftil asetat substratları 1:100 oranında dilue edildikten sonra bundan alınan 200 μl sadece örnek tüpüne konuldu ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

3- Sürenin bitiminde boya solusyonundan 50 μl örnek ve kör tüplerine ilave edilip 550 nm dalga boyunda okuma işlemi yapıldı.

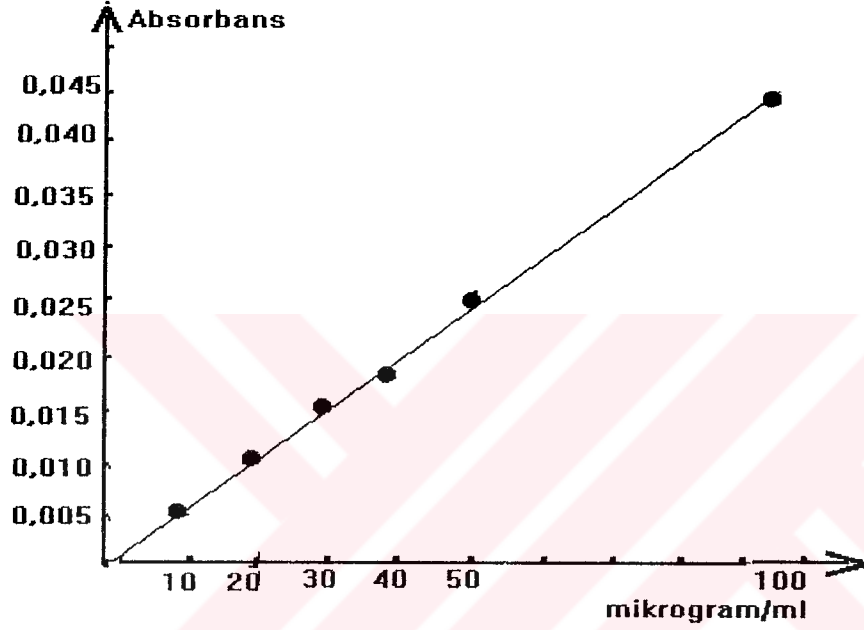
Aynı işlemler α Naftilasetat'ın substrat olarak kullanıldığı α Esteraz aktivitesinde ve β Naftil asetat'ın substrat olarak kullanıldığı β Esteraz aktivitesinde tekrarlandı elde edilen optik dansite değerleri daha önce hazırlanmış α ve β Naftol standart ürün eğrilerinden değerlendirildi.

Aktivite= mikromol ürün / $\mu\text{g Protein} / \text{dk}$ cinsinden hesaplandı.

3.2.6 Protein Standart Eğrisinin Elde Edilmesi

Protein tayininde, Sigma firmasından sağlanan protein tayin kiti çalışmaya uyarlanmış olup Lowry yöntemine göre çalışıldı (45). Bunun için; Bovine Serum Albumin (BSA) stoğundan, mililitrede 25,50,75,100,125 ve 250 μg olacak şekilde sadece örnek tüplerine aktarıldı.

- 1-Örnek ve kör tüplerine sırasıyla 100'er μ l lowry solusyonu konulup tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 20 dakika bekletildi.
- 2--Örnek ve kör tüplerine sırasıyla; 50'şer μ l Folin Ciocalteu fenol ayıracı konulup iyice karıştırıldıktan sonra renk reaksiyonu için 30 dakika bekletildi.
- 3-Örnek ve kör tüpleri 1 mililitreye tamamlanacak şekilde su ile dilue edildi.
- 4-Okuma işlemi 750 nm dalga boyunda yapıldı.
- 5-Konsantrasyonları bilinen örnek tüplerinin absorbans değerleri grafiğe geçirilerek standart protein eğrisi elde edildi (Şekil-14)



Şekil -14 Protein standart eğrisi

Örneklerin Protein Tayini:

Örneklerle ait protein değerlerinin tayini için her örneğe ait homojenattan 20 μ l alındı ve sırası ile protein standart eğrisinin elde edilmesinde yapılan işlemler tekrarlandı. Bu işlemlerden sonra örneklerle ait absorbans değerleri standart protein eğrisinden değerlendirildi

3.2.7. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Deneylerde kullanılan tüm faktörler ve gruplara göre Asetilkolin Esteraz, Glutasyon S-Transferaz ve Genel Esteraz enzimlerinin aktiviteleri saptandıktan sonra istatistiksel analiz için kodlandırıldı (Tablo-II). Bu grupların; aritmetik ortalama (X), standart sapma (SD), standart hata (SE) ve güven aralığı (GA) gibi tanımlayıcı istatistikleri, faktörler arası etkileşimin önem kontrolü ve faktörlerin alt grupları arasındaki ilişki veya farklılığın önemlilik derecesini tespit etmek amacıyla SPSS. for Windows 6.0 paket programının parametrik testleri kullanıldı.

Hassasiyet faktörü içinde, hassasiyet test sonuçlarına göre " hassas" ve "dirençli" olarak ayrılan alt grupların, değişik enzim aktivitelerine göre bu alt gruplar üzerine etkili olabileceği düşünülen diğer faktörlerin (insektisit, lokalite ve sezon) birbirleriyle olan etkileşimleri önce çok-yönlü varyans analizi ile topluca değerlendirildi. Bu analizden sonra, arasında herhangi bir fark veya etkileşim olan faktörler alt gruplarıyla birlikte tek tek ele alınarak tek-yönlü varyans analizi ile incelendi. Tek-yönlü varyans analizine göre incelenen faktörlerin alt grupları arasında önemli bir ilişki varsa daha ayrıntılı incelemeye geçildi. Bu kapsamda, eğer alt grup sayısı iki ise t-testi (Student), ikiden fazla ise çoklu karşılaştırma t-testleri (multiple comparison test=Post hoc) kullanıldı. Post hoc için, test gücüne göre sırasıyla; LSD, Bonferroni (modifiye LSD) ve Sheffe testleri kullanılmıştır (60).

Ayrıca hassasiyet test sonuçlarına göre hassas ve dirençli olarak yaptığımız gruplandırmanın, enzim aktivite değerleri ile uyumlu olup olmadığının anlaşılması amacıyla da aynı programda bulunan Diskriminant analizi kullanıldı.

Tablo II Enzim aktivitelerinin analizi için aktiviteyi etkileyen faktörlerin ve alt gruplarının "SPSS for Windows" istatistik programına uygun olarak kodlanması

FAKTÖRLER		<i>Asetilkolin Esteraz</i>	<i>Glutasyon S-Transferaz</i>	<i>Genel Esteraz</i>
HASSASİYET	A	1=Dirençli 2=Hassas	1=Dirençli 2=Hassas	1=Dirençli 2=Hassas
İNSEKTİSİT	L	1=Malathion	1=DDT	1=Organoklor
	T	2=Propoksür	2=Deltamethrin 3=Permethrin	2=Organofosfat 3=Karbamat
	G			4=Pyrethroid
LOKALİTE	R	1=Tabaklar	1=Tabaklar	
	U	2=Herekli	2=Herekli	1=Arazi
	P	3=Menekşe	3=Menekşe	2=Koloni
	L	4=Koloni	4=Koloni	
SEZON	A	1=Yağlanmış	1=Yağlanmış	1=Yağlanmış
	R	2=Gono Aktif	2=Gono Aktif	2=Gono Aktif
NAFTOL				1= α -Naftol
				2= β -Naftol

4 BULGULAR

4.1. Hassasiyet test sonuçları

Adana'nın, insektisit uygulamalarının farklı olduğu 3 lokalitesinden (Tabaklar, Herekli ve Menekşe köyleri) getirilen ve DDT, Malathion, Deltamethrin, Permethrin ile Propoksür insektisitlerine karşı gelişen direnci saptamak için ; gonoaktif ve yağlanmış sezonu kapsayan tarihlerde, yaklaşık 2000 adet araziden örneklenmiş veya laboratuvarında elde edilmiş F1 dölü kan emmemiş *An. sacharovi ergini* kullanılmıştır. Ayrıca gonoaktif periyoda ait yeterli sayıda koloni örneği, kontrol amacıyla kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo-III'de özetlenmiştir.

Malathion insektisitine karşı, yağlanmış ve gonoaktif sezonlarda, tüm lokalitelerden getirdiğimiz *An. sacharovi* türü sivrisineklerle yaptığımız hassasiyet testlerinin tümünde %100 ölüm oranı elde edilmiş olup bu insektisite karşı dirençli birey bulunmamıştır (Tablo III).

Yağlanmış sezonda Tabaklar bölgesinden getirilen *An. sacharovi'* lerde yapılan hassasiyet testlerinde DDT için %10, Propoksür %15, Deltamethrin %56 ve permethrin insektisiti için %28 ortalama ölüm oranı elde edildi. Aynı sezonda, Herekli bölgesi için elde edilen ortalama % ölüm oranları ise; DDT %10, Propoksür %21, Deltamethrin %58 ve Permethrin için %28'dir. Menekşe bölgesinde aynı sezon için DDT %10, Propoksür %52, Deltamethrin %77 ve Permethrin için %67 ortalama ölüm oranları elde edildi. Koloni örnekleri standart laboratuvar koşullarında devamlı gonoaktif olduğu için bunların yağlanmış dönemi bulunmamaktadır (Tablo-III).

Gonoaktif sezonda, Tabaklar bölgesinde elde edilen ortalama % ölüm oranları; DDT %10, Propoksür %35, Deltamethrin %49 ve Permethrin için %21'dir. Herekli'de ise, DDT için %7, Propoksür %31, Deltamethrin %53 ve Permethrin içinse %18 ortalama % ölüm oranları elde edildi. Aynı sezona ait Menekşe'de elde edilen ortalama % ölüm oranları ise; DDT %5, Propoksür %38, Deltamethrin %58 ve Permethrin için %25'tir.

Gonoaktif sezonda kontrol olarak kullanılan koloni örnekleriyle yapılan hassasiyet testlerinde ise DDT için %26; Propoksür için %71., Deltamethrin için %83 ve Permethrin için %75 ortalama % ölüm oranları elde edildi (Tablo- III).

Tablo-III Değişik insektisitlere karşı, farklı sezonlarda farklı lokalitelerden getirilen *An.sacharovi* erginleri ile yapılan hassasiyet testleri sonucu elde edilen ortalama % ölüm oranları (Her replikasyonda test tübüne 10 sinek yerleştirildi)

SEZON	LOKALİTE	INSEKTİSİT	Replikasyon (Tekrar) sayısı	Sinek sayısı	Ortalama % ölüm oranı
Y A Ğ L A N M I Ş	Tabaklar	DDT	2	20	10
		Malathion	10	100	100
		Propoksür	6	60	15
		Deltamethrin	5	50	56
		Permethrin	6	60	28
	Herekli	DDT	2	20	10
		Malathion	6	60	100
		Propoksür	6	60	21
		Deltamethrin	6	60	58
		Permethrin	6	60	28
	Menekşe	DDT	2	20	10
		Malathion	4	40	100
		Propoksür	4	40	52
		Deltamethrin	4	40	77
		Permethrin	4	40	67
G O N O A K T İ F	Tabaklar	DDT	6	60	10
		Malathion	7	70	100
		Propoksür	6	60	35
		Deltamethrin	6	60	49
		Permethrin	6	60	21
	Herekli	DDT	6	60	7
		Malathion	6	60	100
		Propoksür	6	60	31
		Deltamethrin	6	60	53
		Permethrin	6	60	18
	Menekşe	DDT	3	30	5
		Malathion	2	20	100
		Propoksür	2	20	38
		Deltamethrin	2	20	58
		Permethrin	2	20	25
	Koloni	DDT	7	70	26
		Malathion	12	120	100
		Propoksür	12	120	71
		Deltamethrin	12	120	83
		Permethrin	12	120	75
Total			200	2000	

Hassasiyet testlerinde elde edilen % ölüm oranlarına göre yapılan istatistik (Çok-yönlü ve Tek- yönlü varyans analizi) sonuçları Tablo-IV ve V de özetlenmiştir.

Malathion için yapılan hassasiyet testlerinin tümünde % 100 ölüm oranı elde edildiği için yapılan istatistiklere bu insektisit dahil edilmemiştir.

Tablo-IV Hassasiyet testlerine etki eden tüm faktörlerin çok-yönlü varyans analiz sonuçları

Faktör Etkileşimleri	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	F Önemliliği
İnsektisit	10935	3	3645	97	0,0001
Lokalite	11047	3	3683	98	0,0001
Sezon	2128	1	2127	56	0,0001
İnsektisit-Lokalite	2797	9	311	8	0,0001
İnsektisit-Sezon	954	3	318	8	0,0001
Lokalite-Sezon	1543	2	772	20	0,0001
İnsektisit-Lokalite-Sezon	537	6	89	2	0,033
Model	95922	27	3553	94	0,0001
Total	100636	152	662		

$R^2=0,953$

Çok-yönlü varyans analiz tablosuna göre, hassasiyet testlerine etki eden tüm faktörlerden; İnsektisit, lokalite ve sezon'un kendi alt grupları arasındaki farkları ile tüm 2'li etkileşimlerin çok önemli ($p=0,0001$) ve 3'lü etkileşimin ise önemli ($p=0,033$) olduğu bulundu (Tablo-IV).

Tablo-V Hassasiyet test sonuçlarına etki eden tüm faktörlerin Tek-yönlü varyans analiz sonuçları

FAKTÖRLER	GRUPLAR	N	X	SD	SE	F oranı	F olasılığı
İNSEKTİSİT	DDT	28	12,8	9,0	1,7	39,7	0,0001
	Propoxur	43	42,0	21,7	3,3		
	Deltamethrin	40	64,8	14,8	2,3		
	Permethrin	42	42,6	24,9	3,8		
LOKALİTE	Tabaklar	43	29,0	16,3	2,5	37,7	0,0001
	Herekli	44	29,7	17,8	2,7		
	Menekşe	23	46,0	26,2	5,4		
	Koloni	43	68,1	20,2	3,0		
SEZON	Yağlanmış	53	38,1	22,2	3,0	2,7	0,1
	Gonoaktif	100	45,3	27,2	2,7		

Hassasiyet testlerine etki eden tüm faktörlerin ayrı ayrı değerlendirildiği tek-yönlü varyans analizinde, faktörlerin kendi içinde yer alan alt grupları arasındaki farkın sezon ($p=0,1$) dışında lokalite ve insektisit için önemli ($p=0,0001$) olduğu bulundu (Tablo-V).

Yağlanmış sezonda, hassasiyet test sonuçlarına göre tüm insektisitler için Sheffe testine (0,05 anlamlılık düzeyinde) göre yapılan çoklu karşılaştırmalarda, DDT insektisiti için , Tabaklar, Herekli ve Menekşe lokaliteleri arasındaki farkın önemli olmadığı bulundu. Propoksur, Deltamethrin ve Permethrin insektisitleri için ; Tabaklar ve Herekli lokaliteleri arasında fark olmadığı, Menekşenin ise önemli derecede bu iki lokaliteden farklı olduğu bulundu.

Gonoaktif sezon için yapılan çoklu karşılaştırmalarda (0,05 anlamlılık düzeyinde) ise ; DDT, Propoksur, Deltamethrin ve Permethrin insektisitleri için, koloniye ait hassasiyet test sonuçlarının diğer 3 lokaliteden (Tabaklar, Herekli ve Menekşe) çok önemli derecede farklılık gösterdiği bulundu.

4.2- Asetilkolin Esteraz

Gonoaktif ve yağlanmış sezonlara ait 3 farklı lokaliteden ve koloni örneklerinden alınan toplam 564 dişi sivrisinekte, Asetilkolin Esteraz enzim aktivitesi (Unite=mikromol /dk /ml olarak) saptandı.

Organofosfatlı ve karbamatlı insektisitlere karşı gelişen dirence bağlı olarak ortaya çıkan AchE enzim aktivite seviyelerindeki değişimler malathion (organofosfat) ve propoksur'a (karbamatlı) dirençli ve hassas olan değişik lokalite ve sezonlara ait örneklerde ölçülerek Tablo-VI de özetlenmiştir.

Tablo-VI Ach Esteraz aktivitesi saptanan örneklerin gruplandırılmasında etkili olan tüm faktörlerin tanımlayıcı istatistik değerleri..

SEZON	İNSEKTİSİT		TABAKLAR			HEREKLİ			MENEKŞE			KOLONİ		
			N	X	SD	N	X	SD	N	X	SD	N	X	SD
YAĞLANMIŞ	Malathion	r	25	15,4	2,34	25	15,6	2,22	25	13,4	2,19			
		R	21	18,9	2,60	23	19,6	2,86	16	18,0	2,26			
	Propoksur	r	26	14,1	2,62	20	14,0	1,63	20	13,9	2,16			
GONO AKTİF	Malathion	r	26	15,3	2,85	15	15,7	2,12	24	14,7	2,46	47	13,8	2,06
		R	28	19,4	2,73	41	19,6	3,43	25	18,9	2,67	48	16,0	1,98
	Propoksur	r	25	15,6	2,22	23	16,3	1,38	20	15,1	2,31	40	13,7	2,09

R= dirençli , r=hassas., (malathionun dirençli grubu bulunmadığı için buna ait değerler yoktur).

Ortalama AchE aktiviteleri bakımından faktörlerin alt grupları arasında, yani hassas ve dirençliler,(hassasiyet) insektisitler(malathion ve propoksur), sivrisineklerin örneklendiği lokaliteler ile farklı sezonlar (gonoaktif ve yağlanmış) arasında farkların ve etkileşimin olup olmadığı çok-yönlü varyans analizi ile incelenmiş olup sonuçlar Tablo -VII de özetlenmiştir.

Tablo-VII AchE enzim aktivitesine etki eden tüm faktörlerin çok-yönlü varyans analiz sonuçları

Faktör Etkileşimleri	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	F Önemliliği
Hassasiyet	255,7	1	255,7	4 2,5	0,0001
İnsektisit	7,3	1	7,3	1,2	0,272
Lokalite	171,2	3	57,1	9,5	0,0001
Sezon	27,7	1	27,7	4,6	0,032
Hassasiyet-İnsektisit *	0,0	0		,	,
Hassasiyet-Lokalite	18,9	3	6,3	1,1	0,370
Hassasiyet-Sezon	0,4	1	0,4	0,1	0,799
İnsektisit-Lokalite	22,0	3	7,3	1,2	0,301
İnsektisit-Sezon	0,01	1	0,01	0,00	0,963
Lokalite-Sezon	24,7	2	12,4	2,1	0,129
Hassasiyet-İnsektisit-Lokalite *	0,000	0			
Hassasiyet-İnsektisit-Sezon *	0,000	0			
Hassasiyet-Lokalite-Sezon	12,10	2	6,1	1,0	0,366
İnsektisit-Lokalite-Sezon	24,3	2	12,2	2,0	0,133
Hassasiyet-İnsektisit-Lokalite-Sezon *	0,00	0			
Model	2582,5	20	1290,1	21,5	0,0001
Total	5840,9	562	10,4		

* Malathion insektisitinin dirençli grubu bulunmadığı için, Hassas-İnsektisit içeren kombinasyonlarında değer bulunmamaktadır($R^2 = 0,442$)

Çok-yönlü varyans analiz tablosuna göre; AchE enzim aktivitesine etki eden tüm faktörlerden ; hassasiyet ($p=0,0001$), lokalite ($p=0,0001$) ve sezon'un ($p=0,032$) kendi alt grupları arasındaki farkların önemli, insektisit faktörü içinde yer alan malathion ve propoksür arasındaki farkın ise önemsiz ($p=0,272$) olduğu bulundu. Ayrıca; tüm 2'li ile tüm 3'lü ve 4'lü etkileşimlerin önemli olmadığı bulundu (Tablo-VII).

AchE enzimine etki eden tüm faktörlerin ayrı ayrı değerlendirildiği tek-yönlü varyans analizinde, faktörlerin kendi içinde yer alan alt grupları arasındaki farkın sezon dışında ($p=0,280$) önemli ($p=0,0001$) olduğu bulundu (Tablo-VIII).

Tablo-VIII AchE enzimine ait tüm faktörlerin tek-yönlü varyans analiz sonuçları

FAKTÖRLER	GRUPLAR	N	X	SD	SE	% 95 GA	F oranı	F olasılığı
HASSASİYET	Dirençli	202	18,4	3,00	0,21	18,0- 18,8	268,9	0,0001
	Hassas	361	14,6	2,43	0,12	14,3- 14,9		
İNSEKTİSİT	Malathion	187	14,6	2,54	0,18	14,2- 15,0	55,8	0,0001
	Propoksür	376	16,7	3,31	0,17	16,3- 17,0		
LOKALİTE	Tabaklar	151	16,4	3,21	0,26	15,9 16,9	19,0	0,0001
	Herekli	147	17,2	3,43	0,28	16,6 17,7		
	Menekşe	130	15,6	3,12	0,27	15,1 16,2		
	Koloni	135	14,5	2,40	0,20	14,1 14,9		
SEZON	Yağlanmış	202	15,8	3,2	0,21	15,3 16,2	1,23	0,280
	Gonoaktif	361	16,1	3,2	0,17	15,8 16,4		

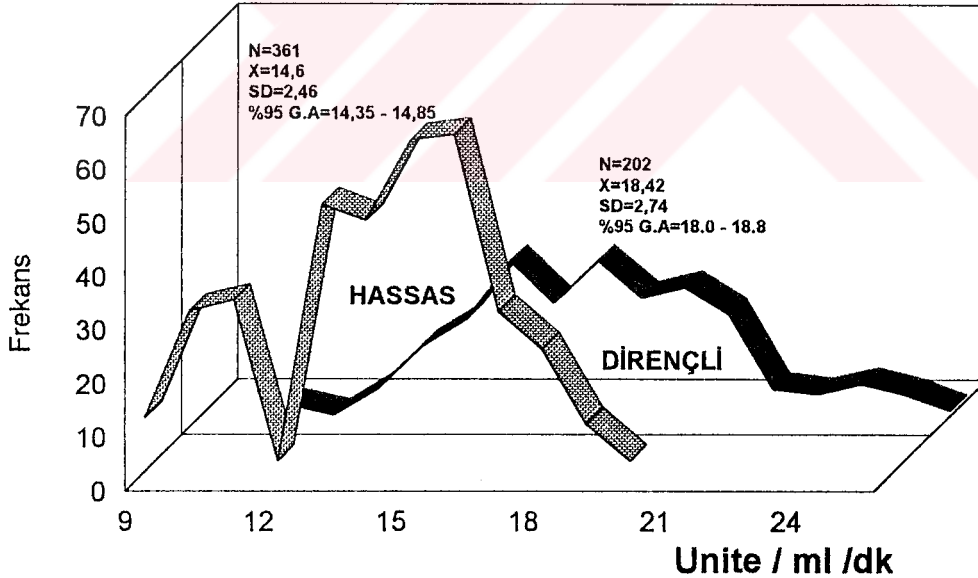
Hassasiyet faktörü içinde yer alan hassas ve dirençli gruplar arasında, AchE enzim aktivitesinin dirençlilerde daha yüksek ($p < 0,0001$) olduğu bulundu (Tablo-VIII). Bu değerlendirme hem malathion hem propoksuru kapsamaktadır. Ancak malathiona insektisine ait dirençli grup bulunmamaktadır.

Lokalite için Sheffe testine (0,05 anlamlılık düzeyinde) göre yapılan çoklu karşılaştırmalarda; Asetilkolin Esteraz aktivitesinin yüksek (Herekli), orta (Tabaklar- Menekşe) ve düşük (Koloni) olduğu 3 homojen grubun bulunduğu ve bu gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu saptandı.

Tablo-IX Asetilkolin Esteraz enzimine ait diskriminant analiz sonuçları

GRUPLAR	Örnek sayısı	Hassasiyet testine göre yapılan gruplandırma	Enzim aktivitesine göre yapılan gruplandırma
Dirençli GRUP 1	202	135 (% 66.8)	67 (% 33.2)
Hassas GRUP 2	361	65 (% 18.0)	296 (% 82.0)
Doğru gruplandırma yüzdesi	563	200	%76,6

Hassasiyet test sonuçlarına göre ; hassas ve dirençli olarak yapılan gruplandırma ile 2 tür insektisit (Malathion ve Propoksur) için ölçülen Asetilkolin Esteraz aktivitesi arasındaki uyumun, yapılan Diskriminant analizinde % 76.6 oranında başarılı olduğu bulundu (Tablo-IX).



Şekil -15 Propoksura hassas ve dirençli olan gruplarda AchE enzim aktivitelerinin frekans dağılımlarının karşılaştırılması

Yağlanmış ve Gonoaktif sezonlarda tüm lokalitelerden getirilen ve sadece propoksura göre yapılan hassasiyet testlerinde dirençli bulunan, 202 örneğe ait AchE enzim aktivite ortalamasının $18,42 \pm 2,74$ unite/ml/dk olarak ve 361 hassas örneğe ait enzim aktivite ortalamasının ise daha düşük $14,6 \pm 2,46$ unite/ml/dk olduğu bulundu (Student T-testi $p < 0,05$, Şekil-15).

4.3 Glutasyon.S-Transferaz

Gonoaktif ve yağlanmış sezonlarda 3 farklı lokaliteden ve koloniden alınan toplam 1267 örneğin Glutasyon S-Transferaz enzim aktiviteleri, Unite/ mikrogram protein/ ml olarak saptandı.

İncelediğimiz organoklorlu (DDT) ile pyrethroid (Deltamethrin ve Permethrin) grubu insektisitlere karşı gelişen dirence bağlı olarak değişiklik gösteren Glutasyon S-Transferaz aktivite seviyelerinin, tüm faktörlere göre analizi Tablo-X de özetlendi.

Tablo-X Glutasyon S-Transferaz enzim aktivitesi saptanan örneklerin gruplandırılmasında etkili olan tüm faktörlerin tanımlayıcı istatistikleri.

FAKTÖRLER		*	TABAKLAR			İİEREKLİ			MENEKŞE			KOLONİ		
SEZON	İNSEKTİSİT		N	X	SD	N	X	SD	N	X	SD	N	X	SD
YAĞLANMIŞ SEZON	DDT	R	31	12,2	2,48	32	12,5	2,4	32	11,4	2,4			
		r	28	9,5	1,25	28	9,7	1,2	28	9,6	1,2			
	Deltamethrin	R	26	11,6	1,29	22	12,2	1,5	28	10,9	1,1			
		r	28	8,9	0,99	28	9,0	1,4	28	9,2	1,1			
		R	28	11,7	1,75	27	11,1	1,3	28	10,9	1,3			
		r	24	9,1	1,11	25	9,0	1,2	22	9,0	1,2			
GONOAKTİF SEZON	DDT	R	25	12,6	2,1	29	13,0	1,7	29	11,6	1,7	58	10,9	1,7
		r	26	9,9	1,3	27	9,4	1,2	29	9,3	1,1	50	9,6	1,3
	Deltamethrin	R	23	12,2	1,6	26	12,4	1,9	22	11,9	2,0	58	10,4	1,4
		r	23	9,5	1,4	33	9,5	1,6	27	9,5	1,3	54	8,8	1,2
		R	26	11,1	1,3	22	11,5	1,1	22	11,5	1,8	50	10,7	1,2
		r	23	9,5	1,5	25	9,4	1,3	24	9,0	1,1	44	9,4	1,2

R= Dirençli, r=Hassas

Faktörlerin alt grupları arasında, farkların olup olmadığı ve incelenen 4 faktör arasında etkileşimin bulunup bulunmadığı çok-yönlü varyans analizi ile incelenmiş olup sonuçlar, Tablo-XI de özetlenmiştir.

Tablo-XI Glutasyon S-Transferaz enzimine etki eden faktörlerin Çok-Yönlü varyans analiz sonuçları

<i>Varyasyon Kaynağı</i>	<i>Kareler Toplamı</i>	<i>Serbestlik Derecesi</i>	<i>Kareler Ortalaması</i>	<i>F Değeri</i>	<i>F Önemliliği</i>
Ana Etkiler					
<i>Hassasiyet</i>	315,9	1	315,9	137,0	0,0001
<i>İnsektisit</i>	31,8	2	15,9	6,9	0,001
<i>Lokalite</i>	50,7	3	16,9	7,3	0,0001
<i>Sezon</i>	8,7	1	8,7	3,8	0,053
2 -li Etkileşimler					
<i>Hassasiyet-İnsektisit</i>	7,2	2	3,6	1,6	0,213
<i>Hassasiyet-Lokalite</i>	45,8	3	15,3	6,6	0,0001
<i>Hassasiyet-Sezon</i>	8,3	1	8,3	3,6	0,058
<i>İnsektisit-Lokalite</i>	16,4	6	2,7	1,2	0,312
<i>İnsektisit-Sezon</i>	6,0	2	3,0	1,3	0,272
<i>Lokalite-Sezon</i>	0,1	2	0,1	0,1	0,973
3- lü Etkileşimler					
<i>Hassasiyet-İnsektisit-Lokalite</i>	11,1	6	1,8	0,8	0,572
<i>Hassasiyet-İnsektisit-Sezon</i>	0,13	2	0,1	0,1	0,972
<i>Hassasiyet-Lokalite-Sezon</i>	9,0	2	4,5	4,0	0,141
<i>İnsektisit-Lokalite-Sezon</i>	7,4	4	1,8	0,8	0,526
4- lü Etkileşimler					
<i>Hassasiyet-İnsektisit-Lokalite-Sezon</i>	6,2	4	1,5	0,7	0,614
Model	1911,9	41	46,6	20,2	0,0001
Hata	2824,9	1225	2,3		
Total	4736	1266	3,7		

$R^2=0,404$

Buna göre; Glutasyon S-Transferaz aktivitesine etki eden faktörlerden; sezon dışında kalan hassasiyet, lokalite ve insektisit kendi alt grupları arasındaki farkların önemli ($p=0,0001$) ve 2'li etkileşimlerden hassasiyet-lokalite ($p=0,0001$) dışında kalan diğer tüm 2'li, tüm 3'lü ve tüm 4'lü etkileşimlerin önemsiz olduğu bulundu (Tablo-XI).

Glutasyon S-Transferaz aktivitesine etki eden tüm faktörlerin ayrı ayrı değerlendirildiği tek-yönlü varyans analizi ile de sezon dışında kalan tüm faktörlerin kendi içinde yer alan alt grupları arasındaki farklılığın ($p=0,0001$) önemli olduğu bulundu (Tablo-XII).

Tablo-XII Glutasyon S Transferaz enzimine ait tüm faktörlerin Tek-Yönlü varyans analiz sonuçları

FAKTÖRLE R	Alt Gruplar	N	X	SD	SE	% 95 GA	F	F
							oranı	olasılığı
HASSASİYET	Dirençli	643	11,50	1,87	0,07	11,3 11,6	586,2	0,0001
	Hassas	624	9,30	1,26	0,05	9,2 9,4		
İNSEKTİSİT	DDT	452	10,75	2,13	0,10	10,6 10,9	10,9	0,0001
	Deltamethrin	425	10,24	1,89	0,09	10,1 10,4		
	Permethrin	390	10,21	1,67	0,08	10,0 10,4		
LOKALİTE	Tabaklar	311	10,67	2,05	0,11	10,4 10,9	11,4	0,0001
	Herekli	324	10,71	2,13	0,12	10,5 10,9		
	Menekşe	319	10,31	1,83	0,10	10,1 10,5		
	Koloni	313	9,94	1,57	0,09	9,7 10,1		
SEZON	Yağlanmış	493	10,39	1,89	0,07	10,3 10,5	0,29	0,591
	Gonoaktif	774	10,45	1,99	0,09	10,3 10,6		

Tablo-XIII Gonoaktif ve yağlanmış sezonlarda tüm lokalitelerde DDT, Deltamethrin ve Permethrin insektisitlerinin Glutasyon S-Transferaz aktivitesine ait istatistik sonuçları

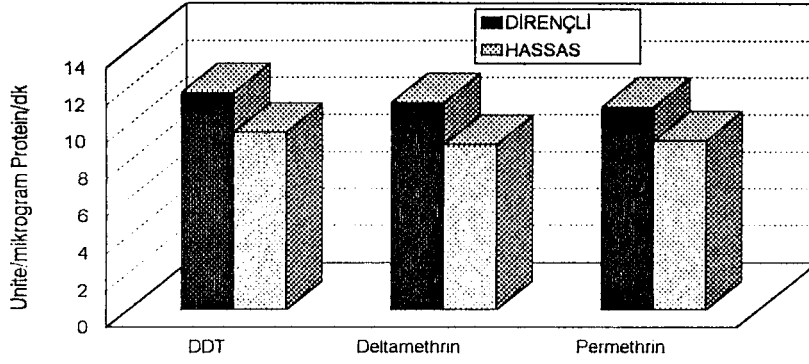
İNSEKTİSİTLER	SEZON	N	X	SD	SE	P değeri
DDT	Yağlanmış	179	10,7	2,3	0,17	P > 0,05
	Gonoaktif	273	10,8	2,0	0,12	
DELTAMETHRİN	Yağlanmış	160	10,2	1,7	0,13	P > 0,05
	Gonoaktif	265	10,3	1,9	0,12	
PERMETHRİN	Yağlanmış	154	10,1	1,7	0,14	P > 0,05
	Gonoaktif	236	10,2	1,6	0,10	

Tüm sezon ve lokalitelerde; DDT, Deltamethrin ve Permethrin insektisitlerinin herbirinde dirençli gruplara ait Glutasyon S-Transferaz aktivitesinin hassaslara göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulundu (T-testi $p < 0,05$, Şekil-16 ve 17).

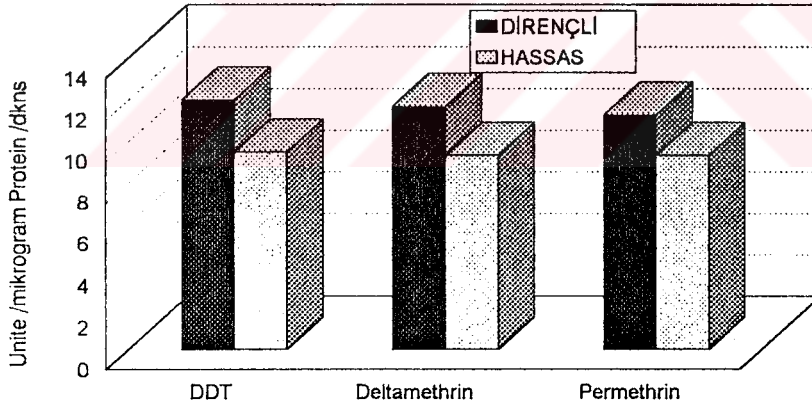
İnsektisit için, yapılan çoklu karşılaştırmalarda; Glutasyon S Transferaz enzim aktivitesi bakımından DDT'nin Deltamethrin ve Permethrin insektisitlerinden anlamlı derecede daha yüksek aktiviteye sahip olduğu, Deltamethrin ile Permethrin arasında ise anlamlı derecede fark olmadığı bulundu (Sheffe t-testi, $p < 0,05$).

Lokaliteler için yapılan çoklu karşılaştırmalarda, Glutasyon S-Transferaz aktivitesinin yüksek (Herekli- Tabaklar) ve düşük (Menekşe- Koloni) olduğu iki homojen grubun olduğu ve bu iki grup arasındaki farkın anlamlı olduğu saptandı (Sheffe t-testi, $p < 0,05$).

Hem topluca değerlendirildiğinde (Tablo-XII), hem de her insektisit için ayrı ayrı değerlendirildiğinde (Tablo-XIII) gonoaktif sezona ait örneklerin Glutasyon S-Transferaz aktivitesinin yağlanmış sezondan anlamlı derecede farklı olmadığı bulundu.



Şekil- 16 Yağlanmış dönemde,tüm insektisitlere ait hassas ve dirençli gruplardaki ortalama Glutasyon S-Transferaz aktivitesi.



Şekil -17 Gonoaktif dönemde, tüm insektisitlere ait hassas ve dirençli gruplardaki ortalama Glutasyon S-Transferaz aktiviteleri.

Tablo-XIV Farklı sezonlarda farklı lokalitelerdeki dirençli ve hassaslara ait Glutasyon S-Transferaz aktivitesine göre DDT,Deltamethrin ve Permethrin insektisitler arasındaki farklılığın Sheffe çoklu karşılaştırma testine göre önemlilik sonuçları.

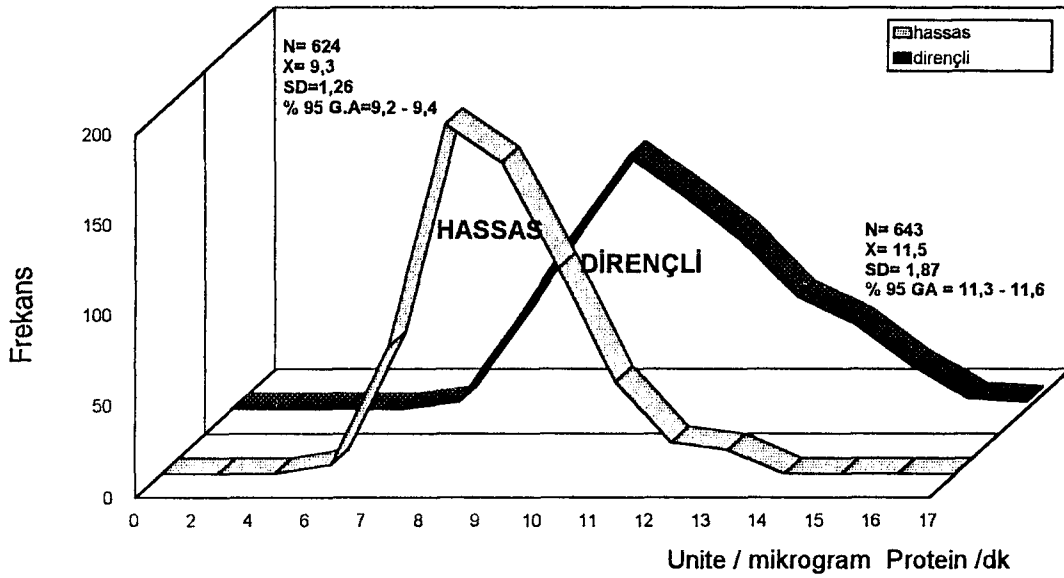
FAKTÖRLER			DİRENÇLİ				HASSAS							
SEZON	LOKALİTE	İNSEKTİSİT	N	X	SD	1	2	3	N	X	SD	1	2	3
Y A Ğ L A N M I Ş	TABAKLAR	DDT	31	12,2	2,5				28	9,5	1,3			
		Deltamethrin	26	11,6	1,3	*			28	8,9	1,0			
		Permethrin	28	11,7	2,0	**			24	9,1	1,1	**		
	HEREKLİ	DDT	32	12,5	2,4				28	9,7	1,3			
		Deltamethrin	22	12,2	1,5	*			28	9,0	1,4			
		Permethrin	27	11,1	1,2				25	9,0	1,2	**		
	MENEKŞE	DDT	32	11,4	2,4				28	9,6	1,2			
		Deltamethrin	28	10,9	1,1	*			28	9,2	1,1	*		
		Permethrin	28	10,9	1,2	**			22	9,0	1,2	**		
G O N O A K T İ F	TABAKLAR	DDT	25	12,6	2,2				26	9,9	1,3			
		Deltamethrin	23	12,2	1,6	*			23	9,5	1,4	*		
		Permethrin	26	11,1	1,3				23	9,5	1,5	**		
	HEREKLİ	DDT	29	13,0	1,7				21	9,3	1,2			
		Deltamethrin	26	12,4	1,9	*			26	9,5	1,6	*		
		Permethrin	22	11,5	1,1				23	9,4	1,3	**		
	MENEKŞE	DDT	29	11,6	1,7				29	9,3	1,1			
		Deltamethrin	22	11,9	2,0	*			27	9,5	1,3	*		
		Permethrin	22	11,5	1,8	**			33	9,1	1,1	**		
KOLONİ	DDT	58	11,7	1,7				54	9,6	1,2				
	Deltamethrin	57	10,4	1,3	*			54	8,7	1,2				
	Permethrin	50	10,7	1,4	**			44	9,4	1,2	**			

* Yıldız işaretine karşılık gelen yatay ve dikey insektisit grupları arasındaki fark $P=0,05$ düzeyinde anlamsızdır

1=DDT, 2=Deltamethrin ve 3=Permethrin

Yağlanmış sezonda Herekli dışında kalan Tabaklar ve Menekşeye ait dirençli gruplarda Sheffe testine göre yapılan çoklu karşılaştırmalarda üç insektisit (DDT, Deltamethrin ve Permethrin) birbirinden farklı olmadığını, hassas gruplarda ise sadece Tabaklar ve Herekli de DDT-Permethrin ve Permethrin-Deltamethrin insektisitleri arasındaki farkın önemli olmadığı bulundu (Tablo-XIV).

Gonoaktif sezonda Tabaklar ile Herekli lokalitesine ait dirençli gruplarda sadece Deltamethrin ile DDT insektisitleri arasındaki farkın önemsiz , Menekşe ile Koloni gruplarında ise üç insektisit arasındaki farkın önemli olmadığı bulundu. Aynı sezonun hassaslarında Koloni dışındaki tüm lokalitelerde üç insektisit arasındaki farkın önemli olmadığı, Koloni grubunda ise DDT-Permethrin, Deltamethrin-Permethrin insektisitleri arasındaki farkın önemli olmadığı bulundu (Tablo-XIV).



Şekil- 18 Hassas ve dirençli örneklere ait Glutasyon S-Transferaz aktivite frekans dağılımlarının karşılaştırılması

Yağlanmış ve gonoaktif sezonlarda tüm lokalitelerden getirilen ve DDT, Deltamethrin ile Permethrin insektisitlerine göre yapılan hassasiyet testlerinde ; dirençli bulunan 643 örneğe ait Glutasyon S-Transferaz enzim aktivite ortalamasının $11,5 \pm 1,87$ Unite / μg protein / dk olarak ve 624 hassas örneğe ait enzim aktivite ortalaması ise daha düşük $9,3 \pm 1,26$ Unite / μg protein / dk olarak bulundu (T-testi $p < 0.05$, Şekil-18).

Tablo-XV Glutasyon S-Transferaz enzimine ait diskriminant analiz sonuçları

GRUPLAR	Örnek sayısı	Hassasiye ttest sonucuna göre gruplandırması	Enzim aktivitesine göre yapılan gruplandırma
Dirençli GRUP 1	643	449 (% 69.8)	194 (% 30.2)
Hassas GRUP 2	624	134 (% 21.5)	490 (% 78.5)
Doğru gruplandırma yüzdesi	1267	583	% 74.1

Hassasiyet test sonuçlarına göre ; hassas ve dirençli olarak yapılan gruplandırma ile 3 insektisit (DDT,Deltamethrin Permethrin) için ölçülen Glutasyon S-Transferaz aktivitesi arasındaki uyumun, yapılan Diskriminant analizinde % 74,1 oranında başarılı olduğu bulundu (Tablo-XV).

4.4 Genel Esteraz

Gonoaktif ve yağlanmış sezonlara ait 3 farklı lokaliteden (arazi) ve koloniden alınan toplam 1948 örneğin genel esteraz aktivitesi ; mikromol ürün / mikrogram protein / dk olarak saptandı.

İncelediğimiz; organoklorlu (DDT), organofosfatlı (Malathion), karbamatlı (Propoksür) ve pyrethroid (Deltamethrin ile Permethrin) grubu insektisitlere karşı gelişen dirence bağlı olarak değişiklik gösteren Genel Esteraz aktivite seviyelerinin tüm faktörlere göre durumu Tablo-XVI da özetlenmiştir.

Tablo- XVI Genel Esteraz aktivitesi saptanan örneklerin tüm faktörlere göre grup ortalamaları

FAKTÖRLER			Org klor		Orgfosft		Karbamt		Pyrtroid	
NAFTOL	SEZON	Lokalite	R	r	R	r	R	r	R	r
α NAFTOL	YAĞLANMIŞ	Arazi	0,12	0,10	*	0,10	0,12	0,11	0,12	0,09
		Koloni								
	GONOAKTİF	Arazi	0,13	0,11		0,10	0,13	0,11	0,13	0,10
		Koloni	0,12	0,10		0,11	0,12	0,11	0,12	0,11
β NAFTOL	YAĞLANMIŞ	Arazi	0,10	0,09		0,09	0,11	0,09	0,11	0,09
		Koloni								
	GONOAKTİF	Arazi	0,12	0,09		0,09	0,12	0,10	0,12	0,10
		Koloni	0,10	0,10		0,10	0,11	0,10	0,11	0,10

*. Organofosfat insektisit grubuna ait dirençli grup bulunmamaktadır.

R= Dirençli, r= Hassas

Faktörlerin, alt grupları arasında farkların olup olmadığını ve incelenen 5 faktör arasında etkileşimin bulunup bulunmadığı çok-yönlü varyans analizi ile incelenmiş olup sonuçlar tablo- XVII de özetlenmiştir

Tablo-XVII Genel Esteraz aktivitesine etki eden tüm faktörlerin çok -yönlü varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	F Önemliliği
<i>Hassasiyet</i>	0,01	1	0,01	19,9	0,0001
<i>İnsektisit</i>	0,01	3	0,00	8,08	0,0001
<i>Lokalite</i>	0,01	1	0,01	16,5	0,0001
<i>Naftol</i>	0,00	1	0,00	2,8	0,094
<i>Sezon</i>	0,01	1	0,01	21,5	0,0001
<i>Hassasiyet-İnsektisit</i>	0,00	2	0,00	3,6	0,028
<i>Hassasiyet-Lokalite</i>	0,01	1	0,01	21,2	0,0001
<i>Hassasiyet-Naftol</i>	0,00	1	0,00	1,4	0,236
<i>Hassasiyet-Sezon</i>	0,00	1	0,00	2,3	0,136
<i>İnsektisit-Lokalite</i>	0,00	3	0,00	1,1	0,339
<i>İnsektisit-Naftol</i>	0,01	3	0,00	5,4	0,001
<i>İnsektisit-Sezon</i>	0,00	3	0,00	2,9	0,069
<i>Lokalite-Naftol</i>	0,00	1	0,00	7,0	0,008
<i>Lokalite-Sezon</i>	0,00	0			
<i>Naftol-Sezon</i>	0,00	1	0,00	3,8	0,053
<i>Hassasiyet-İnsektisit-Lokalite</i>	0,00	2	0,00	2,1	0,127
<i>Hassasiyet-İnsektisit-Naftol</i>	0,00	2	0,00	4,4	0,013
<i>Hassasiyet-İnsektisit-Sezon</i>	0,00	2	0,00	0,7	0,520
<i>İnsektisit-Lokalite-Naftol</i>	0,00	3	0,00	0,3	0,599
<i>İnsektisit-Lokalite-Sezon</i>	0,00	3			
<i>Lokalite-Naftol-Sezon</i>	0,00	0			
<i>Hassasiyet-İnsektisit-Lokalite-Naftol</i>	0,00	2	0,00	1,8	0,160
<i>Hassasiyet-İnsektisit-Lokalite-Sezon</i>	0,00	0			
<i>İnsektisit-Lokalite-Naftol-Sezon</i>	0,00	3	0,00	0,49	0,689
<i>Hassasiyet-İnsektisit-Lokalite-Naftol-Sezon</i>	0,00	3	0,00	0,24	0,866
MODEL	0,24	40	0,01	12,9	0,0001
TOPLAM	1,06	1947	0,00		

$R^2 = 0,21$

Çok-yönlü varyans analiz sonuçlarına göre; naftol dışındaki hassasiyet, insektisit, lokalite ve sezon faktörlerinin kendi alt grupları arasındaki farkın önemli ($p \leq 0,001$) olduğu saptandı. 2'li etkileşimlerden; hassasiyet-insektisit, hassasiyet-lokalite,- insektisit-naftol ve lokalite-naftol dışındaki tüm 2'li, 3'lü ve 4'lü etkileşimlerin ise önemsiz ($p > 0,05$) olduğu bulundu (Tablo-XVII).

Tablo-XVIII Genel Esteraz aktivitesi için, tüm faktörlerin tek-yönlü varyans analiz sonuçları

FAKTÖRLER	GRUPLAR	N	X	SD	SE	% 95 GA	F oranı	F olasılığı
HASSASİYET	1= <i>Dirençli</i>	843	0,1144	0,024	0,0008	0,113 0,116	192,3	0,0001
	2= <i>Hassas</i>	1105	0,1002	0,021	0,0006	0,099 0,102		
İNSEKTİSİT	1= <i>Organoklor</i>	574	0,1052	0,023	0,0010	0,103 0,107	19,1	0,0001
	2= <i>Organofosfat</i>	283	0,0982	0,022	0,0013	0,957 0,100		
	3= <i>Karbamat</i>	548	0,1107	0,023	0,0010	0,108 0,113		
	4= <i>Pyrethroid</i>	543	0,1074	0,024	0,0008	0,105 0,109		
LOKALİTE	1= <i>Arazi</i>	1005	0,1074	0,025	0,0007	0,106 0,109	4,7	0,0347
	2= <i>Koloni</i>	943	0,1052	0,021	0,0007	0,104 0,107		
NAFTOL	1= <i>α naftol</i>	986	0,1108	0,024	0,0007	0,109 0,112	75,2	0,0001
	2= <i>β Naftol</i>	962	0,1018	0,022	0,0007	0,100 0,103		
SEZON	1= <i>Yağlanmış</i>	544	0,1047	0,025	0,0011	0,103 0,107	3,6	0,05
	2= <i>Gonoaktif</i>	1404	0,1070	0,022	0,0006	0,106 0,108		

Genel Esteraz aktivitesine etki eden tüm faktörlerin tek tek değerlendirildiği tek-yönlü varyans analizinde ;Hassasiyet ($p=0,0001$), insektisit ($p=0,0001$), lokalite ($p=0,0347$), naftol ($p=0,0001$) faktörlerinin, kendi içinde yer alan alt grupları arasındaki farklılığının önemli, sezon faktörü içinde yer alan alt gruplar arasındaki farklılığın ise önemlilik sınırında ($p= 0,05$) olduğu saptandı (Tablo- XVIII).

Insektisit için Sheffe testine (0,05 anlamlılık düzeyinde) göre yapılan çoklu karşılaştırmalarda ; Genel Esteraz aktivitesi bakımından Karbamat ve Phyrethroid insektisit grubunun Organoklor ve Organofosfatlılardan anlamlı derecede yüksek aktiviteye sahip olduğu saptandı.

Tablo-XIX Farklı insektisitlere ait hassas ve dirençliler arasındaki farklılığın tüm faktörlere göre yapılan Student T-testi sonuçları

NAFTOL	SEZON	LOKALİTE	Organoklor	Organofosfat	Karbamat	Pyrethroid
α Naftol	Yağlanmış	<i>Arazi</i>	0,0001	Organofosfat insektisine ait dirençli grup bulunmadığı için önemlilik testi yapılamadı.	0,047	0,0001
		<i>Koloni</i>				
	Gonoaktif	<i>Arazi</i>	0,003		0,0001	0,0001
		<i>Koloni</i>	0,0001		*0,268	0,005
β Naftol	Yağlanmış	<i>Arazi</i>	0,001	0,0001	0,0001	
		<i>Koloni</i>				
	Gonoaktif	<i>Arazi</i>	0,0001	0,0001	0,0001	
		<i>Koloni</i>	*0,828	*0,434	*0,989	

* Yıldız işareti konulan gruplar dışında kalan hassas ve dirençliler arasındaki farklılık önemlidir.

α ve β esteraz aktivitesine göre ; gonoaktif ve yağlanmış sezonlara ait arazi örneklerinde organoklor insektisitine dirençli ve hassas olanlar arasındaki farklılığın önemli ($p \leq 0,001$), koloni örneklerinde ise sadece gonoaktif sezonda β esteraz aktivitesi için hassas ve dirençliler arasındaki farklılığın önemsiz ($p=0,828$) olduğu bulundu (Tablo-XIX).

Organofosfat insektisitine ait dirençli grup bulunmadığı için dirençli ve hassaslara ait α ve β esteraz aktiviteleri arasındaki farkın önemlilik testleri yapılamadı

α ve β esteraz aktivitesine göre; gonoaktif ve yağlanmış sezonlardaki arazi örneklerinde karbamat insektisitine dirençli ve hassas olanlar arasındaki farklılığın önemli ($p < 0,05$ ve $p=0,0001$), koloni örneklerinde ise gonoaktif sezonda α ve β esteraz aktivitesi için hassas ve dirençliler arasındaki farkın önemsiz ($p > 0,05$) olduğu bulundu (Tablo-XIX).

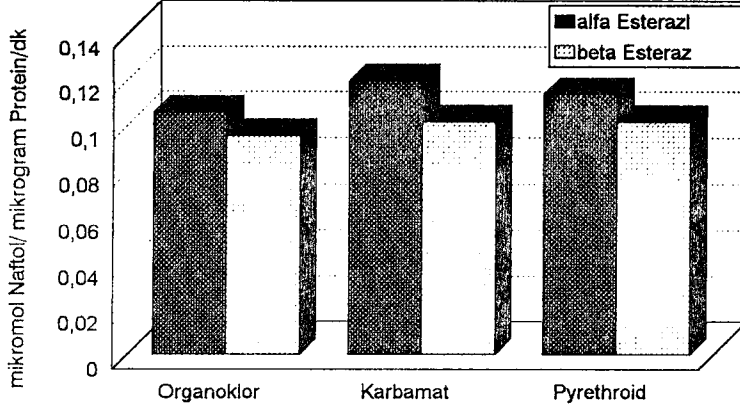
Gonoaktif sezonda Pyrethroid insektisiti için ölçülen β esteraz aktivitesine göre koloni örneklerinin hassas ve dirençlileri arasındaki farkın önemsiz ($p=0,989$) olduğu, tüm diğer gruplarda ise hassas ve dirençliler arasındaki farkın önemli ($p=0,0001$) olduğu bulundu (Tablo-XIX).

Tablo-XX Her iki sezonda α ve β Esteraz enzimlerine ait temel istatistikî bilgiler ve Esterazlar arasındaki farklılığın önemlilik testleri

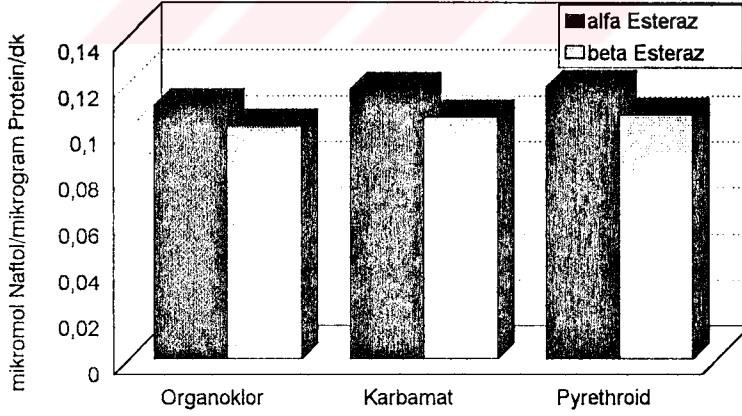
SEZON	İnsektisit	Naftol	N	X	SD	SE	P	
Yağlanmış Sezon	organoklor	α naftol	76	0,105	0,023	0,002	0,0002	0,001
		β naftol	72	0,095	0,023	0,002		
	karbamat	α naftol	74	0,119	0,025	0,002	0,0001	
		β naftol	73	0,101	0,022	0,002		
	pyrethroid	α naftol	101	0,113	0,028	0,002	0,002	
		β naftol	72	0,101	0,023	0,002		
Gonoaktif Sezon	organoklor	α naftol	215	0,110	0,023	0,002	0,0001	
		β naftol	211	0,101	0,022	0,002		
	karbamat	α naftol	205	0,117	0,023	0,002	0,0001	
		β naftol	196	0,105	0,022	0,002		
	pyrethroid	α naftol	170	0,118	0,022	0,002	0,342	
		β naftol	200	0,106	0,023	0,002		
TOTAL		α naftol	986	0,111	0,024	0,001		
TOTAL		β naftol	962	0,102	0,022	0,001		

Yağlanmış sezonda tüm insektisitler için ölçülen α esteraz aktivitelerinin β esteraz aktivitelerinden daha yüksek olduğu ve aradaki bu farkın yapılan Student T-testlerinde önemli ($p \leq 0,002$) olduğu bulundu (Tablo-XX, Şekil-19).

Gonoaktif sezonda ise Pyrethroid insektisiti dışında kalan tüm insektisitler için α ve β esteraz aktiviteleri arasındaki farkın önemli ($p=0,0001$) olduğu ve α esteraz aktivitesinin β esteraz aktivitesinden daha yüksek olduğu bulundu (Tablo-XX, Şekil-20).



Şekil 19 Farklı insektisitlerin yağlanmış dönemine ait α ve β esteraz aktiviteleri

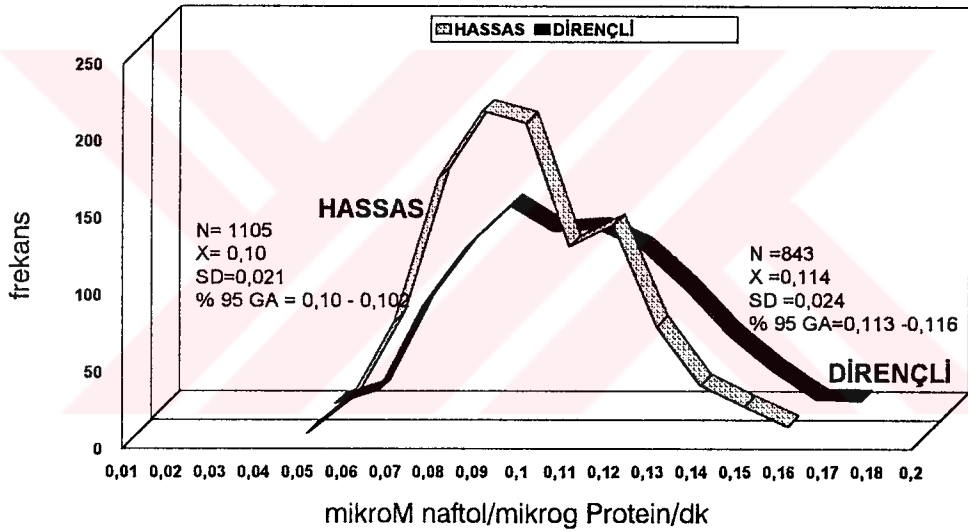


Şekil -20 Farklı insektisitlerin gonoaktif dönemine ait α ve β esteraz aktiviteleri .

Tablo-XXI Genel Esteraz enzimine ait diskriminant analiz sonuçları

<i>GRUPLAR</i>	<i>Örnek sayısı</i>	<i>Hassasiyet testine göre gruplandırma</i>	<i>Enzim aktivitesine göre gruplandırma</i>	<i>göre</i>
Dirençli GRUP 1	843	514 (% 61.0)	329 (% 39.0)	
Hassas GRUP 2	1105	407 (% 36.8)	698 (% 63.2)	
Doğru gruplandırma yüzdesi	1948	921	1027	% 62.2

Hassasiyet test sonuçlarına göre ; hassas ve dirençli olarak yapılan gruplandırma ile 3 insektisit grubu (Organoklor, Organofosfat, Karbamat ve Pyrethroid) için ölçülen Genel Esteraz aktivitesi arasındaki uyumun, yapılan Diskriminant analizinde % 62.2 oranında başarılı olduğu bulundu (Tablo-XXI).



Şekil-21 Genel Esteraz aktivitesi bakımından hassas ve dirençlilerin frekans dağılımı

Yağlanmış ve gonoaktif sezonlarda arazi ve koloniden getirilen ve tüm insektisit gruplarına göre yapılan hassasiyet testlerinde; dirençli bulunan 843 örneğe ait Genel Esteraz enzim aktivite ortalamasının $0,114 \pm 0,024$ μm naftol / μg Protein /dk olarak bulunurken 1105 hassas örneğe ait enzim aktivite ortalamasının ise daha düşük $0,10 \pm 0,021$ μm naftol / μg Protein / dk olduğu bulundu (Student T-testi $p=0,001$, Şekil-21).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Canlı organizmaya giren veya in-vivo metabolizma yan ürünü olarak açığa çıkan, yabancı kimyasal maddelerin etkisizleştirilmesinde (Biyotransformasyon) alternatif reaksiyonlar vardır. Bu reaksiyonların ortak yönü ise; oluşan veya dışarıdan alınan kimyasalların organizmaya zarar vermeden etkisizleştirilerek uzaklaştırılmasıdır.

Organizma için, farklı kimyasal gruplar taşıyan insektisitler de yabancı kimyasal madde konumunda bulduklarından hedef organizma tarafından bunların etkisizleştirilmesi esasına dayanan değişik direnç mekanizmaları gelişmiş ve gelişmeye devam etmektedir.

Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı, Adana İli Bitki Koruma Şube Müdürlüğü'nün, 1995 yılı için yayınlamış olduğu çalışma raporuna göre; Bitki zararlıları ve hastalıkları ile yapılan mücadelede Adana ilimizde değişik gruplardan 1.843.176 kg insektisit, 326.029 kg fungusit, 508.711 kg Herbisit kullanılmış olup bunların parasal değerinin o günün koşullarında 3.343.540.784.000 TL olduğu bildirilmiştir (66). Yaptığımız değerlendirmede; kullanılan insektisitlerin %50'nin Karbamatlı %24'nün Sentetik Pyrethroid, %18'nin Organofosfatlı ve %8'nin Organoklorlu olduğu anlaşılmıştır (66).

Günümüzde, Halk sağlığı açısından önem taşıyan vektör canlılar ile mücadele amacıyla kullanılan kimyasallara karşı gelişen veya olası bir dirençi güvenilir bir şekilde tespit etmek için kullanılan hassasiyet test yöntemi, direncin değişik tipleri konusunda (İnsektisit alımının azaltılmasıyla ilgili dirençlilik, Hedef yapı direnci, metabolik dirençle ilgili olarak biyokimyasal temele dayanan alternatif direnç tespit yöntemleri geliştirilmiştir (7, 9,12, 14, 21, 25, 27,28, 52, 53, 54,77).

Bu çalışmanın ilk aşamasında, direncin kaynağına bakmaksızın biyolojik aktivitenin farklı olduğu yağlanmış ve gonoaktif sezonlarda, Adana ilinde; ekilebilir arazilerinin büyük bir kısmında sulu tarım yapılan ürünlerin bulunması nedeniyle çok yoğun insektisit kullanımına maruz olan Tabaklar (Karataş-ADANA), Herekli (Ceyhan-ADANA) köyleri ile coğrafik konumu itibariyle arazi oranı nispeten az olan bölgede, kuru tarıma uygun tahıl ürünlerinin ekilmesi nedeniyle insektisit kullanımı çok fazla olmayan Menekşe (Yüreğir-ADANA) köylerinden getirilen ve bölümümüz insektaryumunda 1983 yılından beri kolonizasyonu yapılmasından dolayı hiçbir seleksiyon baskısı altında bulunmayan koloni örneklerine ait ergin *An.sacharovi* dişileri hassasiyet testlerine maruz bırakıldılar.

Bu hassasiyet testlerinde; DDT, Malathion, Propoxur, Deltamethrin ve Permethrin insektisitlerinin letal dozlarına karşı gruplandığımız hassas ve dirençli örneklerin, Organofosfat ve Karbamat grubu insektisitlerin hedef yapısı olan Asetilkolin Esteraz, Organoklor (DDT) ve Pyrethroid (Deltamethrin ile Permethrin) insektisitlerinin etkisizleştirilmesinde çok büyük rolü olan Glutasyon S-Transferaz ile tüm insektisit gruplarının etkisizleştirilmesinde rolü olan non-spesifik Genel Esteraz enzimlerinde dirence bağlı uyumlu aktivite değişimi olup olmadığı saptanmaya çalışılmıştır (1,14, 22, 27,30, 44, 52, 55)

Organofosfat ve Karbamat insektisit gruplarına karşı gelişen dirençlilikte hedef yapı olan AchE aktivite düzeyinin, insektisit uygulamalarının çok yoğun olduğu Tabaklar ve Herekli lokalitelerine ait örneklerde Menekşe ve Koloniye nazaran daha yüksek olduğunu saptadık. Daha önceki araştırmalarda (14, 20, 29, 30) bu grup insektisitlerden etkilenmeyen dirençli örneklerde, değişik konformasyona sahip Asetilkolin Esteraz (Altered AchE) formunun ortaya çıktığı ve zamanla bu yeni AchE formunu taşıyan bireylerin popülasyonda etkin duruma geldiği yani sayıca daha baskın olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır (29,30,54,62).

Bu çalışmada yapılan hassasiyet testlerine göre; sadece Organofosfatlı %5 lik Malathion'un çalışma bölgesindeki tüm lokalitelerinden getirilen erginlere karşı %100 etkili olduğu (ölümü neden olduğu) bulunmuştur. Malathion, Çukurova bölgesinde ergin sivrisinek mücadelesi amacıyla 1971 yılından itibaren kullanılmaya başlanmış ve 1984 yılında *An. sacharovi*'ye karşı tolerans gelişmesi nedeniyle terk edilmiştir. (40). Tolerans'dan %5 ile %10 arasında dirençlilik anlaşılır. Bizim sonuçlarımız 10-12 yıllık bir aradan sonra popülasyonda dirençlilik lehine gelişen seleksiyonun tamamen ortadan kalktığını ve insektisit uygulamalarında direnç gelişimini önlemek için belli aralıklarla insektisitlerin değiştirilmesi yönündeki tavsiyeleri haklı göstermektedir (13)

French-Constant'a göre (20); AchE aktivitesinin, dirençli formlarda hassaslardakinden daha yüksek bulunmasının enzimin değişik (altered) formundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını tam olarak açıklayabilmek için, incelenen bireylerin genotipinin homozigot dominant (RR), heterozigot (Rr) veya hassas (rr) olup olmadığının bilinmesi ve Propoxur'un %99 saflıkta olması gerekmektedir (20, 30).

Çalışmamızda AchE enzim seviyesine ilişkin direnç gelişimi sadece Propoxur (karbamatlı) için saptanmıştır. Ancak bazı araştırmacıların (20) ileri sürdüğü koşulları çalışmamızda sağlayamadığımız için dirençliliğin AchE enziminin altered formundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı hakkında yorum yapmak mümkün değildir.

En yüksek AchE enzim aktivitesinin Herekli ve Tabaklar popülasyonuna ait dirençli gruplarda bulunması; bu 2 lokalitede tarımsal mücadele amacıyla daha fazla oranda Organofosfat ve Karbamat insektisit kullanımına dayanan seleksiyon baskısının etkisiyle ortaya çıktığı söylenebilir.

Organoklor (DDT) ve Pyrethroid (Deltamethrin ile Permethrin) insektisitlerine karşı gelişen fizyolojik direnç incelemek amacıyla Glutasyon S.Transferaz aktivitesindeki değişimler incelendiğinde, buna uygun olarak yapılan araştırmamızda DDT, Deltamethrin ve Permethrin insektisitlerine karşı direnç geliştiren gruplarda hassaslara nazaran daha yüksek GST aktivitesinin bulunması; bu tür insektisitlerin detoksifikasyonunda GST enziminin önemli bir rol aldığını gösteren çalışmalarla da desteklenmiştir (24,47, 53, 54, 63, 64, 65).

Musca domestica ile yapılan genetik çalışmalarda DDT ve Pyrethroid direncinde birden fazla genin etkili olduğu ve bu genlerin ayrı ayrı ekspresyonu ile aktivitenin yükselebileceği gibi bu gibi genlerin birbirini üzerine olan kümülatif etkisiyle de aktivitenin artabileceği ileri sürülmektedir (49, 53, 54, 55). Bu nedenle, çalışmamızda dirence bağlı olarak artan GST aktivitesinin bir ve/veya daha fazla gen/genlerin etkisiyle ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

İnsektisitler arasında en yüksek Glutasyon S-transferaz aktivitesinin DDT'ye ait olması ve bunun Pyrethroid grubundan Deltamethrin ile Permethrin'in izlemesi, GST aktivitesini arttıran gen ve/veya genler konusunda kesin bilgi vermemekle birlikte incelenen *An.sacharovi* populasyonundaki bu direncin DDT'ye bağlı olarak ortaya çıktığı ve muhtemelen çapraz direnç mekanizması ile de Pyrethroid grubu insektisitlere yansıdığı , ayrıca Pyrethroid kullanımının da bu direncin populasyonda yayılmasına yardım ettiği söylenebilir.

Çünkü hassasiyet test sonuçlarına göre yapılan çok-yönlü ve tek-yönlü varyans analizlerinde, DDT, Deltamethrin ve Permethrin etkisinin önemli derecede farklı olduğu halde DDT için lokaliteler arasında fark olmadığı bulunmuştu. Oysa Deltamethrin ile Permethrin insektisitleri için Tabaklar ve Herekli arasında fark olmadığı halde Menekşeden getirilen örneklerin bu iki lokaliteden farklılık gösterdiği saptanmıştı. Günümüzde zirai mücadele amacıyla çok yaygın (ikinci sırada) bir kullanım alanına sahip olan sentetik Pyrethroidlerden Deltamethrin ile Permethrinin, ekilebilir arazilerin göreceli olarak az veya çok olmasına göre seleksiyon baskısı oluşturduğu ve lokaliteler arasında Tabaklar-Herekli ve Menekşe şeklinde 2 farklı grubun oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir..

CDNB yi substrat olarak kullanan ve farklı dokularda yer alan, aminoasit sayısı ile yapısı farklı olup aynı reaksiyonu kataliz eden GST enziminin çok sayıda izoenzimi (6) bulunduğu için, elde ettiğimiz aktivitenin hangi izoenzimin etkisiyle ortaya çıktığını belirlemek mümkün olmadığından, değerlendirme total Glutasyon S-transferaz aktivitesi olarak yapılmıştır.

Farklı sezonlarda getirilen arazi (Herekli-Tabaklar ve Menekşe) ile koloni örneklerine ait 4 farklı insektisit grubu için ölçtüğümüz, non-spesifik Genel Esteraz aktivitesinin, Organofosfat (Malathion) dışındaki tüm insektisitler için dirençli olanlarda hassaslara göre daha yüksek olması ve dirençlilerin lehine olan bu farklılığın, arazi popülasyonunda ve aktif sezonda daha belirgin olması, Esteraz enziminin metabolik dirençle ilişkili olduğunu ve farklı gruplardaki insektisitlerin degradasyonundan sorumlu olabileceğini gösteren önceki çalışmalar ile desteklenmiştir (73).

Esteraz aktivitesi için yaptığımız ölçümlerde; substrat olarak kullandığımız α -naftilasetat ile β -naftilasetatın tüm Esteraz aktivitesinin ortaya çıkması için genel substratlar kullanılmasının yanında α -naftilasetatı kullanan α -Esteraz enzim aktivite düzeyinin β -Esteraz düzeyinden daha yüksek olması 1987 yılında aynı tür ile aynı bölgelerde yapılan çalışma (28, 30) sonuçları ile benzerlik göstermemektedir. Çünkü, o yıllarda yapılan çalışmaya göre; Esterazlar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı sonucuna varılmıştı.

Bu değişikliğin nedeni olarak, 1987 yılından beri yoğun insektisit kullanımının devam ettiği ve bunun yarattığı seleksiyon baskısının α -Esteraz geni yönünde olduğu söylenebileceği gibi bunun tam olarak desteklenmesi için de kimyasal grup özgüllüğü olan Esterazların ve MFO (Karışık Fonksiyonlu Oksidazları)'nın çalışılması gerektiği de düşünülebilir. Çünkü Karbamat, Pyrethroid ve Organoklorlu insektisitlerin degradasyonundan birincil derecede non-spesifik Esterazlar, spesifik Esterazlar ve MFO enzimleri sorumludur (28, 30, 31, 73).

Genel Esteraz düzeyinin arazi örneklerinde koloni örneklerinden daha yüksek bulunması ise çalışma yaptığımız diğer enzimler içinde geçerli olan seleksiyon baskısının bir yansıması olduğu şeklindeki görüşümüzü pekiştirmektedir. Son yıllarda en çok kullanılan insektisit grubunun Karbamatlılar olduğu düşünüldüğünde bu insektisit grubunun Organoklor ve Pyrethroidlere nazaran daha yüksek α -Esteraz aktivitesinin oluşmasına katkıda bulunduğu düşünülebilir.

Çalıştığımız 3 enzimde saptanan aktivite düzeylerinin yağlanma (kış) sezonunda daha düşük bulunması, çevrede meydana gelen sıcaklık düşmelerine poikloterm canlıların metabolik faaliyetlerini minimuma indirme olarak tanımlanan (Hibermasyon) biyolojik bir uyumdur. Çünkü yağlanma periyodu *An.sacharovi* için sıcaklık koşullarının uygun olmadığı kış aylarını kapsamaktadır (36). Bu nedenle kış aylarında bu tür canlılar enerji ihtiyaçlarını karşılamak için adipoz dokularında yağ birikimi yaparak ortama adaptasyon gösterirler.

Ayrıca insektisitlerin ve özellikle Organoklorlu gruba ait olanların adipoz dokuda birikmeleri nedeniyle bu tür ksenobiyotiklerin enzimlerle olan etkileşimi sınırlanmış olacağından göreceli olarak yağlanmış sezonda aktivite düşmesine neden olabileceğini düşünmekte olup bu konuda yapılan benzer çalışmalarla da paralellik göstermektedir (46).

Hassasiyet test sonuçlarına göre yaptığımız hassas ve dirençli gruplandırması ile aynı örneklerde 3 enzim için ölçtüğümüz aktivite oranları arasında uyumun nasıl olduğunun anlaşılması için yaptığımız Diskriminant analizinde; AChE enzimi için %76,6, GST enzimi için %74.1 ve Genel esteraz enzimi için de %62.2 gibi oldukça yüksek bir uyumluluk tespit edildi.

Günümüzde başarılı bir şekilde kullanılan ve değişik çalışmalarla güvenilir olduğu kabul edilen hassasiyet testinin sonuçları ile enzim aktiviteleri arasında başarılı bir uyum bulmamıza rağmen bu uyumun %100 olmaması; Enzim aktivitelerini etkileyen genetik (direnç gen ekspresyonu ile dirençle ilgili genin frekansı) ve non-genetik (yaş mevsimsel durum, yumurta geliştirip geliştirmemiş olması ve beslenme durumu gibi). Faktörlerin çok çeşitli olmasına, insektisit ve benzeri kimyasalları tanıyarak bağliyan reseptör proteinlerin yapısal genler üzerindeki indüksiyonu, İnsektisit alımında rol oynayan kitinin yapısına bağlıdır. Ayrıca heterozigot bireylerin gen ekspresyonu bakımından bireysel farklılıklar göstermesi nedeniyle, enzim aktivitesinin homozigot hassaslar ile homozigot dirençliler arasında kalması muhtemeldir. Dolayısıyla heterozigotlar bazen dirençli, bazen hassas bireylere benzer aktiviteye sahip olabilir. Bu benzerlik iki test arasındaki farkı, diskriminant analiz sonucuna yansıtmaktadır.

Nitekim, hassas ve dirençli örneklerde 3 enzim (Asetilkolin Esteraz, Glutasyon S-Transferaz ve Genel Esteraz) için saptanan aktivitelerin frekans dağılımlarına baktığımızda; hassas ve dirençli grupların, farklı enzim aktivite değerlerinde pik yaptığı, ortalamalarının ise istatistiki olarak farklı ve anlamlı olduğu bulunmuştur. Fakat her iki grubun dağılımlarına baktığımız zaman, belli bir alanda iki grup çakışmaktadır. Bu durum, çakışan bölgeye ait enzim aktivite değerlerinin, ait olduğu her iki gruba ait bireylerin heterozigot olduğunu düşündürmektedir.

İnsektisit uygulamalarının yoğun olduğu Herekli ve Tabaklar lokalitesinden getirilen örneklerde saptanan Asetilkolin Esteraz, Glutasyon S-Transferaz ve Genel Esteraz enzim aktivite değerlerinin en yüksek, insektisit uygulamalarının nispeten az olduğu Menekse ile hiç insektisit baskısı altında bulunmayan koloni örneklerinde düşük olması, insektisit uygulamalarını ve ekilebilir arazilerinde ürün çeşidini gözönüne alarak yaptığımız lokalite seçiminin doğru ve beklentimizle uyumlu olduğunu göstermesi bakımından da önemlidir.

Sonuç olarak diyebiliriz ki, direncin kaynağına bakmaksızın sadece hedef canlının sözkonusu insektisite karşı dirençli olup olmadığı konusunda, araştırmacılara kesin bilgi veren hassasiyet testleri , pratik ve daha ucuz olması nedeniyle enzim aktivite tayini esasına dayanan pahalı ve nispeten daha komplike olan yöntemlere göre daha elverişlidir. Fakat enzim testi yönteminin direnç gelişimi konusunda araştırmacıya kazandırdığı ve direncin populasyondaki yönü (direnç geninin populasyonda hakim duruma gelmesi veya yok olması) konusunda daha ayrıntılı bilgi vermesi nedeniyle periyodik aralıklarla hassasiyet test yöntemi ile birlikte kullanılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Ayrıca fizyolojik direnç konusunun daha iyi anlaşılabilmesi için, dirençle ilgili gen tespitine yönelik moleküler teknikler ve insektisit alımını azaltan kitin yapısı ile reseptör proteinler ve reseptör affinitesi konusunda yapılacak araştırmalara ihtiyaç göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Aldridge WN: Serum esterases. **Biochem J.** 1953, 53:110.
2. Bradley GH, Godwin MH & Stone A: Entomological techniques as applied to Anophelines. in Malariology: Saunders Philadelphia, Pennsylvania, 1949.
3. Brown AWA: Insecticide Resistance in Mosquitoes. **J Am Mosq Cont Assoc.** 1986, 2(2): 123-137.
4. Brown TM: Improved Detection of Insecticide Resistance. **Ann Rev Entomol.** 1987, 32: 145-162.
5. Bruce J, Morrissey JJ & Leblanc GA: The genetics of Xenobiotic Metabolism. in Drosophila. **Insect Biochem.** 1986, 17(5): 731-738.
6. Chasseaud LF: The role of GST in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agent. **Adv Cancer Res.** 1969, 29:175-274.
7. Clark AG & Shamaan NA: Evidence that DDT - Dehydrochlorinase from the house fly is a Glutathione. S. Transferase. **Pest Biochem & Physiol.** 1984, 22: 249-261.
8. Clements AN: The Physiology of mosquitoes. Pergamon Press, Oxford England, 1963, p:393.
9. Corbett JR: The Biochemical Mode of Action of Pesticides. Academic Press, London, 1974, p: 140-147.
10. Curtis TJ: Status of mosquito and fly insecticide susceptibility in Turkey. **Mosq News.** 1962, 22:142-148.

11. Curtis TJ: Status of mosquito and Fly. insecticide susceptibility in Turkey. **Mosquito News.** 1965, 22 (2):143-146
12. Dauterman C: The role of hydrolysis in insecticide metabolism and the toxicological significance of the metabolites. **J Clin Toxicol.** 1983, 19:623.
13. Dawidson G & Zahar AR: The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. **Bulletin of WHO.** 1973, 49: 475-483.
14. Dewonshire AL & Moores GD: Different forms of insensitive Acetylcholin esterase in Insecticide resistant house Flies. **Pest Biochem & Physiol.** 1984, 78:163-171.
15. Dökmeci İ: Toxikoloji. Trakya Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne, 1988, p: 50-68.
16. Edwards DR, Milburn P & Hutson DH . **Pestic Sci.** 1987, 21:21.
17. Elliot M: The Pyrethroids. **Pestic Sci.** 1989, 27: 338-351.
18. Ellman GL, Courtney KD, Andres V & Foatherstone RM: A new and rapid calorimetric determination of acetylcholin esterase activity. **Biochem Pharmacol.** 1961, 7:88.
19. Englehard N, Prchal K & Nenner M. **Angew Chem Int Ed Engl.** 1967, 6:615-626.
20. French-Constant RH & Bonning BC: Rapid microtitre plate test distinguishes insecticide resistant acetylcholinesterase genotypes in the mosquitoes. **Med & Vet Entomol.** 1989, 3: 9-16.

21. Georghiou GP: The evolution of resistance to pesticides. **Ann Rev Ecol Syst.** 1972, 3:133.
22. Georghiou GP & Pasteur N: Organophosphate resistance and esterase Pattern in a natural population of the southern house mosquito from California. **J Eco Ent.** 1980, 73(4) :489-492.
23. Gökberk C: *Anopheles sachrovi* in Turkey. **Mosq News.** 1961, 21:101-102.
24. Grant DF, Bender DM & Bruce DM: Quantitative kinetic assays for Glutathione S.-Transferase and General esterase in individual mosquitoes using an EIA reader. **Insect Biochem.** 1989, 19(8): 741-751.
25. Grant DF & Matsumura F: Glutathione S-Transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. **Pest Biochem & Physiol.** 1989, 33:132-143.
26. Hellenbrand K & Krupka RM. **Biochemistry** . 1970, 9: 4665-4672
27. Hemingway J, Malcolm CA, Kisson KE, Boddington RG, Curtis CF & Hill N : The biochemistry of insecticide Resistance in *Anopheles sacharovi* comparative studies with a range of insecticide susceptible and resistant *Anopheles* and *Culex* species. **Pest Biochem & Physiol.** 1983, 24:68-76.
28. Hemingway J & Georghiou GP: Baseline esterase levels for *Anopheline* and *Culicine*. **Mosquitoes News.** 1984, p: 33-35.
29. Hemingway J & Smith : Field and laboratory detection of the altered acetylcholin esterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes. **Bull Ent Res.** 1986, 76:559-565.

30. Hemingway J, Small GJ, Monro A, Sawyer BV & Kasap H: Insecticide resistance gene Frequencies in *Anopheles sacharovi* populations of the Çukurova plain, Adana Province, Turkey. **Med & Vet Entomol.** 1992, 6: 312-348.
31. Ishaaya I: Insect detoxifying enzymes; Their importance in pesticide synergism and Resistance. **Arch Insect Biochem & Physiol .** 1993, 22: 263-276.
32. İmre Z: Toksikoloji Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Ecz Fak Yayın No: 53, İstanbul, 1988.
33. Kao LR, Motoyama N & Dauterman WC: Studies on hydrolases in various House Fly strains and their role in Malathion Resistance. **Pest Biochemie & Physiol.** 1984, 22:86-92.
34. Kasap M, Şişli N: Ankara yöresinde *An.maculipennis* kompleksinin (Diptera:Culicidae) DDT %4.0 , DLN %0.8 ve Mal. %5.0 İnektisitlerine karşı gösterdikleri dirençlilik. **Türk Parazitoloji Dergisi.** 1979, 11:17-25.
35. Kasap H, Kasap M, Mimiöğlu MM & Aktan F: Çukurova ve çevresinde sivrisinek ve malarya üzerinde araştırmalar. **Doğa Bil Derg.** 1981, Tıp 5: 141-150
36. Kasap H, Kasap M, Mimiöğlu M & Aktan F: *Anopheles sacharovi* erginlerinin Adana yöresinde kışlama durumu. **TUBITAK-TAG VII B1.** Kong Teb 1983, 325-330.
37. Kasap M, Kasap H, & Mimiöğlu MM: Çukurova bölgesinde *An. sacharovi* erginlerinin çeşitli inektisitlere karşı gösterdikleri direnç. **Doğa Bil Derg.** (Seri C) 1983, 7(3): 256-260.
38. Kasap M, Kasap H, Alptekin D & Demirhan O: *Anopheles sacharovi* de beslenme ve fizyolojik yaş. **ÇÜ Tıp Fak Derg.** 1989, Sayı 4:581-589.

39. Kasap M: Insektisitler ve vektör kontrolünde kullanılmaları. VI Ulusal Paraz Kong Özel sayı , 1989, 13(2). 209-226.

40. Kasap H, Kasap M, Akbaba M, Alptekin D, Demirhan O, Lüleyap Ü & Pazarbaşı: A: Residual efficacy of Primiphos methyl (Actellic) an *Anopheles sacharovi* in Çukurova Turkey. **J Am Mosq Cont Assoc.** 1992, 8 (1): 47-51.

41. Kasap H, Kasap M, Akbaba M, Alptekin D, Demirhan O, Lüleyap Ü, Pazarbaşı A, Akdur R & Wade J: History of the use of adulticides in malaria control in Turkey with reference to the detection of resistance to some insecticides and management of malaria incidence to acceptable low levels . Iranian Congress of Malaria. Zahedan. 22-28 February 1992.

42. Kayaalp SO: Tibbi Farmakoloji . Cilt 1, 2. Baskı Nüve Matbaası, Ankara, 1981 s: 79-120

43. Krupka RM: **Biochemistry.** 1965, 4: 429-435.

44. Kulkarni AP: The metabolism of Insecticides; The role of Monooxygenase Enzymes. **Ann Rev Pharmacol & Toxicol.** 1984. 24:19-42.

45. Lowry OH, Rosebrough NT, Farr AL & Kendall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 1951, 193:265.

46. Lüleyap Ü: Sıtma vektörü *Anopheles sacharovi* erginlerinde ATPaz aktivitesi ve sivrisinek mücadelesinde kullanılan Pirimiphos methyl'in bu aktiviteye etkisi. **Master Tezi.** Çukurova Üniversitesi. Adana 1992.

47. Meister A & Anderson ME: "Glutathione". **Ann Rev Biochem.** 1983, 52: 711-760.

48. Neal RA: Metabolism of toxic substances. 2nd Ed Mc Millan Publishing, New York, 1982, p:56-69.
49. Oppenoorth FJ & Van Andersen K: Allelic genes in the house fly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. **Science**. 1960, 132:298.
50. Oppenoorth FJ & Welling W: Biochemistry and Physiology of resistance in insecticide resistance. Plenum, New-York, 1976, p:507.
51. Orrenius S & Moldeus P: The multiple roles of Glutathione in drug metabolism. **Trends Pharmacol Sci**. 1984, 5: 432-435.
52. Ottea JA & Plapp FW: Glutathione S-Transferase in the house fly Biochemical and Genetic changes Associated with induction and Insecticide Resistance. **Pest Biochem & Physiol**. 1984, 22:203-208.
53. Plapp FW: Biochemical genetics of insecticide resistance. **Ann Rev Entomol**. 1976, 1:179.
54. Plapp FW & Wang TC: Genetics of metabolic resistance to insecticides in the house fly: Evidence for the role of a major regulatory gene. **J Chin Entomol**. 1982, 1:11.
55. Plapp FW: The genetic basis of Insecticide Resistance in the house fly. **Pest Biochem & Physiol**. 1984, 22:194-201.
56. Ramsdale CD: Insecticide resistance in the Anopheles of Turkey. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**. 1975, 69(2): 226-233.
57. Ramsdale CD: Some aspects of epidemiology of resurgent malaria in Turkey. **Trans Roy Soc Med & Hyg**. 1978, 72: 6.

58. Ramsdale C D, Herath PRJ & Davidson G: Recent developments of insecticide resistance in some Turkish Anophelinaes. **J Trop Med & Hyg.** 1980, 83:11-19.
59. Roberts JR: Progress in Pesticide Biochemistry. John Wiley and Sons, New York, 1981,.
60. Saunders BD & Trapp RG: Basic & Clinical Biostatistic. Appleton & Lange, USA, 1994, p: 125-143.
61. Smitsaert HR: Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. **Science.** 1964, 113-129.
62. Smitsaert HR, Voerman S, Oostenbrugge L & Renooy N: Acetylcholin esterase of organophosphate susceptible and resistant spider mites. **J Agric Food Chem.** 1970, 18:66.
63. Tanaka KN & Nakajimo M : Metabolism of lindane in house flies. **Pest Biochem & Physiol.** 1976, 6:392.
64. Tanaka KN & Nakajimo M & Kurihara N: The mechanism of resistance to lindane in the third strain of housefly. **Pest Biochem & Physiol.** 1981, 16:149.
65. Thorsten A: Enzymatic conjugation of Epoxides with Glutathione. **J Bio Chem.** 1973, 248 (10): 3702-3707.
66. Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Adana İli Bitki Koruma Şube Müdürlüğü. 1995 yılı çalışma raporu. ADANA, 1995 , s:1-153.
67. Ünsal U, Eren N & Benli D: Sıtma epidemiyolojisi, Hacettepe Univ. Yayın No: 25 Ankara, 1982.
68. Whartin RH & Roulsten WJ: Resistance of tick to chemicals. **Ann Rew Entomol.** 1970, 15:381.

69. WHO : Manual on practical entomology in malaria. c.I-II Geneva., 1975.
70. WHO: Safe uses of Pesticides. Tec Rep Ser 634, Geneva, 1979.
71. WHO: Biological control of vectors disease. Tech Rep Ser, 679 Geneva, 1982.
72. WHO: Chemistry and specifications of Pesticides Tech Rep Ser, 699, Geneva, 1984.
73. WHO: Resistance of vectors and reservoirs of disease to Pesticides. Tech Rep Ser,737. Geneva, 1986.
74. WHO: Urban vector and pest control. Tech Rep Ser , 767, Geneva, 1988.
75. Wilson IB: In. Drugs affecting peripheral nervus system (A. Burger ed.) . New York, 1967. p:381-397.
76. Wilson IB: In "Cholinergic ligand interactions" . Academic Press, New York,1971, p: 1-18
77. Van Asperen K & Oppenoorth FJ: Organophosphate resistance and esterase activity in house flies . **Entomol Exp Appl.** 1959, 2: 48.
78. Vural N: Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Ecz Fak Yayın No: 56, Ankara, 1984.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ Ecz Fakültesi
Toksikoloji Araştırma Merkezi

ÖZGEÇMİŞ

1961 yılında Mersin'de doğdum. 1972 yılında Mersin İleri İlk Okulu'ndan, 1977 yılında Mersin Tevfik Sırrı Gür Lisesi'nden mezun oldum. 1978-1981 yılları arasında Erlangen (ALMANYA) Aleksander Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümünde öğrenim yaptım. 1983 yılında Türkiye'ye dönüp aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim. 1987 yılı Temmuz ayında Lisans Öğrenimimi tamamlayıp, 1988 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. 1992 yılında Bilim uzmanlığını almış olup halen aynı Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

Evli ve iki çocuk babasıyım.