

**GEMİFLOKSASİNİN *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA:  
PYRALIDAE)'NİN BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE BİYOKİMYASAL  
PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

**Pınar HIZ**

**Bülent Ecevit Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalında  
Yüksek Lisans Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

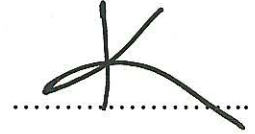
**ZONGULDAK**

**Şubat 2013**

**KABUL:**

Pınar HIZ tarafından hazırlanan "GEMİFLOKSASİNİN *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)'NİN BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİSİ" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 13/02/2013

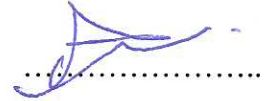
Başkan: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL (BEÜ)



Üye : Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL (BEÜ)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Tolga ACUN (BEÜ)



**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. .../.../2013



Prof. Dr. Özden ÖZEL GÜVEN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*

  
Pınar HIZ

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### GEMİFLOKSASİNİN *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)'NİN BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİSİ

Pınar HIZ

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Şubat 2013, 51 sayfa

Fluorokinolon sınıfından bir antibiyotik olan gemifloksasin, bakterilerin çoğalması için gerekli olan DNA giraz ve topoizomeras IV enzimlerini inhibe ederek DNA sentezini engellemek suretiyle etki etmektedir. *Galleria mellonella* L. Gemifloksasin (mesilat tuzu) içeren yapay besinler ile beslenerek böceğin biyolojik özellikleri (yaşama, gelişme, eşey oranı, ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu, yumurta verimi, açılma oranı) ve son evre larvalarının orta bağırsağında oksidatif stresin önemli indikatörleri lipid peroksidasyonu ürünü malondialdehid (MDA) ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil (PCO) miktarları ile detoksifikasyon enzimi glutatyon S-transferaz (GST), aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı.

Gemifloksasinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler 7. evreye ulaşan larva oranını, pup ve ergin olma oranını kontrol besine göre önemli derecede düşürmüştür.

## ÖZET (devam ediyor)

Denenen en yüksek gemifloksasin konsantrasyonu 7. evreye, pup ve ergin evrelerine ulaşmak için gereken süreyi önemli derecede uzatmıştır. Larvaların ergin evreye ulaşma süreleri kontrol grubuna göre bu besinde ortalama 7 gün gecikmiştir. Antibiyotiğin en yüksek miktarı (% 1,0) kontrole göre orta bağırsak MDA miktarını yaklaşık 3 katı oranında önemli derecede yükseltmiştir. Bu antibiyotik tüm konsantrasyonlarda orta bağırsak protein karbonil miktarını artırmıştır. Gemifloksasinin % 1,0'lik konsantrasyonu orta bağırsak GST aktivitesini 2,13'den 4,78  $\mu\text{mol/mg protein/dk}$ 'ya önemli derecede artırmıştır. Gemifloksasin yumurta verimini de önemli derecede düşürmüştür. Kontrol besini ile yetiştirilen dişiler günde 134,46 yumurta bıraktıkları halde gemifloksasinin yüksek miktarları yumurta sayısını sırasıyla 26,75 and 53,5'e düşürmüştür. Böceğin orta bağırsak oksidatif tepkisi ve detoksifikasyon kapasitesi gemifloksasin konsantrasyonlarına bağımlı bir şekilde değişmiştir. Bu oksidatif değişimler en azından böceğin larvalarının biyolojik özelliğindeki olumsuz etkilerden sorumlu olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Gemifloksasin, yaşama, orta bağırsak, Malondialdehid, protein karbonil, Glutatyon S-transferaz, *Galleria mellonella*

**Bilim Kodu:** 401.02.01

## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

### **THE EFFECT OF GEMIFLOXACIN ON SOME BIOLOGICAL TRAITS AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

**Pınar HIZ**

**Bülent Ecevit University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology**

**Thesis Advisor: Prof. Kemal BÜYÜKGÜZEL**

**February 2013, 51 pages**

Gemifloxacin is a fluoroquinolone antibiotic that is bactericidal and its mode of action depends on blocking of bacterial DNA replication by binding itself to the enzymes called DNA gyrase (topoisomerase II) and topoisomerase IV, which allows the untwisting required to replicate one DNA double helix into two. The effect of gemifloxacin (mesylate salt), on biological traits (survivorship, development, sex ratio, male and female adult longevity, fecundity and hatchability) and on important oxidative stress indicators; lipid peroxidation product, malondialdehyde (MDA) and protein oxidation products, protein carbonyl (PCO) contents and a detoxification enzyme, glutathione S-transferase (GST) activity in the midgut of 7th-instar larvae (last larval stage) of greater wax moth *Galleria mellonella* (L.) were also determined. The diets containing tested concentrations of gemifloxacin significantly decreased survivorship in seventh instar, pupal and adult stages in comparison to control diet. The highest concentration of gemifloxacin significantly prolonged the developmental time period of seventh instars, pupae and adults.

## **ABSTRACT (continued)**

On this diet, the development of larvae to adult stage was delayed by 7 days relative to control larvae. The highest concentration of gemifloxacin (1.0%) significantly increased midgut MDA content by 3-fold. This antibiotic at all tested concentrations increased midgut PCO content. Gemifloxacin at 1.0% significantly increased midgut GST activity from 2.13 to 4.78  $\mu\text{mol/mg protein/min}$  respectively. Gemifloxacin also significantly decreased egg number. The females reared from control diet produced 134.46 per day, whereas high concentrations of gemifloxacin decreased the egg number to 26.75 and 53.5. Oxidative response and detoxification capacity of midgut vary with the antibiotic concentrations. The negative effects of antibiotic on biological traits of the insect, might be a result of these oxidative alterations in midgut and hemolymph.

**Keywords:** Gemifloxacin, survivorship, midgut, Malondialdehyde, protein carbonyl, Glutathione S-transferase, *Galleria mellonella*

**Science Code:** 401.02.01

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada araştırma sũresi boyunca ilgi, ȃneri ve yardımlarını esirgemeyen danıőman hocam, Sayın Prof. Dr. Kemal BũYũKGũZEL'e ayrıca çalıőmamın deneysel ve yazma aőamasında moral desteği ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ender BũYũKGũZEL'e teőekkũrlerimi sunarım.

Yũksek lisans tez aőaması çalıőmalarında ve tez yazım aőamasında bana yardımcı olan ȃęr. Gȃr. Meltem ERDEM'e teőekkũr ederim. Gemifloksasini hediye eden Abdi İbrahim İlaç firmasına, çalıőmamın deneysel ve yazma aőamasında moral desteği ve yardımlarını esirgemeyen aileme ve yũksek lisans arkadaőlarıma teőekkũrlerimi bir borç bilirim. Bu tez alıőması Bũlent Ecevit Őniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatȃrlũęũ tarafından desteklenmiőtir (PROJE NO: 2011-10-06-05).





## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
BÖLÜM 1 GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 MATERYAL VE METOT .....	11
2.1 BÖCEKLERİN YETİŞTİRİLMESİ.....	11
2.2 LARVALARIN ELDE EDİLMESİ .....	12
2.3 GEMİFLOKSASİNİN İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ .....	12
2.4 YAŞAMA, GELİŞME, EŞEY ORANI İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ .....	13
2.5 ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞU İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ .....	13
2.6 YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI İLE İLGİLİ DENEYLER.....	13
2.7 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ .....	14
2.7.1 Orta Bağırsak İzolasyonu .....	14
2.7.2 MDA Analizi.....	15
2.7.3 Protein Karbonil Analizi .....	15
2.7.4 GST Analizi .....	16
2.8 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....	17

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3 ARAŞTIRMA BULGULARI.....	19
3.1 GEMİFLOKSASİNİN YAŞAMA, GELİŞME VE EŞEY ORANINA ETKİSİ.....	19
3.2 GEMİFLOKSASİNİN ÖMÜR UZUNLUĞU, YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ETKİSİ.....	22
3.3 GEMİFLOKSASİNİN MDA, PROTEİN KARBONİL VE GST AKTİVİTESİNE ETKİSİ .....	25
BÖLÜM 4 TARTIŞMA .....	29
BÖLÜM 5 SONUÇ.....	37
KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	51

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	Gemifloksasin mesilatın kimyasal yapısı. ....	6
1.2	Doymamış yağ asitlerinden MDA oluşumunun şematik gösterimi.....	7



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
3.1	Gemifloksasinin <i>G. mellonella</i> larvalarının yaşama, gelişme ve eşey oranına etkisi ....	21
3.2	Gemifloksasinin <i>G. mellonella</i> larvalarının ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranına etkisi. ....	24
3.3	Gemifloksasinin <i>G. mellonella</i> larvalarının ortabağırsak MDA, protein karbonil miktarı ve GST aktivitesine etkisi. ....	27



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad Derece
Cm	: Santimetre
Dk	: Dakika
g	: Gram
M	: Molar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
nmol/mg protein	: Nanomol/Miligram Protein
sn	: Saniye
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
$\mu\text{mol/mg protein/dk}$	: Mikromol/Miligram Protein/Dakika

## KISALTMALAR

ANOVA	: Analysis of Variance
APOX	: Askorbat Peroksidaz
BHT	: Butillenmiş Hidroksi Toluen
BSA	: Sığır Serum Albumin
CAT	: Katalaz
CDNB	: 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen
DNPH	: 2,4- Dinitrofenilhidrazin
DTT	: Ditiyotreitol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Hidrojen Peroksit



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

LSD	: Least Significant Difference
MDA	: Malondialdehid
PCO	: Protein Karbonil
PMSF	: Fenilmetilsülfonil Florür
ROT	: Reaktif Oksijen Türevleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for The Social Sciences
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TCA	: Triklorasetik Asit
$\chi^2$	: Ki Kare (Chi Square)

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Tarımsal bitkilerin kök, gövde yapraklarında hasar oluşturarak dolaylı ekonomik kayıba ya da bu bitkilerin ürünlerine zarar vererek doğrudan ürün miktarı ve kalitesinde azalmaya neden olan böcekler ile etkin ve çevreye duyarlı yeni kimyasal mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi için bu böceklerin fizyoloji ve biyokimyasalarının yanında beslenme ekolojilerinin detaylı olarak bilinmesi gerekmektedir. Ayrıca böceklerin gelişim evrelerindeki ve hatta farklı dokularındaki kimyasal bileşimlerin tespit edilmesi böceklerin besinsel ihtiyaçlarının belirlenmesi ve yeni kimyasal yapısı bilinen besinlerin geliştirilmesi veya mevcut besinlerin bileşimlerinin yeniden gözden geçirilmesi açısından önem arz etmektedir.

Üzerinde çalışılacak böceklerin doğal ortamlarından toplanması veya labortauvar şartlarında doğal ortamlarının sağlanması çok zaman mümkün olmamaktadır veya bazı böceklerin doğal ortamları dışında laboratuvar şartlarına adaptasyonunda başarı sağlanamamaktadır. Bu sebeplerden dolayı böceklerin laboratuvar ortamında sentetik besinler ile yetiştirilmesi kimyasal mücadelede veya kimyasal mücadelenin bir biyolojik kontrol ajanı ile birlikte yapıldığı entegre zararlı mücadele yöntemlerinde yeni kimyasalların denenmesi için hem pratik olması hem de araştırmaların sürekliliği açısından önem taşımaktadır.

Kimyasal yapısı tamamen veya kısmen belirlenen sentetik besinler kullanılarak laboratuvar ortamında yürütülen böcek yetiştirme ve beslenme çalışmaları esnasında mikrobiyal kontaminasyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Bunun sebebi bu besinlerin kimyasal ve besinsel içeriğinin zenginliğinden dolayı bakteriyel ve fungal ajanların gelişmesi için oldukça uygun olmasıdır. Yapay besinler ile böceklerin yetiştirilmesi sırasında böcekler bazı entomopatojen virüsler tarafından kontamine edilmektedirler (Getzin 1962). Küf kontaminasyonu gözle görülebildiği halde bakteriyel ve viral kontaminasyonlar gözlenememekte ve genellikle böcek larvalarının gelişiminin gerilemesinden veya ileri evrelerde sindirim kanalının boşalarak larvaların kurduğunun belirlenmesi ile anlaşılmaktadır.

Eski yıllardan itibaren Lepidoptera takımına ait bazı böceklerin ve diğer takımlara ait böceklerin laboratuvar şartlarında yapay besinler ile yetiştirilmesi çalışmaları sırasında meydana gelebilecek özellikle küf bulaşmasının önlenmesi amacıyla geleneksel bazı küf inhibitörleri kullanılmıştır (Bottger 1942, Vanderzant and Reiser 1956, David and Gardiner 1965, Raulston and Lingren 1969, Shaver and Raulston 1971, Singh 1977). Bu çalışmalara dayanarak daha sonra diğer antimikrobiyal kimyasallar olan antibakteriyel, antifungal, antiviral ve hatta antiprotozoal antibiyotikler denenmiştir. Kaba besinler ile yapılan böcek beslenmelerinde, besinlere ilave edilen bazı geleneksel küf inhibitörleri (örneğin % 10'luk formaldehid, Metil parahidroksibenzoat, Potasyum sorbat) dışında ülkemizde ilk defa Yazgan (1981) tarafından parazitik hymenopter endoparazitoid bir tür olan *Pimpla turionellae* L. için geliştirilen kimyasal yapısı bilinen meridik bir besine besin bileşenleri yanında antibiyotik de ilave edilmiştir. Bu şekilde muhtemel kontaminasyonlara karşı önlem alınarak hem besin maddelerinin etkin kullanılarak israfa yol açılmaması, larvaların gelişiminde muhtemel kontaminasyonların görülemeyen etkilerinin ortadan kaldırılması hem de zaman tasarrufu ve araştırmacı emeğinin korunması sağlanmıştır.

Fizyolojik araştırmalar için doğadan her mevsimde toplama imkanı bulunmayan böceklerin laboratuvar şartlarında yapay besinler ile yetiştirilmesi önemli bir fırsattır. Bu amaç için kullanılan kimyasal yapısı bilinen sentetik besinlerin bileşimini oluşturan amino asit, lipid (doymuş ve doymamış yağ asitleri, kolesterol), karbohidrat, inorganik tuzlar, RNA oldukça pahalı olup bu önemli bileşenleri içeren besinlerin manuplasyon hatası veya özensizlikten kaynaklanan muhtemel kontaminasyonlardan dolayı tekrar tekrar hazırlanarak kullanılması israfa yol açmaktadır (Yazgan 1972, 1981).

Haydak (1936) ilk defa *Galleria mellonella* L.'yi laboratuvarında yetiştirmek amacıyla yapay bir besin ortamı geliştirmiş ve bu besinin bileşimlerini değiştirerek böceğin bazı besinsel ihtiyaçlarını (Haydak 1941) belirlemeye çalışmıştır. Daha sonra bu zararlı türün kısa sürede daha verimli bir şekilde kitle üretimi yapılabilmesi için diğer bazı yapay besin karışımları geliştirilmiştir (Waterhouse 1959, Bronskill 1961, Dutky et al. 1962, Ajanta et al. 2008). Benzer yapay besin ortamları ve beslenme teknikleri ekonomik olarak önemli diğer lepidopter türlerin (Ignoffo 1963, Laing and Hagen 1970) laboratuvar şartlarında yetiştirilmesinde kullanılmış olup bu konudaki beslenme çalışmaları halen büyük bir hızla devam etmektedir (Al-Izzi et al. 1987, Keena et al. 1995, Lopez et al. 1996, Marti et al. 2008, Masoud et al. 2010, Assemi et al. 2012). Son zamanlarda böceklerin laboratuvar şartlarında yetiştirilmesine

yönelik beslenmeleri ile ilgili tekniklerin ve yapay besinlerin geliştirilmesi teknolojik düzeyde ve büyük ölçekli çalışmalardır (Cohen 2003).

*G. mellonella* L. larvaları bal arısı kovanlarında bal peteği, mum ve bal gibi kovan ürünleri ile beslenerek önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Charriere and Imdorf 1997). Diğer taraftan *G. mellonella* larvalarını laboratuvar şartlarında yetiştirmek için bu çalışmada kullanılan kimyasal yapısı bilinmeyen kaba besin ve diğer benzer besinlerin bileşimindeki kepek, petek, buğday kırıntısı, kuru toz maya ve süt tozu gibi bileşenler (Haydak 1941, Waterhouse 1959, Bronskill 1961, Dutky et al. 1962) önemli bakteriyel ve fungal kontaminasyon kaynaklarıdır. Bu böceği laboratuvar ortamında yetiştirirken gerek besinlerdeki mikrobiyal kontaminasyonu önlemek gerekse biyolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve ekolojik araştırmalar için mikroorganizmadan arındırılmış böcekler yetiştirmek amacıyla bazı antibakteriyel antibiyotikler kullanılmıştır (Jarosz 1981, 1989, Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009). *G. mellonella* üzerinde çeşitli antibiyotiklerin etkisi denenmiştir. Ancak bu antibiyotiklerin böceğin biyolojik özelliklerini etkileyecek düzeyde orta bağırsakta ve hemolenfte oksidatif strese sebep olduğu ve bu strese tepki olarak antioksidatif savunma mekanizmasının zayıfladığını gösteren araştırmalar azdır (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009). Önceki çalışmalar çevre kirliliğine neden olan bazı kimyasalların *G. mellonella* ve Lepidoptera takımına ait diğer bazı böceklerin hemolenfide oksidatif ve antioksidatif cevap düzeyine etkisini göstermiştir (Slepneva et al. 1999, Glupov et al. 2001, 2003, Lozinskaya et. al 2004, Aucoin et al. 2005). Bazı çalışmalar ise ksenobiyotiklerin *G. mellonella*'nın ortabağırsağındaki antioksidatif savunma mekanizmasına etkileri üzerinde durmuşlardır (Dubovskiy et al. 2005, 2008).

Doğal veya kimyasal yapısı bilinen sentetik besinlere mikrobiyal kontaminasyonları önlemek amacıyla ilave edilen antimikrobal maddelerin kontaminasyonu önleme yanında böceklerin yaşama parametrelerinde ve fizyolojik özelliklerinde olumsuz etkilere sahip olduğu da belirlenmiştir (Singh and House 1970, 1970a, 1970b, Yazgan 1972, Greiner 1977, Thompson 1986, Xie et al. 1986, Rotundo et al. 1988, Büyükgüzel ve Yazgan 1996, Büyükgüzel and Yazgan 1999, Büyükgüzel 2001a,b). Bu sebeple kullanılacak antibiyotiklerin besinlerdeki böceklere etkisiz ancak kontaminasyonları önleyen konsntrasyonlarının hassas olarak belirlenmesi gerekmektedir. Et ve süt verimini artırmak amacıyla besi hayvancılığında kullanılan antibiyotiklerin etkilerine (Patrick and Schaible 1980, Ensminger et al. 1990, Govindan et al. 1990) benzer bir şekilde böcek beslenmesi amacıyla kullanılan

antibiyotiklerin çok düşük konsantrasyonlarda böceklerin yaşama oranı ve gelişme süresi üzerinde olumlu etkiler yaptığı da belirlenmiştir (Büyükgüzel 2001a,b). Diğer taraftan bu antibiyotikler ipek böcekçiliği yetiştiriciliğinde kullanıldığında ipek proteini miktarı üzerinde olumlu etki yaptığı gibi (Murthy et al. 1954, Deecher et al. 1989, 1990) böceklerin vücut bileşimleri ve bazı fizyolojik özellikleri üzerinde de olumlu etkiler yaptığı gözlenmiştir (Büyükgüzel 2002, Büyükgüzel and İçen 2004).

Singh and House (1970a) tarafından yapılan kapsamlı bir araştırmada yirmibir farklı antibakteriyel ve antifungal antibiyotiğin özellikle yüksek konsantrasyonlarının entomofaj bir dipter türü olan *Parapinnixa affinis* (= *Agria housei* shewell)'in yaşama oranını düşürdüğü gelişmesini geciktirdiği ortaya çıkarılmıştır. Bazı antifungal antibiyotikler yumurta parazitoidi bazı *Trichogramma* türlerinde yaşama oranı yanında bırakılan yumurtaların sayısını ve açılma oranını da düşürmüştür (Xie et al. 1986, Grenier and Liu 1990, 1991). Yazgan (1981) tarafından geliştirilen kimyasal yapısı bilinen meridik bir sentetik besine ilave edilen, içlerinde geleneksel antifungal maddeleri de içeren, yeni kuşak antibakteriyel ve antigungal antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonlarda Ichneumonid endoparazitoid bir hymenopter tür olan *Pimpla turionellae*'nin tüm gelişme evrelerinde yaşama oranını düşürdüğü ve gelişme süresini uzattığı belirlenmiştir (Büyükgüzel ve Yazgan 1996, Büyükgüzel and Yazgan 1999, Büyükgüzel ve Yazgan 2002).

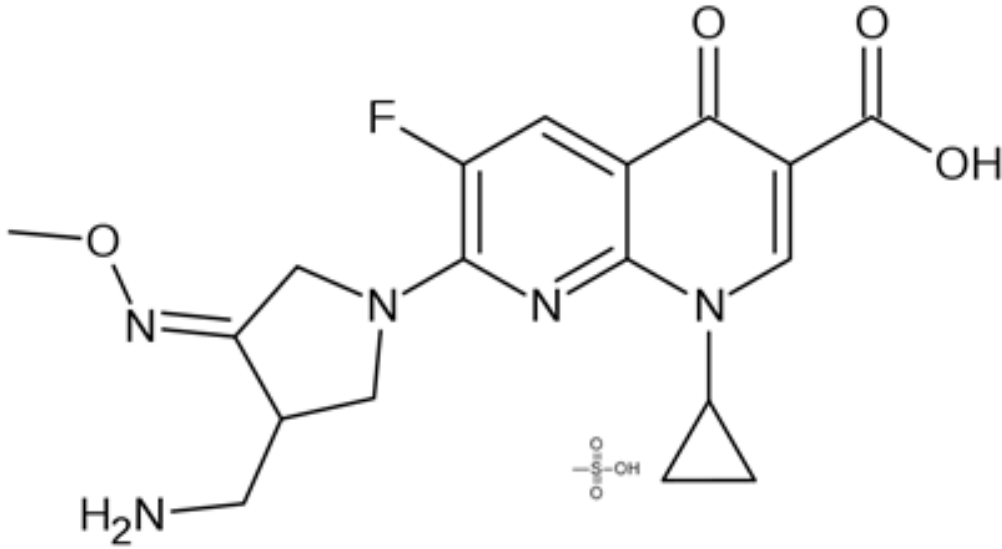
Son zamanlarda Büyükgüzel ve Kalender (2007, 2008, 2009) tarafından *G. mellonella* üzerinde böcek beslenmesinde yapay besinlere çok uzun yıllar antimikrobiyal kontaminasyonları önlemek amacıyla ilave edilen eski kuşak antibiyotikler ile çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalarda denenen penisilin, streptomisin ve flukonazol gibi antimikrobiyal antibiyotiklerin böceğin orta bağırsağında oksidatif stres göstergesi olan malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin miktarını ve antioksidan enzimlerden süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini artırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda aynı zamanda antibiyotiklerin böceğin yaşama ve gelişmesi üzerindeki olumsuz etkilerinin oksidatif stres ve bunun sonucu zayıflayan antioksidan savunma sistemi ile ilişkisi incelenmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkarak Büyükgüzel ve ekibi tarafından son zamanlarda yeni kuşak antiviral (İçen 2003) antibakteriyel (Hamzaoğlu 2012), antihelmintik ve antiprotozoal (Vuran 2012) antibiyotiklerin yapay besinlere ilave edilmesi ile böceğin yaşama, gelişmesi üzerindeki olumsuz etkilerinin orta bağırsak (midgut), yağ doku (fat body)

ve hemolenf gibi çeşitli dokulardaki oksidatif stres ile ilişkili olup olmadığı araştırılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalardan da anlaşılacağı gibi önemli bir ökaryot grubu olan böceklerde oksidan ve antioksidan tepkiye DNA cayraz (giraz) inhibitörlerinin etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Böyle bir çalışma bu alandaki bir boşluğu doldurabileceği gibi bu hususta farklı ökaryot gruplarını da karşılaştırma imkânını sağlayacaktır. Çünkü omurgalılar gibi yüksek organizasyonlu ökaryotik organizmalarda antibakteriyel, antifungal, antiviral antibiyotikler doğrudan veya dolaylı olarak DNA replikasyonunu, transkripsiyonu, protein sentezini ve hücre ara metabolizmasını olumsuz yönde etkilemektedir (Kuhlmann 1996). Diğer taraftan hücre iskeletinin oluşumunu veya sterol biyosentezini engelleyen geleneksel bazı antifungal maddelerin *Lygus hesperus* (Knight)'un biyolojik özellikleri ile erginlerin kuru ağırlığını olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (Alverson and Cohen 2002). RNA sentezi inhibitörü olan rifampisin bir afit türü *Bemisia tabaci* (Gennadius)'nin erginleşme süresini önemli derecede uzatmış ve erginleşen birey sayısını da azaltmıştır (Ruan et al. 2006). Antibiyotiklerin insan dahil omurgalılarda olduğu gibi omurgasızların önemli bir grubu olan böceklerde de benzer etki mekanizmalarına sahip olup olmadıkları net olarak bilinmemektedir.

Böceklerin başta orta bağırsak olmak üzere, hemolenf ve yağ dokusunda fenolik maddeler (taninler, fenolik asit, flavonlar, lignin, gliseollin), kinonlar ve furanokoumarinler (ksantotoksin, izopimpinellin, angelisin) gibi bazı bitki allelokimyasallarının sebep olduğu oksidatif strese karşı enzimatik antioksidatif savunma sistemindeki değişimler detaylı olarak çalışılmıştır (Pritsos et al. 1991, Ahmad 1992, Felton and Summers 1995, Timmermann et al. 1999, Barbehenn and Stannard 2004, Krishnan and Kodrik 2006). Böceklerde sindirimin kanalının orta bölgesinde (orta bağırsak) sindirim enzimleri salgılanarak besinler sindirilir (Sehna and Zitnan, 1996). Lepidoptera takımına ait bazı türlerin larvalarında bazı allelokimyasalların sindirimi ile oluşan reaktif oksijen türlerinin orta bağırsak hücrelerinde oksidatif hasara sebep olduğu ve enzimatik antioksidan savunma sistemini zayıflattığı tespit edilmiştir (Perić-Mataruga et al. 1997, Krishnan and Sehna 2006, Krishnan et al. 2007).

Gemifloksasin fluorokinolon sınıfına dahil bir antibiyotiktir (Şekil 1.1). Bakterisit etkili olup insanların enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Gemifloksasin, bakterilerin çoğalması için gerekli olan DNA cayraz (giraz) ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe eder. Bu yolla DNA sentezini engellemek suretiyle etkisini gösterir (Owens and Ambrose 2005). Bu antibiyotik, *Streptococcus pneumoniae*'de her iki enzim sistemini

terapötik açıdan ilgili ilaç seviyelerinde inhibe etme yeteneğine sahiptir. Gemifloksasin dahil kinolonların etki mekanizması makrolidlerin, beta-laktamların, aminoglikozidlerin veya tetrasiklinlerin etki mekanizmasından farklıdır. Gemifloksasin karaciğer tarafından sınırlı ölçüde metabolize edilir. Başlıca metabolitleri N-asetil gemifloksasin, gemifloksasinin E-izomeri ve gemifloksasinin karbamil glukuronididir. Sitokrom P450 enzimleri gemifloksasin metabolizmasında önemli bir rol oynamazlar ve bu enzimlerin metabolizma aktivitesi gemifloksasin tarafından önemli ölçüde inhibe edilmez (Iannini 2007).

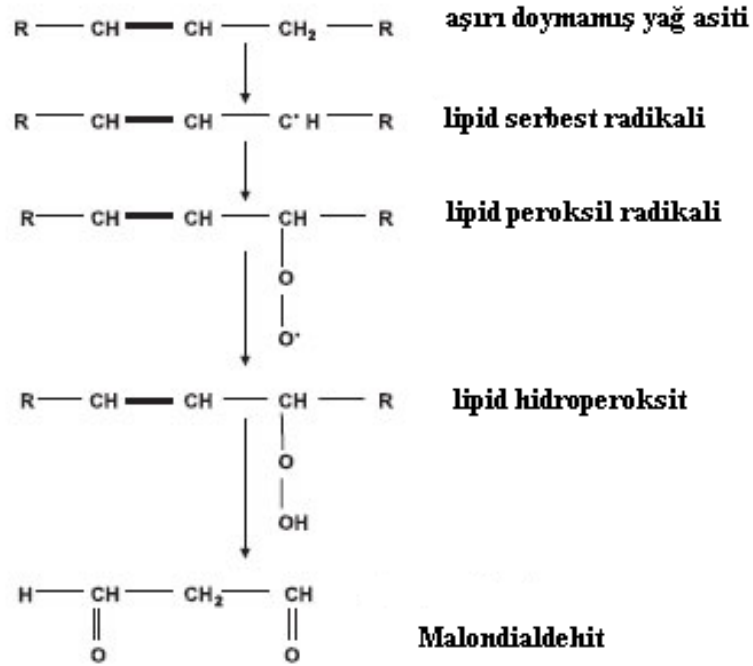


Şekil 1.1 Gemifloksasin mesilatın kimyasal yapısı.

Klinik amaçlı kullanılan antibiyotiklerin zararlı böcekler için insektisit olarak kullanılıp kullanılmayacağı henüz tartışma halindedir. Yeni kuşak antibiyotiklerin önemli bir grubunu oluşturan gemifloksasinin (mesilat tuzu) böceklerdeki etkisi konusunda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Diğer taraftan yapay besinlere ilave edildiğinde besinsel değeri olmayan bir bileşen olarak besin bileşenleri ile etkileşimi hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma insan ve hayvanların enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan yeni kuşak antibakteriyel antibiyotiklerin zararlı böceklerin mücadelesinde insektisit olarak kullanılabilirliğini incelemesi bakımından önemlidir. Diğer taraftan gemifloksasin asıl etkisini bakteriyel DNA sentezini önleyerek gösterdiği için özellikle hedef olmayan insan dahil yüksek organizasyonlu ökaryotik canlılarda benzer etki mekanizmasını göstermesi ihtimali düşüktür. Böyle bir durumda bu antibiyotiklerin asıl etki mekanizmaları dışında başka bir etki mekanizması ile böcekler üzerinde etkili olup olmadığı söz konusu olmaktadır. Bu yüzden bu

çalışmada antibiyotiklerin omurgalılarda reaktif oksijen türleri aracılığıyla lipid peroksidasyonuna ve antioksidan enzim aktivitesinin değişimine sebep olduğu gibi (Miyachi et al. 1986, Vijayalekshmy et al. 1992, Abdrashitosa and Ramanov 2001) böceklerde de oksidatif ve antioksidatif tepki düzeyine etkisinin bulunup bulunmadığı incelenecektir. Bu kinolon antibiyotiğin ikincil bir etki mekanizması olarak oksidatif stres aracılığıyla böceklerin biyolojik özelliklerini ve detoksifikasyon kapasitesini zayıflatabileceği tahmin edilmektedir.

Diğer tüm canlılarda olduğu gibi böcekler uygun olmayan besinsel ve çevresel şartlara uyum gösterebilmeleri için immün sistemleri yanında güçlü antioksidan savunma sistemine ve detoksifikasyon kapasitesine sahiptir. Böylece her ortamda yaşamlarını sürdürebilmeleri için metabolik faaliyetleri sırasında ROT'ların oluşumuna sebep olan toksik ya da zararlı kimyasal maddeleri zararsız hale getirebilmede başarılı olmaktadır (Barbehenn et al. 2003). Güçlü oksidan etkiler karşısında öncelikle hücre zarının bileşimindeki ve diğer hücresel lipidleri ve daha sonra diğer biyomoleküllerin oksidatif olarak yapısının bozulması önemli bir oksidatif stres göstergesidir. Hücresel lipidlerin yapısındaki doymamış ve aşırı doymamış yağ asitleri oksidatif olarak bozularak başlama, çoğalma ve sonlama şeklinde bir seri zincirleme reaksiyonlar aracılığıyla son ürün olarak malondialdehid (MDA) meydana gelir (Cheesman 1993) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Doymamış yağ asitlerinden MDA oluşumunun şematik gösterimi (Grotto et al. 2009).



Lipid peroksidasyonu sırasında ara reaksiyonlarda çeşitli lipid radikalleri meydana gelir. Bu sürecin son aşamalarına doğru oluşan lipid hidroperoksit kararsız olup parçalanma ürünü olarak aldehit türevleri MDA ve 4-hidroksi-2-nonenal oluşur.

Serbest radikallerin etkisine maruz kalan diğer hücrel biyomoleküller ise yapısal ve işlevsel proteinlerdir. Bu proteinler, meydana gelen lipid radikalleri veya son ürünler MDA ve 4-hidroksi-2-nonenal proteinlerin amino grubu ile reaksiyona girerek oksidatif olarak hasara uğramış ve işlevini yitirmiş protein türevleri oluşur. Protein oksidasyonu reaksiyonları lipid peroksidasyonun tersine zincirleme reaksiyonları şeklinde gerçekleşmez. Diğer taraftan lipid peroksidasyonu son ürünleri fosfolipidler ve nükleik asitler ile de reaksiyona girerek bu moleküllerin yapısının bozulmasına yol açar. Böceklerde yapılan çalışmalarda artan lipid peroksidasyonu ile orantılı olarak MDA miktarının yükseldiği tespit edilmiştir (Ahmad et al. 1995, Mano et al. 1995, Krishnan et al. 2009).

Protein moleküllerindeki oksidatif hasarın, lipidlerdeki hasardan daha önemli olduğu bilinmektedir (Reznick and Packer 1994). Çünkü özellikle işlevsel proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif hasar, enzim, hormon gibi proteinlerin rollerini olumsuz yönde etkileyebilir.

Böcekler toksik maddelerin etkisi ile oluşabilecek reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korunmak için güçlü detoksifikasyon kapasitesine ve antioksidan savunma sistemine sahiptir (Ahmad 1992, Felton and Summers 1995, Barbehenn and Stannard 2004, Krishnan and Kodrik 2006). Bu enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST) (Ahmad et al. 1990), askorbat peroksidaz (APOX) (Mathews et al. 1998) ve tiyoredoksin peroksidaz (Missirlis et al. 2003) böceklerin antioksidan savunmasında önemli rol oynamaktadır. Böceklerde ayrıca detoksifikasyondan sorumlu P450 monooksijenazlar, esterazlar ve GST enzimleri bulunmaktadır. GST enzimi farklı ksenobiyotikleri detoksifike etme özelliğine sahip olup geniş bir substrat spesifikliği gösterir (Vontas et al. 2001). Bu enzim ksenobiyotiklerin biotransformasyonunda rol oynayan faz II enzim sisteminin önemli bir enzimidir (Sivori et al. 1997, Sheehan et al. 2001).

Böceklerde özellikle Lepidoptera takımına ait türlerde omurgalıların aksine selenyuma bağımlı GPx (Se-GPx) enzimi oldukça düşük aktivite gösterir. Bu enzim redükte glutatyon hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri konjuge ederek toksik veya zararlı etkilerini ortadan

kaldırır (Ahmad et al. 1989). GPx enzimi SOD ve CAT ile işbirliği halinde serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırır. Ahmad ve Pardini (1990) besinden kaynaklı eksojen radikallere karşı savunma amaçlı ilk olarak SOD enziminin aktivitesinin arttığını belirtmiştir. SOD, süperoksit radikallerini  $H_2O_2$  ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüştürerek ortamdan uzaklaştıran bir enzimdir. Bu dismutasyon reaksiyonu ile oluşan  $H_2O_2$ , CAT enzimi tarafından, su ve oksijene parçalanır. APOX enzimi de CAT enziminin işlevine katkı olarak normal şartlarda CAT tarafından süpürülemez kadar düşük konsantrasyonlardaki  $H_2O_2$ 'i parçalamaktadır (Ahmad et al. 1991, Clavaron-Mathews et al. 1997). Diğer taraftan GST enzimi GPx benzeri aktivitesi (GST-Gpx) sayesinde detoksifikasyon yeteneği yanında antioksidan etki de göstermektedir. GST enzimi ve GST enziminin GPx benzeri aktivitesinin Lepidoptera takımına ait türlerin besinsel toksik maddelere karşı gösterdikleri fizyolojik bir adaptasyon olarak önemli derecede yükseldiği tespit edilmiştir (Perić-Mataruga et al. 1997).

Bu çalışma *G. mellonella* larvalarını beslemek için kullanılan yapay besinlere ilave edilen, bakterilerde DNA cayraz (giraz) ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek DNA sentezini engelleyen fluorokinolon grubu bir antibakteriyel antibiyotik olan gemifloksasinin böceğin 7. evre larvalarının ortabağırsağında lipid peroksidasyon ve protein oksidasyonu düzeyleri ile detoksifikasyon enzimi GST aktivitesine etkisini göstermektedir. Bu çalışmada, ayrıca gemifloksasinin böceğin yaşama oranı, gelişme süresi, eşey oranı, ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı üzerindeki olumsuz etkilerinin orta bağırsakta bu antibiyotik oluşturduğu oksidatif stres ile ilişkisi araştırılmıştır.



## BÖLÜM 2

### MATERYAL VE METOT

#### 2.1 BÖCEKLERİN YETİŞTİRİLMESİ

Yumurtadan yeni çıkmış *G. mellonella* larvaları yapay besinde aseptik olmayan şartlarda beslenerek böcek kültürü oluşturuldu. Böceklerin yetiştirilmesi inkübatörde (Nüve, ES 500)  $28 \pm 2$  °C ve %  $65 \pm 5$  bağıl nemde yapıldı. Deneylerde yumurtadan yeni çıkmış birinci evre larvaları kullanıldı.

*G. mellonella* larvalarını laboratuvar şartlarında yetiştirmek için Bronskill (1961) tarafından geliştirilen yapay besin kullanıldı. Besin, 420 g buğday kepeği, 150 ml süzme bal, 150 ml gliserin (Merck, Darmstadt, Germany), 20 g öğütülmüş koyu renkli eski petek ve 30 ml saf su içermektedir. Besinin bileşenleri gerekli miktarda tartılarak geniş bir kap içerisinde karıştırıldı ve özel bir karıştırıcı ile homojen bir karışım oluşturuldu. Hazırlanan besin bir litrelik cam kavanozların (80x180 mm) yaklaşık 1/3'ne kadar dolduruldu. Kavanozun içine konulacak dişilerin yumurta bırakması ve yeni açılan larvaların beslenmesi için besinin üzerine küçük bir parça bal peteği bırakıldı (Ortel 1995). Bu kavanozların içine 10-15 adet dişi bırakılarak ağızları tel kafes yerleştirilmiş kapak ile kapatıldı. Yaklaşık 25-30 gün sonra gelişimlerini tamamlayan olgunlaşan larvalar (7. evre) pup olmaları için diğer bir kavanoza aktarıldı. Bu kavanozun içine, larvaların pup olmaları için kuru ortam sağlamak üzere, katlanmış pelur kağıt parçaları bırakıldı (Campos et al. 1990). Oluşan puplardan yaklaşık 7-8 gün sonra ergin bireyler meydana geldi. Bu erginlerin büyük bir çoğunluğu böcek kültürünün devamı, bazı erginler ise gemifloksasinin farklı konsantrasyonları ile ilgili beslenme çalışmaları için gerekli yumurtaların elde edilmesinde kullanıldı.

## 2.2 LARVALARIN ELDE EDİLMESİ

Kapaklı, 30 ml'lik geniş ağızlı, vida kapaklı bir plastik kabin (ORLAB, L190030, 35x55 mm) iç yüzeyine dişiler tarafından yumurta bırakılması sağlandı. Bırakılan yumurtalar  $28 \pm 2$  °C ve %  $65 \pm 5$  bağıl nemde bekletilerek açılması sağlandı. Bu yumurtalardan açılan *G. mellonella* larvaları beslenme deneylerinde kullanıldı. Açılan larvalar, yumuşak uçlu bir fırça (No: 0, Goya Toray) ile tel kafes kapaklı cam kavanozların (60 x120mm) içindeki besine (yaklaşık 200 g) bırakıldı.

## 2.3 GEMİFLOKSASİNİN İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ

Fluorokinolon grubu gemifloksasin [gemifloksasin mesilat, beyaz kristal toz, % 100,  $C_{18}H_{20}FN_5O_4 \cdot CH_4O_3S$ ; 7-(3-aminometil)-4-metoksiimino-pyrrolidin-1-il)-1-siklopropil-6-fluoro-4-okso-1,4-dihidro-[1,8]naftiridin-3-karboksilik asit mesilat] antibiyotiği Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A. Ş. (Maslak, İstanbul)'den temin edildi. Gemifloksasinin besine ilave edilmesi ile yürütülen beslenme deneylerinde denenen miktarların konsantrasyonu 100 gram besin başına gram antibiyotik (% a/a) olarak ifade edildi. Gemifloksasin, besinin hazırlanması sırasında doğrudan besine ilave edildi. Kontrol besini (gemifloksasin içermeyen) hariç gemifloksasinin *G. mellonella* için % 0,001, 0,01, 0,1 ve 1,0 olmak üzere dört farklı konsantrasyonu denendi. Kontrol deneylerinde ise yalnızca gemifloksasin içermeyen besin kullanıldı. Bu çalışmada denenecek gemifloksasin konsantrasyonları *G. mellonella* (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009) ve bazı parazitoid böcek türleri (Büyükgüzel ve Yazgan 1996, Büyükgüzel 2001a) üzerinde antibiyotiklerin etkisinin araştırıldığı önceki çalışmalar temel alınarak belirlenmiştir. Bu çalışmaların ışığında, denenecek konsantrasyonların aralığını belirlemek amacıyla ön beslenme deneyleri yapıldı. Böceklerin ergin evreye kadar gelişimini tamamlayabileceği konsantrasyon aralıkları belirlendi. Gemifloksasinin *G. mellonella* üzerindeki konsantrasyonları belirlenerek böceğin yaşama, gelişme, eşey oranı, erkek ve dişi ömür uzunluğu, yumurta verimi, yumurtaların açılma oranı, 7. evre larvalarının ortabağırsak MDA ve protein karbonil miktarı ile GST aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

## **2.4 YAŞAMA, GELİŞME, EŞEY ORANI İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ**

Antibiyotiğin denenen konsantrasyonları hesaplanıp gerekli miktarları besinlerin hazırlanması sırasında ilave edildi. Daha sonra kontrol besini ve gemifloksasini içeren diğer besinler uygun besin kaplarına (Cam kavanozlar, 60 x120 mm) bölüştürüldü. Her bir konsantrasyon için 20 larva kullanıldı ve deneyler dörder defa tekrarlandı. Gelişimlerini tamamlayan olgun 7. evre *G. mellonella* larvaları alınarak pup olmak üzere 30 ml'lik plastik örnek kaplarına (ORLAB, L190030, 35x55 mm) her kapta bir larva olacak şekilde aktarıldı. Bu kaplara daha önceden larvaların pup olması için katlanmış, ince pelur kağıt bırakıldı. Pup olan ve erginleşen bireylerin sayısı ve oranı ile bu evrelere ulaştıkları süre belirlendi. Bu erginlerin erkek ve dişi oranı ve ömür uzunlukları belirlendi. Denemede kullanılan erginlerin eşey ayrımı, erginlerinin vücut büyüklüğüne ve abdomenlerinin son segmentindeki genital yapıya göre yapıldı.

## **2.5 ERGİN ÖMÜR UZUNLUĞU İLE İLGİLİ BESLENME DENEYLERİ**

Gemifloksasinin erginlerin ömür uzunluğuna etkisini belirlemek için birinci evre larvaları gemifloksasinin miktarlarını içeren yapay besinler ile ergin evreye kadar beslendi. Her konsantrasyon için 10 adet ergin kullanıldı ve deneyler dörder defa tekrarlandı. Erginleşen bireyler 30 ml'lik, geniş ağızlı, şeffaf, delikli kapaklı plastik kaplara (ORLAB, L190030, 35x55 mm) birer adet bırakıldı. *G. mellonella* erginleri besin almadığı (Charrière and Imdorf 1997) için deney süresince herhangi bir besin verilmedi. Bu erginler böcek kültürünün devam ettirildiği ortam şartlarında bekletildi. Erginler, her gün belirli saatte kontrol edilerek en son erginin ölümüne kadar her erginin yaşadığı süre belirlendi.

## **2.6 YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI İLE İLGİLİ DENEYLER**

Yumurta verimi deneyleri için yeni erginleşmiş ve döllenmemiş bir günlük *G. mellonella* dişileri kullanıldı. Dişiler geniş ağızlı, delikli kapaklı, plastik kaplara (15 ml, ORLAB) her kapta bir adet dişi olacak şekilde bırakıldı. Bırakılan yumurtalar siyah bir zemin üzerine konulan petri kutusu içinde sayıldı. Yapılan ön denemeler erginleşen dişilerin ilk 48-72 saat içinde yumurtalarını bıraktığını göstermiştir. Bu yüzden ilk 2-3 gün içinde bırakılan yumurtalar sayılarak açılması için stok kültürün devam ettirildiği ortam şartlarında bekletildi. Dişinin yumurta verimi, bir günde dişi başına bırakılan yumurta sayısı ele alınarak değerlendirildi. Yumurtaların açılma oranı (fertilite) her gün açılan larvalar siyah bir zemin

üzerinde sayılarak kaydedildi. Her bir deney için 10 adet dişi kullanıldı ve deneyler dörder defa tekrarlandı.

Deneylerin tümü kısa bir günlük inceleme periyodu hariç sürekli olarak karanlıkta tutuldu. Besinin hazırlanması ve larvaların aşılması hariç beslenme deneylerinin tümü böceklerin yetiştirildiği şartlarda yürütüldü. Besinin hazırlanması, yumurtaların elde edilmesi, bu yumurtalardan çıkan larvaların besine aşılması işlemleri tamamen aseptik olmayan şartlarda yapıldı (İçen et al. 2005, Büyükgüzel et al. 2007, Büyükgüzel and Kalender 2007).

## **2.7 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ**

Lipid peroksidasyon ürünü MDA ve protein oksidasyonu ürünü protein karbonil miktarları ile GST aktivitesinin ölçümü için gemifloksasin ile beslenen *G. mellonella* 7. evre larvalarının izole orta bağırsak dokusu kullanıldı. Deneylerin her bir tekrarında 15 adet larvanın ortabağırsağı kullanıldı. Deneyler dörder defa tekrarlandı.

### **2.7.1 Orta Bağırsak İzolasyonu**

Orta bağırsak alınacak larvalar buz üzerinde 5 dk bekletildi. Daha sonra % 95 etil alkol ile yüzeyleri silinerek steril edildi ve parafinle doldurulmuş petri kabına sırt kısmı parafine gelecek şekilde sabitlendi. Larvalar toraks bölgesindeki birinci çift bacakların önünden itibaren üçüncü abdomen bölgesindek bacak çiftine kadar orta eksen boyunca ince uçlu diseksiyon makası ile kesildi. Stroomikroskop (Olympus SZ61, Tokyo, Japan) altında ince uçlu bir pens ile sindirim kanalı çıkarıldı. Sindirim kanalından orta bağırsak ön ve son bağırsaktan ayrılarak izoel edildi. Orta bağırsağa tutunmuş yağ doku, Malpiki tüpçükleri ve bağırsak içeriği uzaklaştırıldı.

Orta bağırsak örnekleri, içinde önceden soğuk homojenizasyon tamponu [% 1,15'lik potasyum klorür (KCL) a/h, 25 mM dipotasyum hidrojen fosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 5 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenilmetilsülfonil (PMSF), 2 mM ditiyotreitol (DTT), pH: 7,4] bulunan bir ependorf tüpe alındı. Fenol oksidaz aktivitesini önlemek için birkaç feniltiyoüre kristali konuldu. Örnekler derin dondurucuda (-80 °C) analiz yapıncaya kadar bekletildi.

### 2.7.2 MDA Analizi

MDA analizinde Jain ve Levine (1995)'nin metodu kullanıldı. Bu metod kullanılarak 532 nm'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren lipid peroksidasyonun son ürünü MDA miktarı belirlendi. Ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile orta bağırsak % 1,15'lik KCl içinde özütlendi. Homojenizata pH 7,4 olan fosfat tamponu (18 mM NaCl, 18 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,04 M butillenmiş hidroksi toluen (BHT), % 30'luk triklorasetik asit (TCA)] eklenerek 2 saat buzun içerisinde bekletildi. Daha sonra +4 °C de, 2000 x g devirde 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatanta 0,1 M EDTA ve % 1'lik TBA ilave edilerek kaynar su banyosunda 45 dakika bekletildi. Örneklerin spektrofotometrede (Shimadzu 1700 UV/Vis, Kyoto, Japan) 532 nm'de absorbansı okundu. MDA miktarı  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak hesaplandı.

### 2.7.3 Protein Karbonil Analizi

Protein oksidasyon ürünü protein karbonil miktarının tayini için Levine (1994)'in metodu temel alındı. Bu metod bir ölçüde değiştirilerek kullanıldı (Krishnan and Kodrik 2006). Kuvvetli asit ortamda proteinlerdeki karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları kararlı bileşik 2,4-dinitrofenilhidrazonun 370 nm'de absorbansı ölçüldü. Dokular homojenizasyon tamponu içinde [% 1,15'lik potasyum klorür (KCL) a/h, 25 mM dipotasyum hidrojen fosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 5 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenilmetilsülfonil (PMSF), 2 mM ditiyotreitol (DTT), pH: 7,4] ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) +4 °C'de homojenize edildi. Homojenizat +4 °C'de 1000 x g'de 10 dk santrifüj (Hettich Zentrifugen, Mikro 200 R soğutmalı santrifüj) edildi. Süpernatanta % 10'luk streptomisin sülfat ilave edilerek 37 °C'de 15 dk benmaride bekletildi. Süpernatanttan nükleik asitler 8000 x g'de + 4 °C'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvıdan 200 µl alınarak başak bir tüpe aktarıldı. Üzerine 800 µl 10 mM 2,4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) ilave edildi. Benmaride 37 °C'de 15 dk belirli aralıklar ile çalkalandı. Daha sonra tüplere 700 µl % 20'lik trikloroasetik asit ilave edilerek buz üzerinde 10 dk bekletildikten sonra + 4 °C'de 10000 x g'de 10 dk santrifüjlendi. Oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazon bileşikleri çöktürüldü. Üst sıvı atılarak çöküntü üzerine 1:1 oranında 1 ml etanol: etil asetat karışımı ilave edildi. Vorteks ile yavaşça homojenize edildi. Bu işlem 3 defa tekrarlanıp her defasında 10000 x g'de + 4 °C'de santrifüj edilerek üst sıvı atıldı. En son



santrifüjleme işleminden sonra çöküntü üzerine 2,5 ml 6 M guanidin hidroklorür ilave edilerek iyice 37 °C'de 10 dk (oda ısısında 45 dk) karıştırılmak suretiyle çöküntünün çözülmesi sağlandı. Bu homojen çözeltilerden 150 µl alınarak total protein tayini yapıldı. Geri kalan karışımdan kaba partiküller 10000 x g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı alınarak 370 nm de kör tüpe karşı absorpsiyonu spektrofotometrede (Shimadzu 1700 UV/Vis, Kyoto, Japan) belirlendi. Protein karbonil miktarı 22,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein hesaplandı.

Örneklerin total protein tayini için 6 M guanidin hidroklorür ile çözülen çöküntüden alınan 150 µl karışım, 1350 µl guanidin hidroklorür ile (1:10 oranında) seyreltildi ve absorpsiyonu 280 nm'de ölçüldü. 6 M guanidin hidroklorür ile hazırlanan Bovin serum albumin (BSA) standart çözeltileri (12,5-1600 mg/100ml) ile standart grafik çizildi. Total protein miktarı bu grafiğe göre belirlendi.

#### **2.7.4 GST Analizi**

Orta bağırsak doku örnekleri +4 °C'de ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) (10 sn, 30 W) özütlendi. Özütleme işlemi soğuk ortamda yapıldı. Homojenizat, +4 °C'de 16000 x g'de 20 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı GST aktivitesinin ölçümü için kullanıldı. Bu işlem için Habig vd. (1974) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. GST'nin substratı olarak 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. GST tarafından glutatyonun oksidasyonu sırasında CDNB 340 nm'de yükselen absorpsiyon gösterir. GST aktivitesinin ölçülmesi için 3 ml'lik cam küvetlere 2,5 ml 50 mM fosfat tamponu, 200 µl 20 mM redükte glutatyon ve 150 µl süpernatant ilave edildi. Bu karışıma 150 µl 25 mM CDNB eklenerek enzimatik reaksiyonun başlaması sağlandı ve yükselen absorpsiyonlar 2 dakika süre ile okundu. Absorpsiyon 2 dk süre ile yükselmesi CDNB'nin indirgenmiş glutatyon ile reaksiyona girerek tiyoether yapısının oluşumunu göstermektedir. Enzim aktivitesi 340 nm'de ( $\epsilon_{340}$ : 0,0096 µM.cm<sup>-1</sup>) süpernatantta bulunan 1 mg toplam protein başına 1 dakikada oluşturulan tiyoether miktarı olarak hesaplandı ve enzimin spesifik aktivitesi µmol/mg protein/dk olarak verildi.

GST enziminin spesifik aktifliğini hesaplamak ve MDA miktarını mg protein başına vermek için örneklerdeki çözünür total protein miktarı belirlendi. Protein tayini Folin-Lowry (Lowry

et al. 1951) metoduna yapıldı. Örneklerin absorbansı spektrofotometrede 600 nm’de ölçülerek total protein miktarı hesaplandı. Total protein tayini için standart protein olarak, bovin serum albumini (BSA) çözeltileri hazırlandı ve bir standart grafik çizildi. Total protein miktarları bu standart grafiğe göre hesaplandı.

## 2.8 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Gemifloksasinin *G. mellonella*’nın biyolojik özellikleri üzerindeki etkisini belirlemek için böceğin farklı gelişim evrelerindeki gelişme süresi (yedinci larval evreye, pup evresine ve ergin evreye ulaşmak için geçen gün olarak ortalama süre), yaşama oranı (bu evrelerde yaşayan yüzde olarak birey sayısı) dikkate alındı. Böceğin eşey oranı erkek ve dişi bireylerin yüzdesi belirlenerek hesaplandı. Gemifloksasinin ergin evredeki yaşama süresine (ömür uzunluğu) etkisini belirlemek için erginleşen dişi ve erkek bireylerin hayatta kaldıkları gün olarak ortalama süre (ömür uzunluğu) belirlendi. Dişilerin verimliliği üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde ise bırakılan yumurta sayısı ve açılma oranı dikkate alındı. Farklı konsantrasyonlarda gemifloksasinin böceğin detoksifikasyon kapasitesine, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu düzeyi üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde ise orta bağırsak GST enzimi ile lipid peroksidasyonu ürünlerinden MDA ve protein oksidasyonu ürünlerinden protein karbonil miktarındaki değişimler dikkate alındı. Böceğin gelişme süresi, erginlerin ömür süresi, dişilerin yumurta verimi ve yumurtaların açılma oranı, orta bağırsaktaki MDA ve protein karbonil miktarı ve GST aktivitesi ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü “Varyans Analizi” (ANOVA) (SPSS 1997), ortalamalar arasındaki farkın önemini saptamak için “LSD Testi” (SPSS 1997), yaşama ve eşey oranı ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde ise “ $\chi^2$  (Chi square) Testi” (Snedecor and Cochran 1989) kullanıldı. Ortalamalar arasındaki farkın önemi 0,05 olasılık seviyesinde analiz edildi.



## BÖLÜM 3

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1 GEMİFLOKSASİNİN YAŞAMA, GELİŞME VE EŞEY ORANINA ETKİSİ

Kinolon grubundan olan gemifloksasinin değişik miktarları yapay besine ilave edilerek *G. mellonella* üzerinde etkisi incelendi. Bu bölümde antibiyotiğin böcek üzerindeki etkisinin belirlenmesinde böceğin yaşama, gelişme ve eşey oranı dikkate alındı. Gemifloksasinin besinlerdeki konsantrasyonları böceğin son evreye (7. evre) ulaşan larvalarının yaşama oranında önemli derecede azalmaya neden olmuştur. Bu antibiyotik aynı zamanda pup ve ergin olma oranını gemifloksasin içermeyen kontrol besini ile karşılaştırıldığında önemli derecede düşürmüştür. Kontrol besininde larvaların % 91,25'i 7. evreye ulaştığı halde en düşük gemifloksasin konsantrasyonu larvaların yaklaşık % 60'ını bu evreye ulaştırmıştır. Gemifloksasinin denenen en yüksek konsantrasyonu (%1,0) pup olma oranını % 80,00'den % 33,75'e düşürmüştür. Kontrol besini ile beslenen larvaların % 78,75'i ergin olmuştur. Buna rağmen besindeki denenen en yüksek gemifloksasin konsantrasyonu ergin olma oranını % 30,00'a düşürmüştür (Çizelge 3.1). Besindeki gemifloksasinin bu oranı larval gelişme süresini önemli derecede geciktirmiştir. Aynı zamanda bu konsantrasyon pup ve ergin evrelerine ulaşmak için gereken süreyi önemli derecede uzatmıştır. Bu besinle beslenen larvalar kontrol grubuna göre ortalama 6 gün daha geç son larval evreye (7. evre) ulaşmıştır. Bu konsantrasyonda larvalar ortalama 5 gün daha geç pup evresine ulaşmış olup ergin evreye ulaşırken bu gecikme 7 gün olarak belirlenmiştir. Gemifloksasinin besinsel düşük konsantrasyonları böceğin ergin evreye kadar olan tüm gelişme evreleri ele alındığında gelişme süresini önemli derecede etkilememiştir. Ancak gemifloksasinin besinsel düşük konsantrasyonları tüm gelişim evrelerinde yaşama oranını önemli derecede düşürmüştür.

Kontrol besini (gemifloksasin içermeyen yapay besin) ile beslenen başlangıçtaki larvaların % 78,75'i ergin olmuştur. Bu erginlerin büyük bir oranı erkek eşeyi yönünde ortaya çıkmıştır. Bu besin üzerinde beslenen larvalardan oluşan erginlerin % 60,11'i erkek, % 39,89'i dişi

olmuştur (Çizelge 3.1). Kontrol besini ile karşılaştırıldığında, gemifloksasinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler erkek ve dişi birey oranını etkilememiştir. Ancak denenen en yüksek gemifloksasin konsantrasyonunu içeren besin ile beslenen larvalardan düşük bir oranda erkek ve dişi birey meydana gelmiştir. Örneğin gemifloksasinin % 1,0'ini (en yüksek konsantrasyon) içeren besin erkek oranını 60.11'den % 44,80'e düşürürken, dişi olma oranını ise % 39,89'dan 55,20'ye artırmıştır.

Çizelge 3.1 Gemifloksasinin *G. mellonella* larvalarının yaşama, gelişme ve eşey oranına etkisi.

Gemifloksasin (mesilat) (%)	7.evreye ulaşan larva oranı (%) (Ort* ± S.H)†	7.evreye ulaşma süresi (gün) (Ort* ± S.H)†	Pup olma oranı (%) (Ort* ± S.H)†	Pup olma süresi (gün) (Ort* ± S.H)†	Ergin olma oranı (%) (Ort* ± S.H)†	Ergin olma süresi (gün) (Ort* ± S.H)†	Eşey oranı (%)	
							Erkek (Ort* ± S.H)†	Dişi (Ort* ± S.H)†
0,000 <sup>§</sup>	91,25 ± 3,69a	22,51 ± 1,42a	80,00 ± 2,76a	29,11 ± 1,15a	78,75 ± 4,08a	36,15 ± 0,70a	60,11 ± 5,14a	39,89 ± 3,20a
0,001	58,75 ± 9,58b	22,54 ± 1,21a	47,50 ± 6,25b	29,11 ± 1,30a	43,75 ± 6,70b	36,76 ± 1,13a	54,41 ± 11,79a	45,59 ± 8,25a
0,01	61,25 ± 8,90b	22,56 ± 1,31a	53,75 ± 7,15b	28,05 ± 1,05a	51,25 ± 6,46b	35,56 ± 0,74a	67,50 ± 3,89a	32,50 ± 2,75a
0,1	55,00 ± 12,12b	23,85 ± 1,15a	50,00 ± 10,60b	29,79 ± 1,30a	45,00 ± 8,29b	37,66 ± 1,16a	42,50 ± 9,88 a	57,50 ± 4,34a
1,0	37,50 ± 4,50c	28,16 ± 0,69b	33,75 ± 2,72bc	34,38 ± 0,73b	30,00 ± 3,06bc	43,97 ± 1,39b	44,80 ± 9,21a	55,20 ± 3,40a

\* Dört tekrarın ortalaması, her bir tekrar için 20 larva kullanıldı.

† Aynı sütunda aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, P > 0,05 ( $\chi^2$  testi, LSD Testi).

§ Kontrol besini (Gemifloksasin mesilat içermeyen).

### 3.2 GEMİFLOKSASİNİN ÖMÜR UZUNLUĞU, YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ETKİSİ

Yapay besindeki farklı gemifloksasin konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın ömür uzunluğu üzerine etkileri incelendi. Ömür uzunluğuna etkisi incelenirken gemifloksasinin farklı miktarları ile yetiştirilen erkek ve dişi erginlerin ölünceye kadar yaşadıkları gün olarak süre dikkate alındı. Bu kinolon yapısındaki antibiyotiğin denenen en düşük miktarı bu antibiyotiği içermeyen kontrol besini ile karşılaştırıldığında erkek erginlerin ömür uzunluğunu ortalama 2,0 gün uzatmıştır. Buna rağmen erkek erginlerin ömür uzunluğu açısından kontrol ile karşılaştırıldığında arasında istatistiksel bakımdan önemli bir etki ortaya çıkmamıştır. Bu antibiyotiğin denenen en düşük miktarı gemifloksasin içermeyen kontrol besini ile karşılaştırıldığında benzer bir etkiyi dişi ömür uzunluğu üzerinde de göstermiştir. Sonuçta gemifloksasinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler erkek ve dişi erginlerin ömür uzunluğu üzerinde önemli derecede etkili olmamıştır (Çizelge 3.2). Gemifloksasinin % 0,001-0,1 oranında düşük konsantrasyonlarını içeren besinler dişilerin ömür uzunluğunda kontrol grubuna göre yaklaşık 1'er gün uzamaya neden olmuştur. Ancak bu etki istatistiksel olarak önemli olmamıştır.

Bu bölümde gemifloksasinin farklı konsantrasyonlarını içeren yapay besinlerde yetiştirilen *G. mellonella* dişilerinin yumurta verimi ve bırakılan yumurtaların açılma oranına etkileri incelendi. Gemifloksasinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler ile beslenen larvalardan erginleşen dişilerin kontrol besini ile beslenen larvalardan erginleşen dişilere göre, yumurta verimi önemli derecede azalmıştır. Kontrol besini ile yetiştirilen dişiler günde 134,46 adet yumurta bırakırken % 0,001'lik gemifloksasin ile yetiştirilen dişilerin yumurta verimi 60,26 adet yumurtaya kadar düşmüştür. Buna karşılık besine % 0,1 oranında gemifloksasinin ilave edilmesi yetiştirilen dişilerin bıraktığı yumurta sayısını önemli derecede azaltmıştır (Çizelge 3.2). Bu gemifloksasin konsantrasyonu ile yetiştirilen dişiler bir günde ortalama 26,75 adet yumurta bırakmışlardır. Besindeki gemifloksasin miktarının on katı artırılması (% 0,1) gemifloksasinin % 0,1'lik konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında, yumurta sayısını iki katı artırmıştır. Ancak bu iki antibiyotik konsantrasyonu etkileri bakımından kendi aralarında karşılaştırıldığında önemli bir istatistiksel fark ortaya çıkmamıştır.

Yumurtaların açılma oranı bu antibiyotiğin denenen en düşük konsantrasyonunu içeren besin tarafından istatistiksel olarak önemli olmayan derecede düşürülmüştür (Çizelge 3.2).

Gemifloksasinin yüksek konsantrasyonları bırakılan yumurtaların açılma oranını besindeki artan antibiyotik konsantrasyonu ile orantılı olarak önemli derecede azaltmıştır. Gemifloksasin içermeyen kontrol besini ile yetiştirilen dişilerin bıraktığı yumurtaların % 87,86'sı açılmıştır. Bu açılma oranı gemifloksasinin en yüksek konsantrasyonu tarafından % 53,71'e düşürülmüştür.



Çizelge 3.2 Gemifloksasinin *G. mellonella* larvalarının ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranına etkisi.

Gemifloksasin (mesilat) (%)	Ergin ömür uzunluğu (gün)		Yumurta verimi (yumurta/gün/dişi) (Ort * ± S.H) <sup>†</sup>	Açılma oranı (%) (Ort * ± S.H) <sup>†</sup>
	Erkek (Ort * ± S.H) <sup>†</sup>	Dişi (Ort * ± S.H) <sup>†</sup>		
0,000 <sup>§</sup>	10,99 ± 0,26a	9,39 ± 0,72a	134,46 ± 16,86a	87,86 ± 3,47a
0,001	13,09 ± 0,78a	10,88 ± 0,44a	60,26 ± 9,45b	75,39 ± 7,13ab
0,01	10,40 ± 1,51a	10,83 ± 0,88a	48,91 ± 14,58b	62,22 ± 6,78b
0,1	10,30 ± 0,89a	10,13 ± 0,58a	26,75 ± 5,53b	57,09 ± 6,06b
1,0	11,45 ± 2,13a	9,69 ± 1,03a	53,15 ± 5,49b	53,71 ± 4,53b

\* Dört tekrarın ortalaması, her bir tekrar için 10 ergin kullanıldı.

<sup>†</sup> Aynı sütunda aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, P > 0,05 (LSD Testi).

<sup>§</sup> Kontrol besini (Gemifloksasin mesilat içermeyen).

### 3.3 GEMİFLOKSASİNİN MDA, PROTEİN KARBONİL VE GST AKTİVİTESİNE ETKİSİ

Gemifloksasin antibiyotiğinin *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyonu ürünü MDA miktarına etkisi incelendi. Bu antibiyotiğin düşük konsantrasyonlarını içeren besinler kontrol besini ile karşılaştırıldığında son evre larvalarının (7. evre larvaları) orta bağırsak MDA miktarında istatistiksel olarak önemli olmayan derecede artışa sebep olmuştur (Çizelge 3.3). Antibiyotiğin denenen en düşük konsantrasyon olan % 0,001'lik miktarını içeren besin MDA miktarını kontrol besindeki MDA miktarı olan 0,11 nmol/mg protein'den 0,15'e nmol/mg protein'e artırmıştır. *G. mellonella* larvalarını beslemek için kullanılan bu besine ilave edilen antibiyotiğin miktarı 10 katı artırıldığında (% 0,01) ise orta bağırsak MDA miktarı kontrol besindeki MDA miktarı olan 0,11 nmol/mg protein'den 0,18 nmol/mg protein'e artmıştır. Bu kinolon grubu antibiyotiğin besine ilave edilen en yüksek miktarını (% 1,0) içeren besin MDA miktarını  $0,11 \pm 0,02$  nmol/mg protein'den 0,37 nmol/mg proteine artırmıştır. Bu artış yaklaşık 3 katı oranında olup istatistiksel açıdan önemli bir artıştır.

Çalışmanın bu bölümünde antibiyotiğin *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında protein oksidasyonuna etkisini araştırmak için protein oksidasyonu ürünü olan protein karbonil miktarındaki değişimler belirlendi (Çizelge 3.3). Gemifloksasin ilave edilmeyen ve kontrol besini olarak kullanılan besin ile yetiştirilen larvaların orta bağırsağında protein karbonil miktarı 34,75 nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu antibiyotiğin % 0,001'lik konsantrasyonunu içeren besin, kontrol besini ile karşılaştırıldığında protein karbonil miktarını 83,43 nmol/mg protein'e önemli derecede artırmıştır. Yapay besindeki antibiyotik miktarının % 0,01 ve 0,1'lik konsantrasyonlara artırılması kontrol besini ile yetiştirilen larvaların orta bağırsağındaki 34,75 nmol/mg protein olan protein karbonil miktarını sırasıyla 64,50 ve 80,12 nmol/mg protein'e artırmıştır. Besine gemifloksasinin en yüksek konsantrasyonunun ilave edilmesi protein karbonil miktarını yaklaşık 2 katı oranında artırmış olup 34,75 nmol/mg protein'den 73,87 nmol/mg protein'e yükseltmiştir.

Antibiyotiğin böceğin detoksifikasyon kapasitesine etkisini belirlemek için böceğin son evre larvalarının ortabağırsağındaki GST enzimi aktivitesindeki değişimler incelendi. Bu larvaları beslemek için kullanılan yapay besinde (gemifloksasin içermeyen kontrol besini) beslenen larvaların orta bağırsak analizi sonucunda GST aktivitesinin 2,13  $\mu$ mol/mg protein/dk olduğu

hesaplanmıştır (Çizelge 3.3). Besine % 0,001 ve 0,1'lik gemifloksasin konsantrasyonlarının ilave edilmesi kontrol besini ile karşılaştırıldığında GST aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Ancak bu iki besin arasında istatistiksel olarak önemli derecede bir fark ortaya çıkmamıştır. Antibiyotiğin besine ilave edilen % 1,0'lik konsantrasyonu GST aktivitesini kontrol besinine göre önemli derecede artırmış olup bu artış 2 katı oranında meydana gelmiştir. Antibiyotiğin besine ilave edilen % 1,0'lik konsantrasyonu GST aktivitesini 2,13'den 4,78 µmol/mg protein/dk'ya artırmıştır.

Çizelge 3.3 Gemifloksasinin *G. mellonella* larvalarının ortabağırsak MDA, protein karbonil miktarı ve GST aktivitesine etkisi.

Gemifloksasin mesilat (%)	MDA (nmol/mg protein) (Ort* ± S.H) <sup>†</sup>	Protein Karbonil (nmol/mg protein) (Ort* ± S.H) <sup>†</sup>	GST aktivitesi (µmol/mg protein/dk) (Ort* ± S.H) <sup>†</sup>
0,000 <sup>§</sup>	0,11 ± 0,02a	34,75 ± 3,54a	2,13 ± 0,31a
0,001	0,15 ± 0,01a	83,43 ± 3,40b	2,55 ± 0,43a
0,01	0,18 ± 0,02a	64,50 ± 3,50c	2,09 ± 0,40a
0,1	0,16 ± 0,02a	80,12 ± 3,89b	2,40 ± 0,39a
1,0	0,37 ± 0,03b	73,87 ± 3,17bc	4,78 ± 0,55b

\*Dört tekrarın ortalaması, her bir tekrar için 15 ortabağırsak kullanıldı.

<sup>†</sup>Aynı sütunda aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, P > 0,05 (LSD Testi).

<sup>§</sup>Kontrol besini (Gemifloksasin mesilat içermeyen).



## BÖLÜM 4

### TARTIŞMA

Bu çalışmada Lepidoptera takımına ait Pyralidae ailesinden olan *G. mellonella* larvaları laboratuvarında yapay besinler ile beslenerek flurokinolon grubu bir antibiyotik olan gemifloksasinin farklı miktarlarının böceğin larva, pup ve ergin evreye ulaşan bireylerin oranı, bu evrelere ulaşmaları için geçen süre, ergin ömür uzunluğu, eşey oranı, dişilerin yumurta verimi ve açılma oranına etkisi araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışmada antibiyotiğin son evre larvalarının ortabağırsak oksidatif stres düzeyi (MDA ve protein karbonil düzeyi) ve detoksifikasyon enzimi GST aktivitesi üzerinde sebep olduğu değişimler belirlenmiştir. Bu çalışma klinik amaçlı olarak kullanılan yeni kuşak sentetik antibiyotiklerin böcek beslenmesi açısından değerlendirilmesi ve zararlı böceklerin mücadelesinde bu antibiyotiklerin kullanılabilirliğini ortaya koyması açısından önemlidir. Elde edilen sonuçlar, denenen bu antibiyotiğin yaşama ve gelişim üzerindeki etkilerini böceğin hem larval gelişme hem de larva sonrası gelişme evrelerinde gösterdiğini açıkça göstermiştir. Bu etkiler besindeki gemifloksasin miktarına bağlı olarak da değişmiştir. Gemifloksasinin larvaların yapay besinine ilave edilen tüm konsantrasyonları böceğin tüm gelişme evrelerindeki yaşama oranını, dişilerin yumurta verimini ve açılma oranını olumsuz yönde etkilerken, bu antibiyotiğin yalnızca yüksek miktarları böceğin gelişimini geciktirmiştir. Buna karşılık bu antibiyotik böceğin eşey oranı ve ömür uzunluğunu etkilememiştir.

Denenen antibiyotik konsantrasyonlarına bağlı olarak *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağındaki protein karbonil miktarının önemli derecede artması yoğun bir protein hasarının olduğunu açıkça göstermektedir. Buna karşılık lipid peroksidasyonunun ancak en yüksek gemifloksasin konsantrasyonunda önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Bu antibiyotik konsantrasyonunda artan lipid peroksidasyonu ile orantılı olarak GST aktivitesinin de arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.3). Bu sonuçlar sindirim işleminin gerçekleştiği ortabağırsak epitelyum dokusunun protein içeriğinin lipidlere göre antibiyotiğin oksidatif etkisine daha çok maruz kaldığını göstermektedir. Orta bağırsak dokusunun sindirim işleminin mekanik

etkilerine birinci derecede maruz kalan bir doku olduğuna dair bilgilerimiz bu sonuçları desteklemektedir. Aktif beslenme evresi olan larval evrede, bireylerin orta bağırsak dokusunun protein ve lipid içeriğinin oksidatif olarak hasar görmesi besin almayan pup ve ergin evrelerin biyolojik özelliklerini olumsuz yönde etkilemesi beklenmektedir. Böceklerin orta bağırsak dokusunda antibiyotiklerin protein oksidasyonuna etkisini belirten detaylı bilgilere sahip olmadığımızdan bu çalışmanın sonuçları şimdiye kadar yapılan çalışmalara önemli katkıda bulunacaktır. Proteinler serbest radikallerin doğrudan etkilerine lipidlerin yapısındaki doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlıdır. Aşırı doymamış yağ asitlerinin oksidasyon son ürünü olan toksik aldehit ürünler MDA, glioksal, 2-hidroksiheptanal ve 4-hidroksi-2-nonanal proteinlerin çeşitli amino asit köklerinin amino ve karboksil grupları ile çapraz bağlar yaparak proteinlerin yapılarının bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda işlevsel ve yapısal proteinlerde yapı bozulması meydana geldiğinden görevlerini eksik yapmakta veya tamamen işlevleri kaybolmaktadır (Requena et al. 1996). Bu çalışmanın sonuçları ve daha önceki yapılan beslenme çalışmaları (Eid et al. 1989, Büyükgüzel and İçen 2004, Büyükgüzel and Kalender 2008) antibiyotiklerin etkilerinin belirlenmesinde belirli evrelerdeki böceklerin dokularında biyokimyasal analizlerinin yapılması ve fizyolojik değişimlerin ortaya konulmasının önemli olduğunu vurgulamıştır.

Besine ilave edilen gemifloksasinin kimyasal ve fiziksel yapıyı etkileyerek besinin kalitatif ve kantitatif besinsel kalitesinde değişime sebep olması muhtemeldir. Böylece kullanılan besinin kimyasal bileşimleri arasındaki dengenin değişimi sonucu larvaların beslenme davranışı değişmiş ve besin tüketim oranı azalmış olabilir. Böcekleri beslemek için kullanılan besinlerdeki besin içeriğinin bozulması ve kalitesinin düşük olmasının erginlerin fizyolojik ve biyolojik özelliklerini olumsuz etkilediği bilinmektedir (Slansky and Scriber 1985). Olumsuz şartlarda bekletilmesi sonucu bozulan doğal besin ile beslenen bir örümcek türü *Pardosa prativaga* (L. Koch)'da GST enzimi azalmıştır (Nielsen and Toft 2002).

Besinsel kaynaklı olarak gerek besin içindeki etkileşimlerden (eksojen) gerekse besinin orta bağırsakta sindirilmesi sırasında oluşan serbest radikallerin oksidatif etkisinden böceklerin fizyolojik aktiviteleri etkilenmektedir (Timmermann et al. 1999). Değişen bu fizyolojik işlevlere bağlı olarak böceklerin biyolojik yaşam parametrelerinin olumsuz etkilenmesi çoğunlukla serbest radikallerin toksitesine bağlı olarak larvaların besin tüketim oranının değişmesinden ileri gelmektedir (Cohen and Crittenden 2004). Bu çalışmada gemifloksasinin etkisi ile besin kalitesi değişmiş olabilir. Bu değişime bağlı olarak meydana gelen dış kaynaklı

serbest radikaller ile sindirim sırasında oluşan iç kaynaklı serbest radikallerin sindirim kanalı dokusundaki protein ve lipit biyomolekülleri oksidatif olarak hasara uğramış olabilir.

İnsan sağlığı açısından büyük öneme sahip geleneksel antibiyotikler penisilin ve streptomisin *G. mellonella* üzerinde denenmesi bu antibiyotiklerin böceğin yaşama, gelişme, vücut ağırlığı ve total protein miktarına etkisi böceğin gelişme evreleri (larva, pup ve ergin) ile antibiyotiklerin türü ve dozuna bağlı olduğunu göstermiştir (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009). Bu çalışmalarda antibiyotiklerin *G. mellonella* larvalarının orta bağırsak MDA ve SOD, CAT, GST, GPx antioksidan enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkilerinin böceğin larval evrelerine (3-7 evreler) göre değiştiği de belirtilmiştir (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008). Büyükgüzel and Kalender (2008) penisilin % 0,01, 0,1 ve 1,0'lik konsantrasyonları *G. mellonella*'nın yaş ağırlığını artırdığını ortaya çıkarmıştır. Buna karşılık böceğin yaş ağırlığını antifungal antibiyotikler flukonazol, griseofulvin ile antibakteriyel antibiyotik streptomisin % 0,001 ve 0,01'lik düşük miktarları artırmıştır. Bu antibiyotikler erginlerin total protein miktarında da azalmaya sebep olmuşlardır. Penisilin, streptomisin, flukonazol ve griseofulvinin yüksek konsantrasyonları *G. mellonella*'nın larval evre sonrasındaki yaşama oranlarını önemli derecede azaltmış olup, gelişmeyi önemli derecede geciktirmiştir.

Gerek gemifloksasin ile yürütülen bu çalışmadan gerekse diğer antibiyotikler ile yapılan çalışmalardan böcek üzerindeki etkinin gelişme evresine göre farklı ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Gemifloksasinin *G. mellonella* üzerindeki etkilere benzer etkiler diğer takımlara ait böcekler üzerinde de ortaya çıkarılmıştır. Yapay besinlere küf ve mantar kontaminasyonunu önlemek için ilave edilen nistatin, sodyum benzoat ve metil p-hidroksibenzoat gibi bazı antifungaller yumurta endoparazitoidi olan *Trichogramma* türlerinin yumurtalarının açılma oranını azaltmış, farklı gelişme evrelerdeki ölüm oranını artırmıştır (Xie et al. 1986, Grenier and Liu 1990, 1991).

Böcek beslenmesi çalışmalarının başlangıcından bu yana ekonomik öneme sahip böceklerin [(*Pectinophora gossypiella* (Saunders), *Trichoplusia ni* (Hübner), *Graphognathus* spp, *Bemisia argentifolii* Belows & Perring)] laboratuarlarda yetiştirilmesi sırasında en sık karşılaşılan küf ve mantar kontaminasyonlarını önlemek amacıyla antimikrobiyal maddeler yapay besinlere ilave edilmiş hala günümüzde de ilave edilmeye devam edilmektedir (Ouye 1962, Kishaba et al. 1968, Bass and Barnes 1969, Clark et al. 1985, Costa et al. 1997).



Diptera takımına ait olan *Agria affinis* ve *Phryxe caudata*'nın farklı antibakteriyel ve antifungal antibiyotikler ile beslenmesi sonucunda bu böceklerin son larva evresine gelişmesinin geciktiği, pup ve erginlerin sayısının azaldığı gözlenmiştir (Singh and House 1970, Grenier 1977). Antifungal bir madde olan manganez etilenbisditiyokarbamat'ın 2600 ppm'lik miktarı ile beslenen konak böceklerde yetiştirilen bir parazitik hymenopter olan *Micropilis croceipes* Cresson larvaları gelişmemiştir (Felton and Dahlman 1984). Kimyasal yapısı bilinen sentetik besine ilave edilen penisilin, streptomisin, rifampisin diğer bir endoparazitoid hymenopter türü olan *P. turionellae*'nin yaşama oranını düşürmüş ve gelişimini geciktirmiştir (Büyükgüzel ve Yazgan 1996).

Gemifloksasin DNA cayraz enzimini inhibe ederek bakteriler üzerinde öldürücü etki göstermektedir. Bu etkisi ile dolaylı olarak DNA sentezini engelledikleri için bu amaçla düşük miktarlarda kullanılması yeterli olmaktadır. Bu özelliklerinden yola çıkarak bu çalışmada gemifloksasin kullanılmış ve düşük miktarda antibiyotik uygulaması ile insektisit olarak böcek üzerindeki öldürücü etkisinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu çalışma aynı zamanda böcek beslenmesi açısından değerlendirildiğinde, böcek besinlerindeki kontaminasyonları önleyen ancak böcek üzerinde etkisiz olan antibiyotik miktarının belirlenmesine de öncülük edecektir. Antibiyotiklerin belirtilen bu iki amaç için de düşük miktarlarda kullanılması çevresel etkinin en aza indirilmesi ve hedef olmayan canlıların korunması açısından da oldukça önemlidir. Daha önce DNA cayraz inhibitörleri ile ilgili *G. mellonella* ve Lepidoptera takımına ait diğer türler üzerinde çalışma yapılmamış olup parazitik hymenopter tür *P. turionellae* üzerinde bazı cayraz inhibitörlerinin etkisi çalışılmıştır. Büyükgüzel (2001a,b) bu endoparazitoid türü laboratuvarında yetiştirmek için kullanılan kimyasal yapısı bilinen sentetik besine bir DNA cayraz inhibitörü olan novobiyosin ilave ettiğinde düşük antibiyotik miktarında pup ve ergin olma oranının arttığını gözlemlemiştir. Bu çalışmalarda diğer bir DNA cayraz inhibitörü olan nalidiksik asit benzer şekilde yaşama üzerine olumlu etki yapmıştır. Büyükgüzel and İçen (2004) tarafından yapılan sonraki çalışmalarda bu antibiyotikler besinlere üçlü kombinasyonlar şeklinde ilave edilmiş olup *P. turionellae*'nin erginlerinde total protein içeriğini ve yaş ağırlığını artırdığı ortaya çıkarılmıştır. *G. mellonella* ile yapılan bu çalışmada gemifloksasinin bazı konsantrasyonlarda yaşama oranını ve yumurta verimini artırsa da bu artışlar istatistiksel olarak önemli değildir. Gemifloksasin genel olarak değerlendirildiğinde *G. mellonella*'nin yaşama oranını düşürmüş gelişme süresini geciktirmiştir. Bu antibiyotik aynı zamanda yumurta verimini ve açılma oranını da olumsuz etkilemiştir. Gemifloksasinin *G. mellonella* üzerindeki etkisinin diğer DNA cayraz

inhibitörlerinin etkilerine göre değişiklik göstermesi, çalışılan böceklerin türlerinin ve denenen DNA cayraz inhibitörü antibiyotiklerin kimyasal yapısının farklı olmasından ileri gelebilir. Çok düşük miktarlarda (1,5-6,0 mg) novobiyosin, nalidiksik asit ve oksonilik asit ile beslenen *P. turionellae* ile karşılaştırıldığında, *G. mellonella* gemifloksasinin yüksek miktarlarını (0,001-1,0 g) tolere ettiği tespit edilmiştir. *P. turionellae* ile karşılaştırıldığında, bazı protein ve RNA sentezi inhibitörleri ile beslenen *A. Affinis* larvaları da (Singh and House 1970) bu antibiyotiklerin daha yüksek miktarlarında ergin evreye kadar gelişimini tamamladığı ortaya çıkarılmıştır. Bu farklılık bu böceklerin sindirim kanalının farklı yapıda olmasından kaynaklanabilir. *P. turionellae* prepup evresine geçinceye kadar larvaların midgut ile hindgut arası kapalı olup alınan besin son larval evresini tamamlayıncaya kadar orta bağırsakta bekletilmektedir. Ancak böcek son larva evresini tamamladıktan ve pup evresine geçmeden önce bağırsak içeriğini boşaltmaktadır. Buna karşılık *A. affinis* ve *G. mellonella* larvaları alınan besinin sindirimini müteakiben sürekli olarak dışkısını boşaltmaktadır.

Lepidoptera takımına ait türler ile yapılan beslenme çalışmaları bu böceklerin orta bağırsağının yüksek pH'a (alkali) sahip olduğu sindirim ortamında güçlü bir oksidasyon potansiyelinin bulunduğunu göstermiştir (Terra 1990, Krishnan and Kodrik 2006). Lepidoptera takımına ait *Spodoptera littoralis* (Boisduval) larvalarının orta bağırsağında besin ile alınan bitki sekonder metabolitlerin etkisi ile serbest radikallerin oluştuğu, orta bağırsak oksidasyon potansiyelinin arttığı ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyonun yükseldiği gösterilmiştir (Krishnan and Kodrik 2006). Gemifloksasin ile beslenen *G. mellonella* son evre larvalarının ortabağırsak dokusunda MDA ve protein karbonil miktarının artışı antibiyotiğin sindirimi sırasında oluşan oksidatif stresten ileri gelebilir. Orta bağırsakta artan lipid peroksidasyonuna karşı GST enziminin aktivesinde görülen yükselme antibiyotiğin parçalanması sonucunda oluşan serbest radikallerin biyomoleküler hasara neden olmuş olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. Bu konuda destekleyici bilgilere ulaşmamız için orta bağırsak dokusunda ve lümende oluşan serbest radikal miktarının ve diğer detoksifikasyon ve antioksidan enzimlerin ölçülmesine yönelik çalışmalara ihtiyacımız olacaktır.

Bazı araştırmacılar ergin evredeki yaşam süresinin uzunluğunun oksidatif biyomoleküler hasarın azalması ve antioksidan savunma tepkisinin (SOD, CAT, GST ve GPx) artmasına bağlı olduğunu göstermişlerdir (Sestini et al. 1991, Bains et al. 1998, Sun et al. 2002). Gemifloksasinin böceğin ergin özellikleri üzerindeki olumsuz etkisinin oksidatif stresten

kaynaklanabileceğini işaret etmektedir. Bu çalışmada % 1,0'lik gemifloksasin yaşama oranı ve gelişme süresini olumsuz etkilerken larvaların orta bağırsak MDA ve protein karbonil miktarı ile GST aktivitesini önemli derecede artırmıştır. Bu en yüksek gemifloksasin miktarı dişi ve erkek ömür uzunluğunu istatistiksel olarak önemli olmayan derecede uzatmış olmasına rağmen bu uzamada GST enziminin aktivitesinin yükselmesi rol oynamış olabilir. Meyve sineği *Drosophila melanogaster* (Meigen)'in oksidatif strese karşı GST ve GPx aktivitelerindeki artış ile karşı koyduğu ve böylece ergin evredeki yaşama süresinin uzadığı belirlenmiştir (Sohal et al. 1995, Sun et al. 2002).

Böceklerin bıraktığı yumurta sayısı gemifloksasinin tüm miktarları tarafından düşürülmüştür. Gemifloksasinin yüksek miktarları ile beslenen dişilerin bıraktığı yumurtaların çoğunluğu açılmamıştır. Bu yumurtaların embriyonik gelişimlerini tamamlayamadığından normal olarak açılmadığı gözlemlenmiştir. Bizim sonuçlara benzer olarak oksitetrasiklin ve tilozin antibiyotiklerinin *Folsomia fimetaria* L. ve *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta: Enchytraeidae)'nın üreme oranında azalmaya sebep olmuştur (Bagger et al. 2000). Ayrıca bu antibiyotikler bu böceklerin ergin evreye ulaşan birey sayısını ve bir sonraki jenerasyondaki döl verimini azaltmıştır. Diğer taraftan Jensen et al. (2003) *F. fimetaria*'nın üremesi üzerine metronidazol, olanquindoks, tiamulin ve antihelmintik ivermektinin olumsuz etki yaptığını göstermiştir.

Tarımsal ürünlere zarar vererek ekonomik kayıba neden olan böceklerin yumurta veriminin düşmesi ve bırakılan yumurtaların açılma oranının azalması böcekler ile mücadelede önemli sonuçlardır. Diğer çalışmalar ile bu durum desteklenmektedir. Bir transkripsiyon inhibitörü olan rifampisin *F. candida* Willem'nin yumurta üretimini etkilememiş, ancak açılma oranını azaltmıştır (Timmermans and Ellers 2008). Bazı sentetik antiviral maddelerin heteropter böceklerden *Pyrrhocoris apterus* (L.)'da ve *Dysdercus cingulatus* (Fabr.)'da ovaryum ve folikül hücrelerinde deformasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Bu antiviraller vitellin proteininin sentezini önleyerek embriyonik gelişimi yavaşlatmışlardır (Sláma et al. 1983, Gelbič and Holy 1985, Šula et al. 1987, Socha et al. 1988). Bu çalışmada denenen gemifloksasinin biyomoleküler hasarın göstergeleri olan malondialdehit ve protein karbonil miktarını artırması en azından larval evrede oksidatif hasara bağlı yapısal ve işlevsel biyomoleküllerin hasara uğrayabileceğini açıkça göstermektedir. Larval evrede alınan besinin erginlerde biyolojik ve fizyolojik özellikleri etkilediği göz önüne alındığında besinle alınan gemifloksasinin yüksek konsantrasyonlarda dişilerin ürettiği yumurtalara olumsuz etki yapması beklenebilir. Bu görüşü

desteklemek amacıyla yumurtalardaki oksidatif stres biyobelirteçleri olan MDA, protein karbonil ve diğler biyomolekülerdeki hasarları gösteren belirteçlerin tespit edilmesi gerekmektedir.



## BÖLÜM 5

### SONUÇ

Bu çalışmada gemifloksasinin *G. mellonella* üzerinde biyolojik, fizyolojik ve biyokimyasal etkisinin araştırılmasında, son evre larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu seviyesi ile GST aktivitesindeki değişimlerin tespit edilmesi ve bu değişimler ile birlikte, böceğin yaşama oranı, gelişme süresi, ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu ve eşey oranını ile yumurta verimi, yumurtaların açılma oranını, olumsuz yönde etkileyen konsantrasyonların belirlenmesi gemifloksasinin insektisit olarak kullanılabilirliğinin incelenmesinde önemli kriterler olmuştur. Böylece insan ve hayvan sağlığı açısından önem arz eden bir maddenin zararlı böceklerin mücadelesinde kullanımı ile ilgili bu yeni yaklaşım tarımsal ürünlerin korunmasında çevreye duyarlı bir yöntem olmaya adaydır. Diğer taraftan yararlı böceklerin laboratuvar şartlarında kitle üretiminde kullanılan yapay besinlerin mikrobiyal kontaminasyonlarının önlenmesi ve fizyolojik çalışmalar için steril böcek yetiştirilmesi amacıyla bu antibiyotiğin besindeki miktarlarının iyi bir şekilde ayarlanması ile kullanılması uygun olabilir.



## KAYNAKLAR

- Abdrashitosa N F and Ramanov Y A** (2001) Effects of antibiotics on reactive oxygen species generation by neutrophils. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 132: 1163-1165.
- Ahmad S** (1992) Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem. Syst. Ecol.*, 20: 269-296.
- Ahmad S and Pardini R S** (1990a) Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology & Medicine*, 8: 401-413.
- Ahmad S, Beilsen M A and Pardini R S** (1989) Glutathione peroxidase activity in insects: A reassessment. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 12: 31-49.
- Ahmad S, Duval D L, Weinhold L C and Pardini R S** (1991) *Cabbage looper* antioxidant enzymes: Tissue Specificity. *Insect Biochem.*, 21: 563-572.
- Ahmad S, Pritsos C A and Pardini R S** (1990) Antioxidant enzyme activities in subcellular fractions of larvae of the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 15: 101-109.
- Ahmad S, Zaman K, MacGill R S, Batcabe J P and Pardini R** (1995) Dichlone-induced oxidative stress in a model insect species, *Spodoptera eridania*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 442-448.
- Ajanta B, Poonam C, Kumar S U and Gupta G P** (2008) Mass rearing of greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) on artificial diet. *Indian J. Entomol.*, 70: 389-392.
- Al-izzi M A J, Al-Maliki S K and Jabbo N F** (1987) Culturing the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.*, 80: 277-280.
- Alverson J and Cohen A C** (2002) Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *J. Econ. Entomol.*, 95: 256-260.
- Assemi H, Rezapannah M, Vafaei-Shoushtari R and Mehrvar A** (2012) Modified artificial diet for rearing of tobacco budworm, *Helicoverpa armigera*, using the Taguchi method and Derringer's desirability function. *J. Insect Sci.* 12:1-18
- Aucoin R R, Philogene B J R and Arnason J T** (2005) Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phytotoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous lepidoptera. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 16: 139-152.



## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Aucoin R, Guillet G, Murray C, Philogene B J R and Arnason J T** (1995) How do insect herbivores cope with the extreme oxidative stress of phototoxic host plants? *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29 (2): 211-226.
- Baguer A J, Jensen J and Krogh P H** (2000) Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere*, 40: 751-757.
- Bains J S, Garg S K and Sharma S P** (1998) Effect of butylated hydroxyanisole on catalase activity and malondialdehyde content in aging *Zaprionus paravittiger* (Diptera). *Gerontology*, 44: 262-266.
- Barbehenn R and Stannard J** (2004) Antioxidant defense of the midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars. *J. Insect Physiol.*, 50: 783-790.
- Barbehenn R V, Poopat U and Spencer B** (2003) Semiquinone and ascorbyl radicals in the gut fluids of caterpillars measured with EPR spectrometry. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 125-130.
- Bass M H and Barnes E E** (1969) Toxicities of antimicrobial agents to white-fringed beetle larvae and the effectiveness of certain of these agents against microbial growth. *J. Econ. Entomol.*, 62: 718-719.
- Bottger G T** (1942) Development of Synthetic food media for use in nutrition studies of the European corn borer. *J. Agr. Res.* 65: 493-500.
- Bronskill J** (1961) A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *J. Lep. Soc.*, 15: 102-104.
- Büyükgüzel E and Kalender Y** (2007) Penicillin-induced oxidative stress: effects on antioxidative response of midgut tissues in larval instars of *G.mellonella*. *J. Econ. Entomol.*, 100: 1533-1541.
- Büyükgüzel E and Kalender Y** (2008) *Galleria mellonella* survivorship, development and protein content in response to dietary antibiotics. *J. Entomol. Sci.*, 43: 27-40.
- Büyükgüzel E and Kalender Y** (2009) Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 94: 112-118.
- Büyükgüzel E, Tunaz H, Stanley D W and Büyükgüzel K** (2007) Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J. Insect Physiol.*, 53: 99-105.
- Büyükgüzel K** (2001a) Positive Effects of Some Gyrase Inhibitors on Survival and Development of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera:Ichneumonidae) Larvae Reared on an Artificial Diet. *J. Econ. Entomol.*, 94 (1): 21-26.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Büyükgüzel K** (2001b) “DNA Gyrase Inhibitors: Novobiocin Enhances the Survival of *Pimpla turionellae* Larvae Reared on an Artificial Diet but Other Antibiotics do not. *J. Appl. Entomol.*, 125: 583-587.
- Büyükgüzel K** (2002) Antimicrobial Agents: Their Combined Effects on Total Protein Content of the Endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Turk. J. Zool.*, 26: 229-237.
- Büyükgüzel K and İçen E** (2004) Effects of gyrase inhibitors on the total protein content of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera:Ichneumonidae) larvae reared on an artificial Diet. *J. Entomol. Sci.*, 39: 108-116.
- Büyükgüzel K and Yazgan Ş** (1999) Combinational Effects of Some Antimicrobial Agents on the Survival and Development of the Endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Communications (séries C.)*, 48: 1-14.
- Büyükgüzel K and Yazgan Ş** (2002) Effects of antimicrobial agents on survival and development of larvae of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) reared on an artificial diet. *Turk. J. Zool.*, 26: 111-119.
- Büyükgüzel K ve Yazgan Ş** (1996) Bazı Antibiyotiklerin Endoparazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)’nın yaşama ve Gelişimine Etkileri. *Turk. J. Zool.*, 20: 1-7.
- Campos F, Donskov N, Arnason J T, Philogene B J R, Atkinson P M and Werstuck N H** (1990) Biological effects and toxicokinetics of DIMBOA in *Diadegma terebrans* (Hymenoptera: Ichneumonidae), an endoparasitoid of *Ostrina nubilalis* (Lepidoptera: Pyralide). *J. Econ. Entomol.*, 83: 356-360.
- Charriere J D and Imdorf A** (1997) Protection of honeycombs from moth damage. Swiss Bee Research Center Federal Dairy Research Station. *Comm.*, 24: 1-14.
- Cheeseman K H** (1993) Lipid Peroxidation in Biological System, In B. Halliwell and O. K. Aruoma eds., Ellis Horwood, *DNA and Free Radicals*, London, United Kindom, 201-211.
- Clark A G, Dick G L, Martindale S M and Smith J N** (1985) Glutathione s-transferases from the New Zealand grass grub. *Costelytra zealandica*. *Insect Biochem.*, 15: 35-44.
- Clavaron-Mathews M, Summers C B and Felton G W** (1997) Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 34: 57-68.
- Cohen A C** (2003) *Insect Diets: Science and Technology*. pp. 429. CRC Press.
- Cohen A C and Crittenden P** (2004) Deliberately added and cryptic antioxidants in three artificial diets for insects. *J. Econ. Entomol.*, 97: 265-272.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Costa H S, Thomas J H and Nick C T** (1997) Effect of antibacterial materials on *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition, growth, survival and sex ratio. *J. Econ. Entomol.*, 90: 333-339.
- David W A L and Gardiner B O C** (1965) Rearing *Peiris brassicae* L. larvae on a semi-synthetic diet. *Nature* 207: 882-883.
- Deecher D C, Brezner J and Tanenbaum S W** (1990) Sublethal effects of avermectin and milbemycin on the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Econ. Entomol.*, 83: 710-714.
- Deecher D C, Brezner J and Tanenbaum S W** (1989) Effects of abamectin and Milbemycin D on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Econ. Entomol.*, 82 (5): 1395-1398.
- Dubovskiy I M, Martemyanov V V, Vorontsova Y L, Rantala M J, Grzanova E V and Glupov V V** (2008) Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comp. Biochem. Physiol. C- Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 148: 1-5.
- Dubovskiy I M, Olifirenko O A and Glupov V V** (2005) Activity of antioxidants in the gut of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) infected by bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *Galleriae*. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 41: 18-22.
- Dutky S R, Thompson J V and Cantwell G E** (1962) A technique for mass rearing the greater wax moth (Lepidoptera: Galleridae). *Ent. Soc. Wash.*, 64 (1): 54-59.
- Eid M A A, El-Nakkadı A N and Saleh M A** (1989) Functional adaptation of silk glands after administration of antibiotic to larvae of *Philosamaia ricini* (Boisd). *Insect Sci. Appl.*, 10: 139-143.
- Ensminger M E, Oldfield J E and Heinemann W W** (1990) Feed & Nutrition (Formerly, Feeds & Nutrition - Complete). The Ensminger Publishing Company, 2<sup>th</sup> edition, 1544 pp.
- Felton G W and Dahlman D L** (1984) Nontarget effect of a fungicide: Toxicity of Maneb to the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.*, 77: 847-850.
- Felton G W and Summers C B** (1995) Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29: 187-197.
- Gelbic I and Holy A** (1985) Effects of antiviral agent (RS)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenin on the larval development of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera). *Acta Entomol. Bohemoslov.*, 82: 22-27.
- Getzin L W** (1962) Mass rearing of virus free Cabbages loppers on an artificial diet. *J. Insect Pathol.* 4: 486- 487.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Glupov V V, Khvoshevskaya M F, Lozinskaya Ya L, Dubovski I M, Martem'yanov V V and Sokolova Ju Ya** (2001) Application of the method NBT-Reduction for studies on the production of reactive oxygen species in insect haemocytes. *Cytobios*, 106: 165-178.
- Glupov V V, Slepneva I A, Serebrova V V, Khvoshevskaya M F, Martem'yanov V V and Dubovskiy I M** (2003) Influence of the fungal infection on the production of reactive metabolites and antioxidant state in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Russian Entomol. J.*, 12: 103-108.
- Govindan R, Magadum S B, Krishna B G, Magadism V B, Devaiah M C and Narayanaswamy T K** (1990) Effect of fortification of streptomycin and procaine penicillin on economic traits of erisilkworm. *Curr. Res.*, 19(11): 196-197.
- Grenier S** (1977) Effects nocif de la nipagine M. sur le parasitoide *Phryxe caudata* [Dipt.: Tachinidae]. *Entomophaga*, 22(2): 223-236.
- Grenier S and Liu W H** (1990) Antifungals: Mold control and safe levels in artificial media for *Trichogramma* [Hymenoptera: Trichogrammatidae]. *Entomophaga*, 35(2): 283-291.
- Grenier S and Liu W H** (1991) Mold control and safe levels of antifungals in artificial media for egg parasitoids (Hymenoptera). *Les Colloques de l'INRA*, 56: 141-144.
- Grotto D., Santa Maria, L., Valentini, J., Paniz, C., Gabriela Schmitt Solange Cristina Garcia, G. S.S.C., Pomblum, V. J., Rocha, J. B. T., Farina, M.** (2009) Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quím. Nova*. 32, 169-174.
- Habig W H, Pabst M J and Jakoby W B** (1974) Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.
- Hamzaoğlu M** (2012) Diritromisinin *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın bazı biyolojik ve biyokimyasal özelliklerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Bülent Ecevit Ü. niversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, s. 67.
- Haydak M H** (1936) A food for rearing laboratory insects. *J. Econ. Entomol.*, 29 (5): 1026.
- Haydak M H** (1941) Nutrition of wax moth larvae: vitamin requirement. I., Requirement for vitamin B. *Proc. Minnesota Acad. Sci.*, Vol. 9, pp. 27-29
- Iannini P B** (2007) The safety profile of moxifloxacin and other fluoroquinolones in special patient populations. *Curr. Med. Res. Opin.*, 23 (6): 1403-13.
- Ignoffo C M** (1963) A successful method for mass rearing cabbage loopers on a semisynthetic diet. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 56: 178-182.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- İçen E** (2003) Antiviral ajan asiklovirin büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın büyüme, yaşama ve gelişimine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, s. 40-54.
- İçen E, Armutçu F, Büyükgüzel K and Gürel A** (2005) Biochemical stress indicators of greater wax moth *Galleria mellonella* L. exposure to organophosphorus insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 98 (2): 358-366.
- Jain S K and Levine S N** (1995) Elevated lipid Peroxidation and vitamin E-quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 18: 337-341.
- Jarosz, J** (1981) Use of oxytetracycline-nystatin combination in obtaining germ-free larvae of *Galleria mellonella* for gnotobiotic studies. *Cytobios*, 32: 107-120.
- Jarosz, J** (1989) Simplified technique for preparing germ-free specimens of greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *J. Econ. Entomol.*, 82 (5): 1478-1481.
- Jensen J, Krogh P H and Sverdrup L E** (2003) Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). *Chemosphere*, 50: 437-443.
- Keena M A, Odell T M and Tanner J A** (1995) Effects of diet ingredient source and preparation method on larval development of laboratory-reared gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 88: 672-679.
- Kishaba A N, Henneberry T J, Pangaldan R and Tsao P H** (1968) Effects of mold inhibitors in larval diet on the biology of the Cabbage looper. *J. Econ. Entomol.*, 61: 1189-1194.
- Krishmen N and Kodrik D** (2006) Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress. *J. Insect Physiol.*, 52 (1): 11-20.
- Krishnan N and Sehnal F** (2006) Compartmentalization of oxidative stress and antioxidant defense in the larval gut of *Spodoptera littoralis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 63: 1-10.
- Krishnan N, Kodrić D, Turanlı F and Sehnal F** (2007) Stage- specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.*, 53: 67-74.
- Krishnan N, Kodrić D, Kludkiewicz and Sehnal F** (2009) Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39 (3): 180-188.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kuhlmann I** (1996) The prophylactic use of antibiotics in cell culture. *Cytotechnology*, 19: 95-105.
- Laing D R and Hagen K S A** (1970) Xenic, partially synthetic diet for the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Canadian J. Entomol.*, 102: 250-252.
- Levine R L, Williams J A, Stadtman E R and Shacter E** (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233: 346-357.
- Lopez J D, Jr Bull D L and Lingren P D** (1996) Feeding of adult *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on dry sucrose, *J. Econ. Entomol.*, 89 (1): 119-123.
- Lowry O H, Rosebroug N I, Farr A L and Randall R J** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 19: 265.
- Lozinskaya Y L, Slepneva I A, Khramtsov V V and Glupov V V** (2004) Changes of the antioxidant status and system of generation of free radicals in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae at microsporidiosis. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 40: 119-125.
- Mano T, Sinohora R, Sawai Y, Oda N, Nishida Y, Mokuno T, Kotake M, Hamada M, Masanuga R, Nakai A and Nagasaka A** (1995) Effects of thyroid hormone on coenzyme Q and other free radical scavengers in rat heart muscle. *J. Endocrinol.*, 145: 131-136.
- Marti O G, Myers R E, Carpenter J E** (2008) Rearing *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) on artificial diet and *Opuntia* cladodes. *J. Entomol. Sci.*, 43: 95-106
- Masoud M A, Saad A S, Mourad A K and Ghorab M A** (2010) Mass rearing of the pink corn borer, *Sesamia cretica* Led. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae, on semi artificial diets. *Commun. Agr. Appl. Biol. Sci.*, 75(3): 295-304.
- Mathews M C, Summers C B and Felton G W** (1998) Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 34:57-68.
- Missirlis F, Rahlfs S, Dimopoulos N, Bauer H, Becker K, Hilliker A and Phillips J P** (2003) A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *Biol. Chem.*, 384(3): 463-472.
- Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S and Niwa Y** (1986) Effects of antibiotics on generation of reactive oxygen species. *J. Invest. Dermatol.*, 9: 449-453.
- Murthy M R V, Shankaranarayana D and Seenivasaya M** (1954) Role of chloromycetin in the nutrition of silk-worm *Bombyx mori* Linn. *J. Sci. Industry Res.*, 13: 331-335.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Nielsen S A and Toft S** (2002) Responses of a detoxification enzyme to diet quality in the wolf spider. *Pardosa prativaga*. *European Arachnology*, eds. Toft S. and Scharff N., Aarhus University Pres, Aarhus, pp. 65-70.
- Ortel J** (1995) Accumulation of cd and pb in successive stages of *Galleria mellonella* and metal transfer to the pupal parasitoid *Pimpla turionellae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 77: 89-97.
- Ouye M T** (1962) Effects of antimicrobial agents on microorganisms and pink bollworm development. *J. Econ. Entomol.*, 55: 854-857.
- Owens R C and Ambrose P G** (2005) Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 41(2): 144-57.
- Patrick H and Schaible P J** (1980) Poultry: feeds and nutrition, 2nd ed. Avi, Westport, CT.
- Peric-Mataruga V, Blagojevic D, Spasic M B, Ivanovic J and Jankovic-Hladni M** (1997) Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L.caterpillars of different population origins. *J. Insect Physiol.*, 43: 101-106.
- Pritsos C A, Ahmad S, Elliott A J and Pardini R S** (1990) Antioxidant enzyme level response to prooxidant allelochemicals in larvae of the southern armyworm moth, *Spodoptera eridania*. *Free Rad. Res. Commun.*, 9 (2): 127-33.
- Raulston J R and Lingren P D** (1969) A technique for rearing large numbers of *Heliothis* larvae. *J. Econ. Entomol.*, 62: 959-961.
- Requena J R, Fu M X, Ahmed M U, Jenkins A J, Lyons T J and Thorpe S R** (1996) Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nep. Dial Trans.*, 11, 48-53.
- Reznick A Z and Packer L** (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth. Enzymol.*, 233:357-363.
- Rotundo G, Cavalloro R and Tremblay E** (1988) *In vitro* rearing of *Lysiphlebus fabarum* (Hym.: Braconidae). *Entomophaga*, 33(3): 261-267.
- Ruan Y M, Xu J and Liu S S** (2006) Effects of antibiotics on fitness of the B.biotype and a non-B.biotype of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Entomol. Exp. Appl.*, 121: 159-166.
- Sehnal F and Zitnan D** (1996) Midgut endocrine cells in Lehane, M.J., Billingsley, P.F. Eds. The Biology of the Insect Midgut, *Chapman and Hall*, London, 56-85.
- Sestini E A, Carlson J C and Allsopp R** (1991) The effects of ambient temperature on life span, lipid peroxidation, superoxide dismutase, and phospholipase A<sub>2</sub> activity in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.*, 26: 385-395.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Shaver T N and Raulston J R** (1971) A soybean-wheatgerm diet for rearing the tobacco budworm. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 64: 1077-1079.
- Sheenhan D, Meade G, Foley V M and Dowd C A** (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *J. Biochem.*, 360: 1-16.
- Singh P** (1977) *Artificial diets for insects, mites and spiders*. IFI / Plenum, New York 594 pp.
- Singh P and House H L** (1970) Antimicrobials safe levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. *J. Insect Physiol.*, 16: 1769-1782.
- Singh P and House H L** (1970a) Effects of streptomycin and potassium sorbate in relation to nutrient levels on the larvae of *Agria affinis*. *J. Econ. Entomol.*, 63: 449-454.
- Singh P and House H L** (1970b) Antimicrobial agents: their detrimental effects on size of an insect, *Agria affinis*. *Can. Entomol.*, 102: 1340-1344.
- Sivori J L, Casabe N, Zerba E N and Wood E J** (1997) Induction of glutathione-S-transferase activity in *Triatoma infestans*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92 (6): 797-802.
- Slama K, Holy A and Votruba I** (1983) Insect sterility induced by a broad-spectrum antiviral agent (S.)-9-(2,3-Dihydroxypropyl) adenine. *Entomol. Exp. Appl.*, 33: 9-14.
- Slansky Jr F and Scriber J M** (1985) Food consumption and utilization. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, eds. Kerkut G. A. and Gilbert L. I., Pergamon Press, Oxford, pp. 87-163.
- Slepneva I A, Glupov V V, Sergeevs S V and Khramtsov V V** (1999) EPR detection of reactive oxygen species in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Dendrolimus superans sibiricus* (Lepidoptera) larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264: 212-215.
- Snedecor G S and Cochran W G** (1989) *Statistical Methods*, Iowa State University Press, 8th ed., Ames, IA. 158-160
- Socha R, Gelbic I and Sula J** (1988) Histopathological effects of (R.,S.)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine on the ovaries of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *Acta Entomol. Bohemoslov.*, 85: 408-417.
- Sohal R S, Agarwal S and Sohal B H** (1995) Oxidative stress and aging in the Mongolian Gerbil. *Mech. Ageing Dev.*, 81: 15-25.
- SPSS** (1997) User's manual, version 10. SPSS, Chicago, IL.



## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Sula J, Gelbic I and Socha R** (1987) The effects of (RS)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine on the reproduction and protein spectrum in hemolymph and ovaries of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *Acta Entomol. Bohemoslov.*, 84: 1-9.
- Sun J, Folk D, Bradley T J and Tower J** (2002) Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 161: 661-672.
- Terra W R** (1990) Evolution of digestive systems of insects, *Annu. Rev. Entomol.*, 35: 181-200.
- Thompson S N** (1986) Nutrition and *In vitro* culture of insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.*, 31: 197-220.
- Timmerman S E, Zangerl A R and Berenbaum M R** (1999) Ascorbic and uric acid responses to xanthotoxin ingestion in a generalist and specialist caterpillar. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 42: 26-36.
- Timmermans M J T N and Ellers J** (2008) *Wolbachia* endosymbiont is essential for egg hatching in a parthenogenetic arthropod. *Evol. Ecol.*, 23: 931-942.
- Vanderzant E S and Reiser R** (1956a) Aseptic rearing of the pink bollworm on synthetic media. *J. Econ. Entomol.*, 49: 7-10.
- Vijayalekshmy K S, Menon V P and Leelamma S** (1992) Role of antibiotics in lipid peroxidation. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 29: 371-374.
- Vontas J G, Small G J and Hemingway J** (2001) Glutathione-S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.*, 357: 65-72.
- Vuran E** (2012) Ornidazolun *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın bazı biyolojik ve biyokimyasal parametrelerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, s. 37.
- Waterhouse D F** (1959) Axenic cultures of wax moths for digestion studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 77: 283-289.
- Xie Z N, Nettles Jr C W, Morrison R K, Irie K and Vinson S B** (1986) Three methods for the *In vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. *J. Entomol. Sci.*, 21(2): 133-138.
- Yazgan Ş** (1972) A chemically-defined synthetic diet and larval nutritional requirements of the endoparasitoid *Itoplectis conquisitor* (Hymenoptera). *J. Insect Physiol.* 18: 2123-2141.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

**Yazgan Ş** (1981) A meridic diet and quantitative effects of tween 80, fatty acid mixtures and inorganic salts on development and survival of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. *Z. angew. Ent.*, 91: 433-441.



## **ÖZGEÇMİŞ**

Pınar HIZ 1987’de İstanbul’ın Fatih ilçesinde doğdu; İlk ve orta öğrenimini farklı ilçede tamamladı. Çemberlitaş Anadolu Lisesi’nden mezun olduktan sonra 2005 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi (ZKÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne girdi; 2006 yılında Fen Edebiyat Fakültesinde yüksek onur öğrencisi seçildi; 2010 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitinde mezun olduktan sonra aynı yıl girdiği ZKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programını sürdürmektedir.

### **ADRES BİLGİLERİ:**

Adres : Çınar Mahallesi 9/10 Sokak.  
No:7 Bağcılar-İSTANBUL

Tel : (0554) 393 08 04

E-posta : pinarhiz@hotmail.com