

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

Ercan VURAN

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

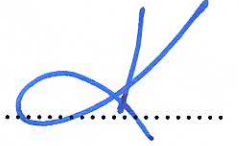
ZONGULDAK

Haziran 2012

KABUL:

Ercan VURAN tarafından hazırlanan “ORNİDAZOLUN *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)’NİN BAZI BİYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNE ETKİSİ ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir. 28/06/2012

Başkan: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL (BEÜ)



Üye : Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL (BEÜ)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat Emre HANHAN (BEÜ)



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. .../.../2012



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.”



Ercan VURAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

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

Ercan VURAN

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Haziran 2012, 37 sayfa

Nitroimidazol türevi antiprotozoal bir antibiyotik olan ornidazol içeren yapay besin ile *Galleria mellonella* (L.)'nin birinci evre larvaları yedinci evreye kadar yetiştirildi. Besinler farklı konsantrasyonda ornidazol içermektedir, bu konsantrasyonlar % 0,001, 0,01, 0,1 ve 1,0'dır. Bu tezde ornidazolun Büyük bal mumu güvesi *G. mellonella*'nın yaşama, gelişme, eşey oranı, dişi ve erkek ergin ömür uzunluğu, yumurta bırakma ve yumurta açılımı üzerine etkisi araştırıldı; ve ayrıca bu antibiyotiğin böceğin yedinci evre larvalarının orta bağırsağında önemli oksidatif stres belirteçlerinden olan lipid peroksidasyon ürünü, malondialdehit (MDA), protein oksidasyon ürünü protein karbonil (PCO) ve detoksifikasyon enzimi glutatyon S-transferaz aktivitesi (GST) belirlenmiştir. Ornidazolun denenen konsantrasyonlarını içeren besinler kontrol besine göre pup ve ergin evredeki yaşama oranını önemli derecede düşürmüştür. Buna karşılık 7. evreye ulaşan larva oranı yalnızca ornidazolun yüksek konsantrasyonları (% 0,1 ve 1,0) tarafından önemli derecede düşürülmüştür.

ÖZET (devam ediyor)

Bu antibiyotiğin en yüksek konsantrasyonunu (% 1,0) içeren besin ergin olma oranını % $84,6 \pm 2,30$ 'den % $19,2 \pm 4,15$ 'ye önemli derecede düşürmüştür. Ornidazolun denenen tüm konsantrasyonları erkek birey oranını önemli derecede düşürürken, dişi birey oranı yalnızca en yüksek ornidazol konsantrasyonu tarafından düşürülmüştür. Ornidazolun % 1,0'lik konsantrasyonunu içeren besin erkek oranını % $8,2 \pm 2,40$ 'ye, dişi oranını % $11,0 \pm 1,96$ 'e düşürmüştür. Kontrol ile karşılaştırıldığında, bu konsantrasyon böceğin ergin evreye gelişimini 9 gün geciktirmiş, ömür uzunluğunu artırmış olup erkek erginler ortalama 7 gün, dişiler ortalama 4 gün daha fazla yaşamışlardır. Ornidazolun denenen yüksek konsantrasyonlarını içeren besinler kontrol besine göre yumurta verimini önemli derecede düşürürken bu antibiyotiğin denenen tüm konsantrasyonları yumurtaların açılma oranını önemli derecede düşürmüştür. Ornidazolun en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) ile yetiştirilen dişilerin yumurta sayısı $89,4 \pm 1,12$ 'den $29,8 \pm 6,73$ 'e önemli derecede düşmüştür. Kontrol besininde yumurtaların % $85,6 \pm 0,91$ 'sı açıldığı halde ornidazolun en yüksek konsantrasyonu bu açılma oranını % $17,5 \pm 2,02$ 'e kadar azaltmıştır.

Yüksek konsantrasyonlardaki ornidazol (% 0,1 ve 1,0) son evre larvalarının orta bağırsağındaki MDA ve GST seviyelerinde önemli derecede yükselmeye neden olmuştur. Ornidazolun en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) kontrole göre MDA ve GST miktarını yaklaşık 3 katı oranında artırmıştır. Bu konsantrasyon GST miktarını $3,39 \pm 1,01$ 'den $957 \pm 2,75$ $\mu\text{mol/mg protein/dk'ya}$ yükseltmiştir. Buna karşılık, ornidazolun tüm konsantrasyonları protein karbonil miktarını önemli derecede artırmıştır. Ornidazolun en yüksek konsantrasyonunu içeren besin protein karbonil miktarını $153,39 \pm 25,7$ nmol/mg protein'den $680,19 \pm 35,4$ 'a yükseltmiştir.

Böceğin ergin biyolojik özelliklerindeki olumsuz etkilerin orta bağırsakta oluşan oksidatif stres göstergeleri MDA ve protein karbonil düzeyi ve artan GST aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ornidazol, yaşama, gelişme, oksidatif stres biyoindikatörleri, Glutatyon S-transferaz, *Galleria mellonella*

Bilim Kodu: 401.02.01

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

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

Ercan VURAN

Bülent Ecevit University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Thesis Advisor: Prof. Kemal BÜYÜKGÜZEL

June 2012, 37 pages

First-instar larvae of *Galleria mellonella* (L.) were reared with a nitroimidazole derivative antibiotic ornidazole in the artificial diet to seventh-instars. These diets contain different ornidazole concentrations, 0.001, 0.01, 0.1 or 1.0%. In this thesis, it has been investigated that the effects of ornidazole on survivorship, development, sex ratio, male and female adult longevity, fecundity and hatchability of greater wax moth *G. mellonella*. It has also been determined the effect of this antibiotic 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. Relative to the control, the diets containing ornidazole concentrations significantly resulted in decreased survivorship in pupal and adult stages whereas survivorship in 7th-instars was significantly decreased by high concentrations of this antibiotic (0.1 ve 1.0%). The highest concentration of ornidazole (1.0%) significantly decreased adult yield from 84.6 ± 2.30 to $19.2 \pm 4.15\%$. All tested concentration of ornidazole

ABSTRACT (continued)

significantly decreased the male sex ratio whereas the female sex ratio was significantly decreased by only the highest concentration of ornidazole. This concentration produced low yields as well as $8.2 \pm 2.40\%$ of male, $11.0 \pm 1.96\%$ of female. The highest ornidazole concentration also significantly prolonged the time to reach adult stage by approximately 9 days, and increased adult longevity. The male emerged from the diet containing this concentration lived more longer by 7 days, the females lived more longer by 4 days than those from control. Ornidazole at all concentration resulted in significantly decreased hatchability whereas the high concentrations of this antibiotics significantly lowered egg number. The highest concentration of this antibiotic (1.0%) significantly decreased egg number from 89.4 ± 1.12 to 29.8 ± 6.73 , and hatchability from 85.6 ± 0.91 to $17.5 \pm 2.02\%$.

High concentrations (0.1 and 1.0%) of this antiprotozoal antibiotic caused a significant increase in MDA and GST levels in midgut tissue of last larval instar. This antibiotic at highest dietary concentration (1.0%) significantly increased MDA and GST content by about 3-fold. This concentration significantly increased GST content from 3.39 ± 1.01 to 9.57 ± 2.75 $\mu\text{mol/mg protein/min}$. However, all concentration of ornidazole significantly resulted in increased PCO content. The diet with the highest concentration of this nitroimidazole derivative significantly raised the PCO content from 153.39 ± 25.7 to 680.19 ± 35.4 nmol/mg protein (about 4-fold) in comparison to control.

It has been demonstrated that the negative effects on adult biological traits of the insect are related to resulting oxidative stress bioindicators, MDA and protein carbonyls levels, and elevated GST activity of midgut.

Key Words: Ornidazole, survivorship, development, oxidative stress bioindicators, Glutathione S-transferase, *Galleria mellonella*

Science Code: 401.02.01

TEŞEKKÜR

Bu konuda bana çalışma fırsatı veren, araştırma sırasında ilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen danıŐman hocam, Sayın Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL'e (BEÜ), çalıŐmamın her aşamasında değerli öneri ve bilgilerinden yararlandığım Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL'e (BEÜ), teŐekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım aşamasında bana yardımcı olan Öğr. Gör. Meltem ERDEM'e (BEÜ) teşekkür ederim. Ornidazolü bu çalışma için hediye eden Abdi İbrahim İlaç firmasına, çalıŐmamın deneysel ve yazma aşamasında moral desteği ve yardımlarını esirgemeyen aileme ve yüksek lisans arkadaşlarıma teŐekkürlerimi sunarım. Bu alıŐma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüđü tarafından desteklenmiŐtir (PROJE NO:2011-10-06-04).

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	7
2.1 BÖCEK KÜLTÜRÜNÜN DEVAMI	7
2.2 DENEYLERDE ORNİDAZOLUN KULLANILMASI.....	8
2.3 <i>G. MELLONELLA</i> LARVALARININ ELDE EDİLMESİ.....	8
2.4 BESLENME DENEYLERİ.....	8
2.5 YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI İLE İLGİLİ DENEYLER.....	9
2.6 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ	10
2.6.1 Orta bağırsak izolasyonu	10
2.6.2 Malondialdehid (MDA).....	10
2.6.3 Protein Karbonil.....	11
2.6.4 Glutatyon S-transferaz (GST).....	11
2.7 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	11
BÖLÜM 3 ARAŞTIRMA BULGULARI	13

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.1 <i>G. MELLONELLA</i> LARVALARININ YAŞAMA, GELİŞME VE EŞEY ORANINA ORNİDAZOLUN ETKİSİ	13
3.2 <i>G. MELLONELLA</i> 'NİN ÖMÜR UZUNLUĞU, YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ORNİDAZOLUN ETKİSİ.....	15
3.3 <i>G. MELLONELLA</i> ORTA BAĞIRSAĞINDA MDA, PROTEİN KARBONİL VE GST AKTİVİTESİNE ORNİDAZOLUN ETKİSİ.....	17
 BÖLÜM 4 TARTIŞMA	 21
 BÖLÜM 5 SONUÇ.....	 27
 KAYNAKLAR	 29
 ÖZGEÇMİŞ	 37

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Ornidazolun kimyasal yapısı.....	3
3.1 Ornidazolun <i>G. mellonella</i> 'nın orta bağırsak MDA miktarına etkisi.....	18
3.2 Ornidazolun <i>G. mellonella</i> 'nın orta bağırsak protein karbonil miktarına etkisi	18
3.3 Ornidazolun <i>G. mellonella</i> 'nın orta bağırsak GST aktivitesine etkisi.....	19

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Ornidazolun <i>G. mellonella</i> larvalarının yaşama, gelişme ve eşey oranına etkisi.....	14
3.2 Ornidazolun <i>G. mellonella</i> larvalarının ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranına etkisi.....	16

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
lt	: Litre
M	: Molar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
nmol/mg protein	: Nanomol/miligram protein
sn	: Saniye
μl	: Mikrolitre
$\mu\text{mol/mg protein/dk}$: Mikromol/miligram protein/dakika

KISALTMALAR

ANOVA	: Analysis of variance
BHT	: Butillenmiş hidroksi toluen
BSA	: Sığır serum albumin
CAT	: Katalaz
DNPH	: 2,4- dinitrofenilhidrazin
DTT	: Ditiyotreitol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

GST	: Glutasyon-S-transferaz
LSD	: Least Significant Difference
MDA	: Malondialdehid
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklorasetik asit
UV	: Ultraviole
χ^2	: Ki kare (Chi square)

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kelebekgiller (Lepidoptera) takımındaki böceklerin larvaları zirai ve endüstriyel bitkilere zarar vererek ekonomik açıdan önemli kayıplara sebep olmaktadır (Charriere and Imdorf 1997). Zararlı lepidopter türlerin geliştirilen yapay besinler ile laboratuvar şartlarında kültüre alınması geliştirilecek kimyasal mücadele yöntemlerine ışık tutmak üzere böceklerin ekoloji ve fizyolojilerinin anlaşılmasında önemli bir yöntemdir (Al-izzi et al. 1987, Keena et al. 1995). *Galleria mellonella* L'nin da dahil olduğu bazı zararlı lepidopter türlerini laboratuvar ortamında yetiştirmek amacıyla ilk defa Haydak (1936) tarafından yapay bir besin ortamı geliştirilmiştir. Daha sonra bu besin kullanılarak *G. mellonella* L.'nin bazı besinsel ihtiyaçları belirlenmeye çalışılmıştır (Haydak 1941). Bu çalışmaları izleyen yıllarda, geliştirilen diğer bazı yapay besin karışımları ile bu zararlı türün kısa sürede daha verimli bir şekilde kitle üretimi yapılabilmektedir (Waterhouse 1959, Bronskill 1961, Dutky et al. 1962). Benzer yapay besin ortamları ve beslenme teknikleri ekonomik olarak önemli diğer lepidopter türlerden lahana kurdu *Trichoplusia ni* (Hübner) ve meyve güvesi *Grapholitha molesta* (Busck)'nın laboratuvar şartlarında yetiştirilmesinde kullanılmıştır (Ignoffo 1963, Laing and Hagen 1970). Bu konudaki beslenme çalışmaları halen büyük bir hızla devam etmekte olup son zamanlarda nar güvesi *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller), meşe güvesi *Lymantria dispar* L. ve mısır kurdu *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *zea* (Boddie) larvaları yapay besin ortamlarında ergin evreye kadar yetiştirilmeye çalışılmıştır (Al-Izzi et al. 1987, Keena et al. 1995, Lopez et al. 1996).

G. mellonella'nın laboratuvar kültürü sırasında mikrobiyal kontaminasyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Diğer taraftan bu böceğin larva ve pupaları dışilerden yumurta aracılığıyla taşınan mikroflora tarafından da kontamine edilmektedir. Bu yüzden ilk beslenme çalışmalarında yumurta yüzeyinin dezenfeksiyonu ile ilgili yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır (Waterhouse 1959, Dudziak 1975). Ancak bu sterilizasyon yöntemlerinin zahmetli olması ve yumurtaların kolayca zarar görmesi daha uygun aseptik önlemlerin alınmasını gerektirmiştir. Bu amaçla *G. mellonella* larvalarının doğal besinine nistatin ve

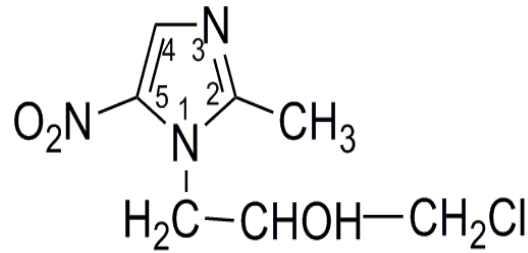
oksitetrasiklin'in bazı kombinasyonları ilave edilmiştir (Jarosz 1981). Diğer taraftan olgun larvalara bu antibiyotiklerin enjekte edilmesiyle laboratuvar şartlarında güvenilir fizyolojik çalışmalar yapmak ve parazitoidlerin verimli olarak kitle üretimini sağlamak için mikroorganizmalardan arındırılmış konak böceklerin yetiştirilmesi amaçlanmıştır (Jarosz 1989, Büyükgüzel 2001a, Büyükgüzel and Yazgan 2002, Alverson and Cohen 2002). Ancak bu böcek üzerinde denenen antibiyotiklerin oksidatif stres oluşturup oluşturmadıkları ve antioksidatif savunma sistemine etkisini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bu konudaki çalışmalar az sayıda olup (Dubovskiy et al. 2005) bunların büyük bir çoğunluğu *G. mellonella*'nın midgutındaki çevresel stres faktörlerine karşı oluşan oksidatif ve antioksidatif tepki üzerinedir.

Orta bağırsak besinlerin sindiriminde karşılaşılan ilk engel olduğundan bu çalışmada besinle alınan antibiyotiklere karşı bir savunma mekanizması olarak orta bağırsak antioksidan enzimlerinin önemi gösterilecektir. Antibiyotiklerin büyük bal mumu güvesi larvaları üzerindeki olumsuz etkileri orta bağırsakta oluşturdukları reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından uyarılan oksidatif stresin antioksidatif savunma sistemini bozmasına neden olabilir. Böcekler orta bağırsaklarındaki toksik etkileri biyotransformasyondan sorumlu özel bir enzim ile nötralize ederler (Ivie et al. 1983). Orta bağırsak, böceklerin besinleri sindirdiği ve emilime uğrattığı önemli bir sindirim kanalıdır (Sehna and Zitnan 1996). Böceklerin orta bağırsağındaki peritrofik zarda antioksidan enzimlerden oluşan dokuya spesifik bir antioksidatif savunma mekanizması vardır (Ahmad 1992, Felton and Summers 1995, Barbehenn and Stannard 2004). Böceklerin orta bağırsağında alkali bir ortam olduğundan antibiyotiklerin ve diğer zararlı maddelerin sindirimi sırasında ROT'ların oluşumu daha da fazla tetiklenmektedir (Terra 1990). Yapılan çalışmalarda kelebekgiller takımına ait türlerin larvalarında allelokimyasalların sindirimi ile meydana gelen ROT'lar orta bağırsak hücrelerinde oksidatif hasara neden olduğu ortaya çıkarılmıştır (Perić-Mataruga et al. 1997, Krishnan and Sehna 2006, Krishnan et al. 2007). Böceklerde enzimatik antioksidatif savunma sistemi ile çalışmalar daha çok insektisit toksisitesi ile ilgili olup bu çalışmaların büyük bir çoğunluğu tüm vücut özütlerinde yapılmıştır.

Merkezi sinir sistemini etkileyen organofosfatlı bileşikler, fenitrotiyon, endosülfan, malatyon gibi kimyasal insektisitlerin (Fenske et al. 2002, Bhavan-Saravana and Geraldin 2001) zararlı böceklerin kimyasal mücadelesinde kullanımının artışı, çevre ve hedef olmayan diğer canlılar açısından önemli bir tehdit unsuru oluşturmaktadır. Ayrıca zararlı böceklerle mücadelede

örneğin jüvenil hormonu benzeri kimyasallar, priproksifen, sentetik pretroidler, D-fenotrin, sipermetrin ve karbamat grubu kimyasallar gibi çevreye zararlı etkisi olan insektisitler (He et al. 2002) günümüzde kullanılmaktadır. Böceklerin bu insektisitlere karşı direnç geliştirdiği gösterilmiştir (Barata 2001). Organofosfatlı insektisitlerin yaygın kullanımı önemli çevresel sorunlara sebep olmaktadır. Bu amaçla hedef olmayan yararlı böcekler, insan ve diğer canlılara karşı zararı az olan maddeler kimyasal mücadelede alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Ornidazol (ONZ, Biteral) ile birlikte tinidazol (TNZ, Fasigyn) ve metronidazol (MTZ, Metrajil) gibi 5-nitroimidazol türevleri antiparazitik ilaçlar yıllardan bu yana *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolice* ve *Giardia lamblia*'nın sebep olduğu protozoal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Ornidazolun kimyasal yapısı.

Bunlardan metronidazol antiprotozoal ilaç olarak dünya çapında kullanıma sahiptir. Buna karşılık nitroimidazol türevlerinden ornidazol yeni bir türev olup 1970'li yılların sonunda klinik kullanıma girmiş ve 1980 yılında ülkemizde de kullanılmaya başlanmıştır. Ornidazol gastrointestinal sistemden hızla emilir, yarılanma ömrü diğerlerine göre daha uzundur, karaciğerde metabolize olarak idrar ve dışkı ile atılır (Kurt et al. 2008). Tüm nitroimidazollerde olduğu gibi ornidazolün de vücutta asit ve hidrosimetabolitleri oluşur. Ornidazol, nitroredüktaz içeren bakteri ve protozoonlarda nitro grubunun indirgenmesi sonucunda biyolojik olarak aktif hale geçer. Bu redüksiyon sırasında ana molekülden bakteriyel DNA'yı bozan, kısa ömürlü ve yüksek sitotoksisteye sahip bazı ara maddeler ve serbest radikaller oluşur. Ornidazolun nitro grubunun indirgenmesi ve kısa ömürlü reaktif ara ürünlerin oluşumu parasitik etkilerinin temelini oluşturur. Bu indirgenme sonucunda oluşan metabolik ara ürünler DNA ile etkileşir ve DNA'da tek ya da çift kol kırılmalarına yol açarak bakterilerde mutajenik etkilere sahip olur. Dolayısıyla bu antibiyotik DNA sentezi altında

yapılan mRNA sentezini de bozmaktadır (Öztürk 1997). Buna karşın, nitro gruplarının indirgenmesine bağlı olarak aktifleşen nitroimidazol türevleri memeli hücrelerinde ROT'ların oluşumuna bağlı olarak DNA hasarı oluşturur (Ferreiro et al. 2002). Memelilerde en sık görülen yan tesirleri, gastro-intestinal kanal tahrişine sebep olmasıdır. Bu ilaç *in vivo* ve *in vitro* olarak güçlü antiprotozoal aktiviteye sahiptir. Üstelik bakteriyel menenjit, karın içi ve kolon enfeksiyonlarında ve diğer bazı anaerobik bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde önemli bir ilaçtır (Schwartz et al. 1979, Dokuzoğuz et al. 1997). Ornidazol oksidatif olarak ve iki hidrolitik yol ile parçalanmaktadır. Oksidasyon sonucunda oksimetil analogu oluşur. Ornidazolun oral yol ile alındığında iki glikolitik enzimin klorlanmış inhibitörü olan klorolaktata dönüşerek sıçanlarda sperm hareketliliğini önlemesi ile kısırlığa yol açtığı belirlenmiştir (Siva et al. 2006). Diğer taraftan ornidazolun glikolizi inhibe ettiği bilinmektedir (Bone et al. 2000). Ornidazol ve diğer nitroimidazol türevleri küçükbaş hayvanların yetiştiriciliği sırasında bazı protozoal hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ornidazol 200 ppm konsantrasyonda tavuk ve hindilerdeki histomoniazis (*Histomonas meleagridis*) enfeksiyonuna karşı etkilidir (Hu and McDougald 2004).

Reaktif atom ve moleküller paylaşılmamış elektronlarından dolayı serbest radikalleri meydana getirir. Serbest radikallerin hücre zarı ile etkileşmesi sonucunda, hücre zarının yapısında bulunan lipit ve proteinlerin bozunması ile bir dizi reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucunda özellikle MDA ve protein karbonil ürünleri oluştuğu bilinmektedir. Bu ürünlerin miktarındaki artış lipit peroksidasyonunun ve protein oksidasyonunun önemli bir indikatörüdür (Mano et al. 1995, Halliwell 1994, Heinle and Betz 1994). Süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri böceklerin sindirim kanalında oksidatif strese neden olmaktadır (Peric-Mataruga et al 1997, Krishnan and Kodrik 2006). Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini yok etmek için böceklerde antioksidan enzim sistemi bulunmaktadır (Ahmad 1992). Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST) glutatyon redüktaz (GR) ve askorbat peroksidaz (APOX) böceklerdeki antioksidan enzimlerdir (Ahmad et al. 1989, Ahmad and Pardini 1990). Bir organofosfat insektisit olan fenitrotiyonun pamuk çizgili yaprak kurdu *Spodoptera exigua* (Hübner) ve un zararlısı olan *Tenebrio molitor* L. türlerinin yağ dokusu ağırlığında ve antioksidan enzimlerden SOD ve CAT aktiviteleri üzerinde değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir (Adamski et al. 2003). Kadmiyum bir heteropter tür *Oncopeltus fasciatus* (Dallas)'un lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA seviyesini arttırmış ve bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini düşürmüştür (Cervera et al. 2003). GST enzimi *Nilaparvata lugens* (Stål)

türünde pretroid grubu insektisitlere karşı direnç kazanmasını sağlamıştır (Vontas et al. 2001). Endosülfanın *Helicoverpa armigera* (Hübner)'nin farklı evrelerindeki çeşitli dokularında GST aktivitesi incelenmiş ve aktivitenin yağ dokuda en yüksek olduğu, yumurta evresinde ise en düşük olduğu ortaya çıkarılmıştır (Rajurkar et al. 2003). *Apis mellifera* L. ile yapılan bir çalışmada işçi arı, erkek arı ve kraliçe arının farklı dokularında CAT, SOD, GST aktiviteleri incelenmiştir (Weirich et al. 2002). Habes et al. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada borik asitin böceklerde sindirim işlemini ve enzimatik antioksidan savunma sistemini olumsuz etkilediği açıkça gösterilmiştir. Bu çalışmada Alman hamam böceği *Blattella germanica* (L.)'nin besinine ilave edilen borik asitin orta bağırsağın yapısında histolojik değişime sebep olduğu ve GST aktivitesini artırdığı ortaya çıkarılmıştır.

Şimdiye kadar ornidazolun besinsel karışımlarının *G. mellonella* ve diğer lepidopter böcekler üzerindeki kalitatif ve kantitatif etkileri belirtilmemiştir. Bu çalışmada yapay besine ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki ornidazolun *G. mellonella*'nin yumurtadan yeni çıkmış larvalarının ergin evreye kadar yaşama, gelişimine, eşey oranına, ergin ömür uzunluğuna, yumurta verimi ve açılma oranına etkisi araştırılmıştır. Diğer taraftan ornidazolun böceğin son evre larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyonu seviyesini gösteren MDA miktarı, protein oksidasyonunun göstergesi protein karbonil miktarı ve detoksifikasyon enzimi GST aktivitesinde sebep olduğu değişimler belirlenmiştir.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOT

2.1 BÖCEK KÜLTÜRÜNÜN DEVAMI

Galleria mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nin yumurtadan yeni çıkmış larvaları laboratuvar şartlarında yarı sentetik yapay besinde (Bronskill 1961) yetiştirilerek böcek kültürünün devamı sağlandı. Larvaların bu besinde beslenmesi aseptik olmayan şartlarda yapıldı. Deneylerde böcek tarafından bırakılan yumurtalardan yeni çıkmış larvalar (birinci evre) kullanıldı. Böcek 28 ± 2 °C ve % 65 ± 5 bağıl nemin sağlandığı kültür ortamında (Nüve, ES 500) ve gün boyu devamlı karanlıkta yetiştirildi.

Böcek kültürünün devamı için kullanılan bu besin aynı zamanda ornidazolun böcek üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yürütülen beslenme deneylerinde de kontrol besini olarak kullanıldı. Besinin bileşiminde, 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 bulunmaktadır. Besin bileşenleri homojenizatör ile karıştırılarak bir litrelik cam kavanozların (80x180 mm) yaklaşık 1/3'ne kadar dolduruldu. Besinin üzerine küçük bir parça bal peteği bırakılarak kavanozun içine konan dişilerin (10-15 adet dişi), yumurta bırakması ve yeni açılan larvaların beslenmesi sağlandı (Ortel 1995). Gelişimlerini tamamlayan ve 7. evreye ulaşan larvalar 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 meydana gelen erginlerin büyük bir çoğunluğu böcek kültürünün devamı, bazı erginler ise ornidazolun etkisinin belirlenmesi ile ilgili beslenme çalışmaları için gerekli yumurtaların elde edilmesinde kullanıldı.

2.2 DENEYLERDE ORNİDAZOLUN KULLANILMASI

Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A. Ş. (Maslak, İstanbul)'den hediye olarak temin edilen ornidazol (sarımsı kristal toz, % 99,82, alfa-(klorometil)-2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol) bu çalışmada kullanıldı. Bu antibiyotiğin denenen miktarlarının konsantrasyonu 100 gram besin başına gram antibiyotik (% a/a) olarak besinlere hazırlanma aşamasında doğrudan katıldı. Bu antibiyotiğin % 0,001, 0,01, 0,1 ve 1,0 olmak üzere dört farklı konsantrasyonu denendi. Ornidazol içermeyen besin ise kontrol besini olarak kullanıldı. Ornidazol konsantrasyonlarının belirlenmesinde *Galleria mellonella* (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009) ve bazı parazitoid böcek türleri (Büyükgüzel 2001b, Büyükgüzel and Yazgan 1996) üzerinde antibiyotiklerin etkisinin araştırıldığı önceki çalışmalar dikkate alındı. Konsantrasyonların aralığını belirlemek için ön beslenme deneyleri gerçekleştirilerek larvaların ergin evreye kadar gelişebileceği konsantrasyon aralıkları belirlendi. Bu konsantrasyon aralıklarında ornidazolun böceğin yaşama oranı, gelişme süresi, eşey oranı, ergin ömür uzunluğu, yumurta sayısı, yumurtaların açılma oranına etkisi incelendi. Aynı zamanda son evre larvalarının midgut MDA ve protein karbonil miktarı ile GST aktivitesindeki değişimler araştırıldı.

2.3 G. MELLONELLA LARVALARININ ELDE EDİLMESİ

Böceğin birinci evre larvaları dişiler tarafından kapaklı, 30 ml'lik geniş ağızlı, vida kapaklı bir plastik kabın (ORLAB, L190030, 35x55 mm) iç yüzeyine bırakılan yumurtaların açılması ile elde edildi. Yumurta bırakma süresince bu dişiler (2-3 dişi) stok kültür ortamının şartlarında bekletildi ve bu dişiler tarafından bırakılan yumurtalar yine aynı ortam şartlarında açılması sağlandı. Serbest kalan birinci evre larvaları yumuşak uçlu ve ucu gliserine batırılarak nemlendirilmiş bir fırça (No: 0, Goya Toray) ile içlerinde 200 g besin bulunan tel kafesli metal kapaklı orta boy cam kavanozlara (60 x120mm) bırakıldı.

2.4 BESLENME DENEYLERİ

Bu antibiyotiğin böceğin biyolojisi üzerine etkisini incelemek için Bronskill'in (1961) yapay besini kullanıldı. Ornidazolun farklı konsantrasyonlarını içeren her bir besin için 20 larva kullanılarak deneyler dörder defa tekrarlandı. Larvalar farklı konsantrasyonlarda ornidazolu içeren besinlere bırakıldıktan sonra gelişimlerini tamamlayan son evre larvaları pup olmak

üzere 30 ml'lik plastik örnek kaplarına (ORLAB, L190030, 35x55 mm) aktarıldı. Her kaba bir larva bırakıldı. Pup olan ve erginleşen bireylerin oranı ve bu evrelere ulaştıkları süreler tespit edildi. Erginlerin eşey oranı ve ömür uzunlukları belirlendi. Ergin ömür uzunluğu deneyi için ornidazolun farklı miktarlarını içeren yapay besinler ile yetiştirilen 10 adet ergin kullanıldı. Deneyler dörder defa tekrarlandı. Geniş ağızlı, şeffaf, delikli kapaklı plastik kaplara (ORLAB, L190030, 35x55 mm, 30 ml'lik) birer adet ergin bırakıldı. Bu erginler stok kültürün devam ettirildiği ortam şartlarında bırakıldı. Erginler, her gün kontrol edilerek son erginin ölümüne kadar her erginin ömür uzunluğu tespit edildi.

2.5 YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANI İLE İLGİLİ DENEYLER

Böceğin birinci evre larvaları ornidazolun farklı miktarlarını içeren yapay besinler ile ergin evreye kadar beslendi. Deneyler için erginleşen döllenenmiş dişiler (bir günlük) kullanıldı. Her bir deney için 10 adet dişi kullanılarak deneyler dörder defa tekrarlandı. Geniş ağızlı, delikli kapaklı, plastik kaplara (15 ml, ORLAB) birer adet dişi konuldu. *G. mellonella*'nın erginleri besin almadığı (Charrière and Imdorf 1997) için bu dişilere yumurta bırakma süresi içerisinde herhangi bir besin verilmedi. Bırakılan yumurtalar siyah bir zemin üzerinde sayıldı. İlk 2-3 gün içinde bırakılan yumurtalar sayıldı ve açılması için stok kültürün devam ettirildiği ortam şartlarında bekletildi. Dişinin yumurta verimliliği bir günde dişi başına bırakılan yumurta sayısı olarak ifade edildi. Her gün açılan larvalar sayılarak yumurtaların açılma oranı (fertilite) belirlendi.

Deneylerin tümünde larvaların aşılacağı besin kapları ve olgun larvaların pup olmaları için hazırlanan kaplar kısa bir günlük inceleme periyodu hariç sürekli olarak karanlık ortamda bekletildi. Beslenme deneylerinin tümü böceklerin stok kültürünün yetiştirildiği şartlarda yürütüldü. Tüm deneysel işlemler (besinin hazırlanması, yumurtaların elde edilmesi, bu yumurtalardan çıkan larvaların besine aşılması) aseptik olmayan şartlarda tamamen yapıldı (İçen et al. 2005, Büyükgüzel and Kalender 2007). Bu işlemlerin uygulanmasında Laing ve Hagen (1970)'nin meyve güvesi *Grapholitha molesta* (Busck) ile Campos et al.(1990)'ın mısır kurdu *Ostrinia nubilalis* (Hübner) için kullandığı yöntemler bir ölçüde değiştirilerek uygulandı.

2.6 MDA, PROTEİN KARBONİL MİKTARI VE GST AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ

Ornidazolun farklı konsantrasyonlarını içeren besinler ile yetiştirilen son evre larvalarının orta bağırsaklarında MDA ve protein karbonil miktarları ile GST aktivitesi ölçüldü. Deneyle dörder defa tekrarlandı. Her bir tekrarda 15 orta bağırsak kullanıldı.

2.6.1 Orta bağırsak izolasyonu

Ornidazolun belirlenen konsantrasyonlarını içeren besinler ile son evreye kadar yetiştirilen larvalar buz üzerinde 5 dk bekletildi. Larvaların yüzeylelerini % 95 etil alkol ile dezenfekte edildi. Bu larvalar parafinle doldurulmuş petri kabına sırt kısmı parafine gelecek şekilde yerleştirildi. Stremikroskop (Olympus SZ61, Tokyo, Japan) altında ince uçlu diseksiyon makası ile larvalar birinci çift torasik bacakların önünden itibaren üçüncü abdominal bacak çiftine kadar uzunlamasına karın kısmından orta eksen boyunca kesildi. İnce uçlu bir pens yardımı ile orta bağırsak izole edildi. Orta bağırsaklar, içerisinde soğuk homojenizasyon tamponuna [% 1,15'likpotasyum klorür (KCL) a/h, 25 mM dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), 5 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 2 mM fenilmetilsülfonil (PMSF), 2 mM ditiyotreitöl (DTT), pH: 7,4] alındı. Bu tamponun içerisine dokulardaki fenöl oksidaz aktifliğini önlemek için birkaç feniltiyöüre kristali konuldu. Örnekler derin dondurucuda (-80 °C) analiz yapılcaya kadar bekletildi.

2.6.2 Malondialdehid (MDA)

MDA miktarının tespiti için Jain ve Levine (1995)'nın metodu kullanıldı. Tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren MDA miktarı ölçüldü. Ultrasonik homojenizatör (10 sn, 30 W) (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile % 1,15'lik KCl çözeltisi içinde orta bağırsaklar parçalandı. Homojenize edilen örneklere pH 7,4 olan fosfat tamponu (18 mM NaCl, 18 mM Na_2HPO_4), 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 santrifüj edildi. Tüplerden alınan üst sıvıya 0,1 M EDTA ve % 1'lik TBA ilave edilerek kaynar su banyosunda 45 dakika bekletildi, örneklerin absorbanları 532 nm'de, spektrofotometre kullanılarak (Shimadzu 1700 UV/Vis, Kyoto, Japan) okundu. MDA miktarı $1,56 \times 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ kat sayısı kullanılarak nmol/mg protein olarak hesaplandı.

2.6.3 Protein Karbonil

Levine (1994)'in metodu temel alınarak ve bir ölçüde değiştirilerek (Krishnan and Kodrik 2006) kuvvetli asit ortamda proteinlerdeki karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile oluşturdukları kararlı bileşik 2,4-dinitrofenilhidrazon 370 nm'de okunarak protein karbonil miktarı belirlendi.

Toplam proteini tespit etmek için protein karbonil analizinde kullanılan örnekler 6 M guanidin hidroklorür ile çözüldükten sonra çöküntüden alınan 150 µl karışım 1350 µl guanidin hidroklorür ile 1:10 oranında sulandırıldı. 6 M guanidin hidroklorür ile hazırlanan Bovin serum albumin (BSA) standart çözeltileri (12,5-1600 mg/100ml) 280 nm'de okundu. Elde edilen absorban değerlerinden Standart grafik oluşturuldu. Bu grafiğe görede toplam protein miktarı tespit edildi.

2.6.4 Glutasyon S-transferaz (GST)

Homojenizasyon (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) (10 sn, 30 W) işlemleri ve diğer tüm uygulamalar enzim inaktivasyonunun önlenmesi için soğuk ortamda gerçekleştirildi. Örneklerin homojenizasyonunun ardından, elde edilen karışım +4 °C'de 16000 x g devirde soğutmalı santrifüjde 20 dakika santrifüj edildi. GST aktivitesi Habig et al. (1974) tarafından geliştirilen metod temel alınarak ölçüldü. Enzim aktivitesi 340 nm'de (ϵ_{340} : 0,0096 $\mu\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}$) 1 mg toplam protein başına 1 dakikada oluşturulan tiyoether miktarı olarak ölçüldü ve enzimin spesifik aktivitesi $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/dk olarak hesaplandı.

GST'nin spesifik aktifliğini ve MDA miktarını hesaplamak için orta bağırsak örneğinden elde edilen süpernatanttan çözünür toplam protein tayini yapıldı (Lowry et al. 1951).

2.7 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

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 “ χ^2 (Chi square) Testi” (Snedecor and Cochran 1989) kullanıldı. Ortalamaların önemi 0,05 olasılık seviyesinde değerlendirildi.

BÖLÜM 3

ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1 *G. MELLONELLA* LARVALARININ YAŞAMA, GELİŞME VE EŞEY ORANINA ORNİDAZOLUN ETKİSİ

Denenen tüm ornidazol konsantrasyonlarının kontrol besinine göre pup ve ergin olma oranını önemli derecede düşürmüş, sadece yüksek konsantrasyonları içeren besinlerde (% 0,1 ve 1,0) böceğin 7. evreye ulaşan larva oranını önemli derecede azaltmıştır. Kontrol besininde sırasıyla % 87,4 ± 2,29 ve % 84,6 ± 2,30 oranında pup ve ergin elde edilmiştir. Ancak % 0,001 oranında ornidazol içeren besinden itibaren bu oranlar önemli derecede düşmüştür. Bu antibiyotiğin en yüksek miktarını (% 1,0) içeren besin pup ve ergin olma oranını sırasıyla % 20,7 ± 5,32 ve % 19,2 ± 4,15'ye önemli derecede azaltmıştır. Bu besin böceğin 7. evreye ulaşan larva oranını da % 93,0 ± 1,21'den % 20,7 ± 5,10'ye önemli derecede düşürmüştür. Ornidazolun düşük konsantrasyonları 7. evreye ulaşma süresini ve pup olma süresini kısaltmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. Buna karşılık bu konsantrasyonlar, ergin olma süresi üzerinde ise önemli olmayan uzamaya sebep olmuştur. Ornidazolun en yüksek konsantrasyonu (% 1,0) ise böceğin tüm gelişim evrelerine ulaşmak için gerekli süreyi önemli derecede uzatmıştır (Çizelge 3.1). Bu konsantrasyon kontrole göre böceğin larval gelişimini 3 gün, pupal gelişimini 7 gün ve ergin evreye gelişimini ise 9 gün (42,0 ± 1,91 gün) geciktirmiştir.

Kontrol besininden % 84,6 ± 2,30 oranında ergin elde edilmiş ve bu erginlerinden % 55,5 ± 1,96'i erkek, % 29,1 ± 2,30'i dişi meydana gelmiştir. Denenen tüm ornidazol konsantrasyonları erkek ergin oranını önemli derecede düşürmesine karşın, dişi ergin oranı yalnızca en yüksek ornidazol konsantrasyonu tarafından düşürülmüştür (Çizelge 3.1). En yüksek ornidazol konsantrasyonu erkek olma oranını % 8,2 ± 2,40'ye, dişi olma oranını % 11,0 ± 1,96'e azaltmıştır.

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

Ornidazol (%)	7.evreye ulaşan	7.evreye ulaşma	Pup olma	Pup olma	Ergin olma	Ergin olma	Eşey oranı(%)	
	larva oranı (%) (Ort* ± S.H)†	süresi (gün) (Ort* ± S.H)†	oranı (%) (Ort* ± S.H)†	süresi (gün) (Ort* ± S.H)†	oranı (%) (Ort* ± S.H)†	süresi (gün) (Ort* ± S.H)†	Erkek	Dişi
0,000 [§]	93,0 ± 1,21a	24,4 ± 1,34a	87,4 ± 2,29a	28,7 ± 1,24a	84,6 ± 2,30a	33,1 ± 0,48a	55,5 ± 1,96a	29,1 ± 2,30a
0,001	84,6 ± 1,19a	22,5 ± 0,67a	73,5 ± 3,03b	27,1 ± 0,70a	63,7 ± 7,20b	35,0 ± 0,45a	38,8 ± 3,94b	24,9 ± 7,20a
0,01	76,3 ± 1,19ab	22,0 ± 0,59a	66,6 ± 3,92b	26,5 ± 0,64a	56,8 ± 5,67b	34,2 ± 0,15a	27,7 ± 5,19b	29,1 ± 3,59a
0,1	61,0 ± 5,87b	22,9 ± 1,03a	54,1 ± 7,71bc	27,5 ± 0,92a	48,5 ± 6,61ab	35,0 ± 0,76a	18,0 ± 3,59bc	30,5 ± 4,16a
1,0	20,7 ± 5,10c	27,3 ± 0,84b	20,7 ± 5,32c	36,2 ± 1,69b	19,2 ± 4,15c	42,0 ± 1,91b	8,2 ± 2,40c	11,0 ± 1,96b

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

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

§ Kontrol besini (Ornidazol içermeyen).

3.2 G. MELLONELLA’NIN ÖMÜR UZUNLUĞU, YUMURTA VERİMİ VE AÇILMA ORANINA ORNİDAZOLUN ETKİSİ

Denenen düşük ornidazol konsantrasyonları kontrol besini ile karşılaştırıldığında erkek ve dişi erginlerin ömür uzunluğu üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Fakat ornidazolun % 0,1’lik konsantrasyonu erkeklerin ömür uzunluğunda kontrol grubuna göre yaklaşık 4 gün uzamaya neden olmasına karşın dişilerin ömür uzunluğunu istatistiksel olarak öneme sahip değildir. Bu antibiyotiğin denenen en yüksek konsantrasyonu (%1,0) erkek ömür uzunluğunu $7,3 \pm 0,29$ günden $14,7 \pm 1,74$ güne ortalama 7 gün, dişi ömür uzunluğunu ise $10,0 \pm 0,31$ günden $13,9 \pm 1,41$ güne ortalama 4 gün uzatmıştır (Çizelge 3.2).

Ornidazolun denenen yüksek konsantrasyonlarını içeren besinler kontrol besini ile karşılaştırıldığında yumurta verimini önemli derecede azaltmıştır. Ornidazol içermeyen besinde dişilerden elde edilen yumurta sayısı $89,4 \pm 1,12$ iken bu sayı % 0,01’lik ornidazol konsantrasyonunda $63,9 \pm 6,80$ ’a düşürülmüştür. Yumurta verimi üzerine benzer etkiyi ornidazolun % 0,1’lik konsantrasyonu da göstermiştir. Fakat ornidazolun % 1,0 denenen en yüksek konsantrasyonu dişilerin yumurta verimi önemli derecede azalmış olup yumurta sayısı dişi başına bir günde $29,8 \pm 6,73$ ’e düşmüştür. Ornidazolun denenen tüm konsantrasyonları kontrol besini ile karşılaştırıldığında yumurtaların açılma oranını önemli derecede azaltmıştır. Kontrol besininden elde edilen dişilerin bıraktığı yumurtaların açılma oranı % $85,6 \pm 0,91$ iken ornidazolun en yüksek konsantrasyonu bu açılma oranı % $17,5 \pm 2,02$ ’e düşmüştür (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Ornidazolun *G. mellonellalar*valarının ergin ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranına etkisi

Ornidazol (%)	Ergin ömür uzunluğu (gün)		Yumurta verimi (yumurta sayısı/gün/dişi) (Ort * ± S.H) [†]	Açılma oranı (%) Ort * ± S.H) [†]
	Erkek (Ort * ± S.H) [†]	Dişi (Ort * ± S.H) [†]		
0,000 [§]	7,3 ± 0,29a	10,0 ± 0,31a	89,4 ± 1,12a	85,6 ± 0,91a
0,001	8,9 ± 0,95a	9,6 ± 0,36a	86,4 ± 15,80a	50,2 ± 5,69b
0,01	8,2 ± 1,60a	10,2 ± 1,15a	63,9 ± 6,80b	45,2 ± 1,38b
0,1	12,0 ± 1,11b	10,6 ± 0,69a	64,3 ± 11,30b	45,0 ± 2,80b
1,0	14,7 ± 1,74c	13,9 ± 1,41b	29,8 ± 6,73c	17,5 ± 2,02c

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

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

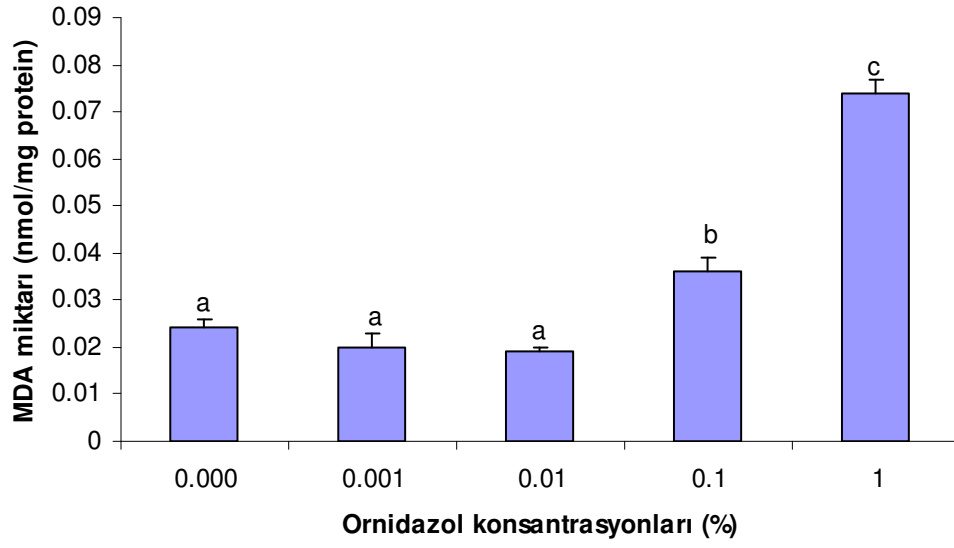
[§] Kontrol besini (Ornidazol içermeyen).

3.3 G. MELLONELLA ORTA BAĞIRSAĞINDA MDA, PROTEİN KARBONİL VE GST AKTİVİTESİNE ORNİDAZOLUN ETKİSİ

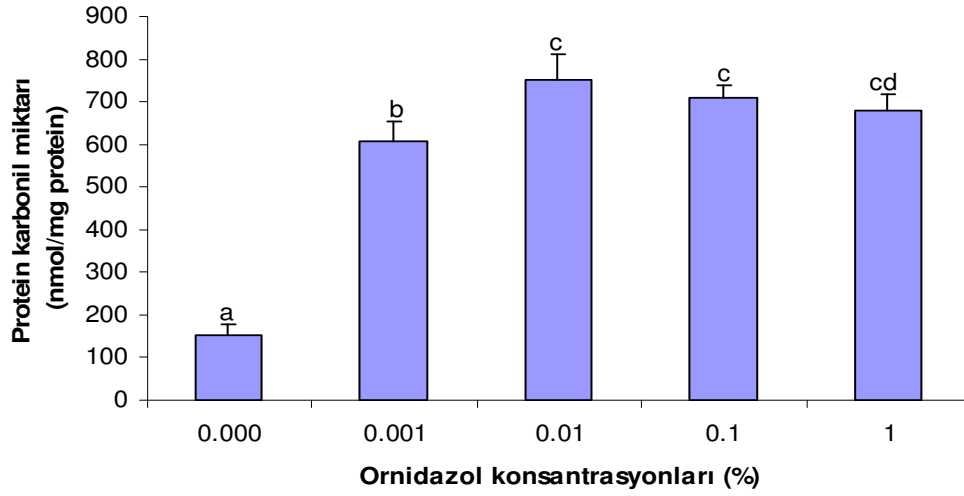
Ornidazolun düşük konsantrasyonları (% 0,001 ve 0,01) kontrole göre MDA miktarını önemli derecede etkilememiştir. Bu antibiyotiğin % 0,01'lik oranını içeren besin MDA miktarını düşürmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ortaya çıkmamıştır. Buna karşılık, kontrol besine göre ornidazolun denenen yüksek konsantrasyonları 7. evre larvalarının orta bağırsak MDA miktarını önemli derecede artırmıştır (Şekil 3.1). Bu antibiyotiğin % 0,1'lik konsantrasyonu MDA miktarını $0,024 \pm 0,002$ 'den $0,036 \pm 0,003$ nmol/mg protein'e önemli derecede artırmıştır. Denenen en yüksek konsantrasyon olan % 1,0'lik ornidazol kontrole göre MDA miktarını artırarak $0,074 \pm 0,003$ nmol/mg protein'e ulaştırmıştır.

7. evre larvalarının orta bağırsağındaki protein karbonil miktarı kontrol besininde $153,39 \pm 25,7$ nmol/mg protein olarak ölçülmüştür. Ornidazolun % 0,001'lik konsantrasyonu kontrol besinine göre protein karbonil miktarını $609,03 \pm 45,8$ nmol/mg protein'e yükselmiştir (Şekil 3.2). Ornidazolun düşük konsantrasyonlarında protein karbonil miktarı sırasıyla $752,92 \pm 59,7$ ve $708,04 \pm 29,9$ 'e yükselmiştir. Ornidazolun % 1,0'lik konsantrasyonu protein karbonil miktarını $680,19 \pm 35,4$ 'a artırmıştır.

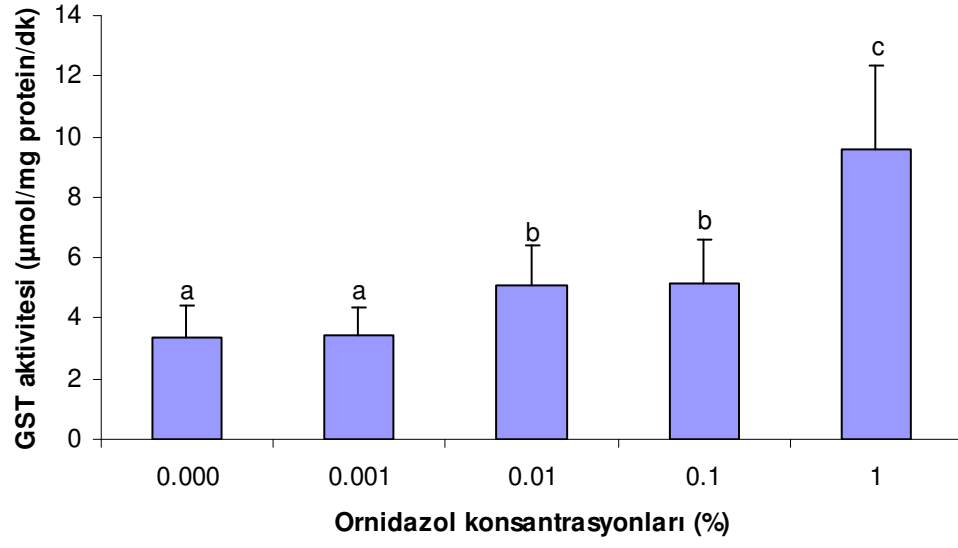
Şekil 3.3' de görüldüğü gibi orta bağırsak GST aktivitesi, kontrol besininde $3,39 \pm 1,01$ µmol/mg protein/dk olarak tespit edilmiştir. % 0,001'lik ornidazol konsantrasyonunda GST aktivitesinde artış gözlemlenmesine karşın istatistiksel olarak önemli derecede etkili olmamıştır. Ancak, orta bağırsak GST enziminin aktivitesi ornidazolun % 0,01 ve 0,1'lik konsantrasyonları tarafından önemli derecede yükseltilmiştir. Bu konsantrasyonlardaki GST aktivitesi sırasıyla $5,11 \pm 1,30$ ve $5,16 \pm 1,42$ µmol/mg protein/dk'ya olarak tespit edilmiştir. Ornidazolun en yüksek konsantrasyonunu içeren besin GST aktivitesini kontrole göre yaklaşık 3 katı artırarak $9,57 \pm 2,75$ µmol/mg protein/dk'ya kadar yükseltmiştir.



Şekil 3.1 Ornidazolun *G. mellonella*'nın orta bağırsak MDA miktarına etkisi.



Şekil 3.2 Ornidazolun *G. mellonella*'nın orta bağırsak protein karbonil miktarına etkisi.



Şekil 3.3 Ornidazolun *G. mellonella*'nın orta bağırsak GST aktivitesine etkisi.

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* larvaları ergin evreye kadar laboratuvar ortamında yapay besin ile yetiştirmek için farklı konsantrasyonlarda ilave edilen bir nitroimidazol antibiyotik olan ornidazolun böceğin yaşama, gelişmesi, eşey oranı, ergin ömür uzunluğu, dişilerin ürettiği yumurta sayısı ve yumurtaların açılma oranı ile son evre larvalarının orta bağırsağında MDA ve protein karbonil miktarlarına, detoksifikasyon enzimi GST aktivitesine etkisi araştırıldı. *G. mellonella* ve diğer bazı böcek türleri üzerinde çeşitli antibiyotikler ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar ülkemizde 1996 yılında Büyükgüzel ve Yazgan tarafından başlatılmış olup ülkemizdeki çalışmaların (Büyükgüzel and Yazgan 1996, 1999, 2002, Büyükgüzel 2002 a,b) tamamı ile dünyadaki çalışmaların birçoğu (Büyükgüzel 2001a,b, , Büyükgüzel and İcen 2004, Büyükgüzel and Kalender 2007, 2008, 2009, Giordano et al. 2010) Büyükgüzel ve ekibi tarafından yapılmıştır. Bu çalışmalarda daha çok biyolojik mücadelede önemli yeri olan böcek türlerinin yetiştirilmesi, fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için laboratuvar ortamında sağlıklı böcekler üretilmesi gerçekleştirilmiştir. Şimdiye kadar kullanılan antibiyotiklerin, böcek türlerinin yaşama ve gelişmesi üzerinde etkiye sahip olmayan, kontaminasyonu önleyen miktarları belirlenmiş fakat böcek üzerinde olumsuz etkiye neden olan miktarları ile bunların etki mekanizmaları hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır (Liles 1958, Singh and House 1970, Griffiths and Beck 1974, Costa et al. 1997, Büyükgüzel ve Yazgan 2002, Alverson and Cohen 2002).

Bu güve türü (*G. mellonella*) üzerinde yapılan çalışmalarda orta bağırsağın antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu tepkinin bağırsaktaki fizyolojik işlevlerin değişmesinden kaynaklandığını göstermiştir (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2009). Orta bağırsağın antibiyotiklere karşı oksidatif ve antioksidatif tepki mekanizmaları üzerinde durulmamıştır (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2009). Tezde yapılan araştırmalar *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında oksidatif stresin göstergesi olan lipid peroksidasyonunun ve protein oksidasyonunun önemli derecede yükseldiğini ve bununla birlikte GST aktivitesinde de

önemli bir artış tespit edilmiştir. Bu elde edilen sonuçlara göre böceğin yaşama oranını ve gelişme süresini olumsuz yönde etkilenmesi ornidazolun larvalarının orta bağırsağında meydana gelen oksidatif strese bağlı olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada böceğin orta bağırsağında MDA miktarına paralel olarak protein karbonil miktarı da kontrol besinine göre yüksek ornidazol konsantrasyonlarında önemli derecede artmıştır. Ornidazolun en yüksek besinsel konsantrasyonunun sebep olduğu MDA seviyesindeki üç kat, protein karbonil miktarında ise dört kat artış oksidatif stres düzeyinin artışına bağlı olabilir. Bununla birlikte ornidazolun % 0,1 ve 1,0 konsantrasyonları GST aktivitesinde önemli derecede artışa neden olmaktadır ve % 1,0 ornidazol konsantrasyonunda yaklaşık 3 katı oranında bir yükselme tespit edilmiştir. Büyük balmumu güvesi larvalarının besinine eklenen antibiyotiklerin türü ve kullanılan miktarına göre, böceğin yaşama, gelişme, vücut ağırlığı ve total protein miktarına etkisi böceğin gelişme evreleri ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Büyükgüzel and Kalender 2008). Yine antibiyotikler ile ilgili yapılan bir çalışmada *G. mellonella* farklı larval evrelerinin orta bağırsağında lipit peroksidasyonun belirteci olan MDA miktarı ve antioksidan enzimler olan SOD, CAT, GST, GPx aktiviteleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Bu çalışmada MDA miktarındaki ve enzim aktivitelerindeki değişikliklerin denenilen antibiyotik konsantrasyonlarına ve farklı larval evrelere göre değiştiği gösterilmiştir (Büyükgüzel and Kalender 2007). Yapılan bir başka çalışmada antifungal ve antibakteriyel maddeler *G. mellonella* erginlerinin total protein seviyesini azaltmıştır. % 0,01, 0,1 ve 1,0'lik penisilin konsantrasyonları içeren besinlerde yaşayan *G. mellonella*'nın son evre larvalarının, pup ve erginlerin yaş ağırlığını yükseltmiştir (Büyükgüzel and Kalender 2008). Bu çalışmada % 0,001 ve 0,01'lik fukonazol, griseofulvin ve streptomisin içeren besinlerde yetiştirilen *G. mellonella*'nın son evre larvalarının, pup ve erginlerin yaş ağırlığının arttığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada ergin dişilerin yumurta verimi ve açılma oranı ornidazol tarafından olumsuz yönde etkilenmiştir; bu olumsuz etki yumurta üretimi ile ilgili organlarda meydana gelen oksidatif hasardan kaynaklanabilir. Oksidatif stresin yükselişi ile bazı omurgalılarda yumurta açılımının düştüğü ortaya konulmuştur (Alonso-Álvarez et al. 2010). Tetrasiklin gibi antibiyotiklere maruz kalan *Drosophila simulans*' da mitokondri sayısının düştüğü gözlemlenmiştir (Ballard and Melvin 2007). Antimikrobiyal maddelerin oluşturduğu koku ve tat değişiklikleri larvaların besin almasında etkilidir (Singh and House 1970). *G. mellonella*'nın larval evresinde ki besin alınımındaki düşüş bu çalışmada kullanılan

antibiyotikten kaynaklanmış olabilir. Buna benzer bir sonuç Giordano et al. (2010) tarafından *Folsomia candida*'da bulunmuş olup oksitetrasiklin grubu antibiyotiğin bu böceğin vücut büyüklüğü üzerine olumsuz etkisi bulunduğu gösterilmiştir. Metronidazol, olanquindoks ve tiamulin çeşitli antimikrobiyal maddelerden birkaçıdır. İvermektinin ise antihelmintik bir maddedir. Bu antimikrobiyal ve antihelmintik maddeler *Folsomia fimetaria*'nın üreme oranını azaltmıştır (Jensen et al. 2003). Rifampisin ile yapışan bir çalışmada *F. candida* Willem'nin yumurta sayısında değişiklik yapmazken yumurtaların açılma oranını azaltmıştır (Timmermans and Ellers 2008). Bazı antibiyotiklerin düşük miktarlarının bile *Folsomia fimetaria* L. ve *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta: Enchytraeidae)'nın erginlerinde yaşama oranına ve birey sayısı üzerine zararlı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Baguer et al. 2000).

Buna karşılık bazı çalışmalarda antibiyotiklerin düşük miktarlarının böcekler üzerinde olumlu etki yaptığıda gözlenmiştir. Örneğin, *Pimpla turionellae* larvaları yaşama oranını novobiyosini içeren çeşitli besinler ile beslendiğinde yaşama oranı artmıştır (Büyükgüzel 2001a).

Böceğin yaşama oranı ve gelişme süresi denenen bu antiprotozoal antibiyotiğin denenen en yüksek konsantrasyonu tarafından olumsuz etkilenmiştir. Ayrıca bu besinsel konsantrasyonda larvaların MDA ve protein karbonil miktarı ve GST aktivitesi önemli derecede yükselmiştir. Ornidazolun böceğin biyolojisi üzerindeki olumsuz etkisinin oksidatif stresten ileri gelebileceği düşünülebilir. *P. turionellae* erginlerinde organofosforlu insektisitlerin düşük dozlarında SOD aktivitesi ve ömür uzunluğu yükselmiştir (Büyükgüzel 2006). *S. exigua* erginleri üzerinde yapılan bir çalışmada, fenitrotiyonun etkisiyle SOD aktivitesi, yaşama oranı ve ömür uzunluğu artmıştır (Adamski et al. 2003). Aşırı oksidatif stres durumunda oluşan reaktif moleküllere karşı antioksidan enzimlerin aktiviteleri artar (Pigeolet et al. 1990). Ornidazolun yüksek konsantrasyonu serbest radikaller tarafından GST enziminin aktivitesini yükseltmiş olabilir. Yapılan bir çalışmada oksidatif stres sonucunda *Drosophila melanogaster*'de GST ve GPx aktivitelerindeki yükselişin böceğin bu strese karşı oluşturduğu bir direnç mekanizmasından kaynaklanabileceğini belirtilmiştir (Parkes et al. 1993, Sohal et al. 1995, Sun et al. 2002).

Böceklerde bazı antibiyotiklerin böceklerin dokularındaki biyokimyasal ve fizyolojik farklılıklara neden olduğu bilinmektedir (Eid et al. 1989, Büyükgüzel and İçen 2004, Büyükgüzel and Kalender 2008). Zehirli kimyasal maddelerle beslenen örümcek türü *Pardosa prativaga* (L. Koch)'da GST enziminin aktivitesini önemli derecede azaltmıştır (Nielsen and Toft 2002). Böceklerde kendi metabolizmaları esnasında ve yaşadıkları çevre ile toksik maddelerle temas etmeleri sonucunda serbest radikaller meydana gelir (Timmermann et al. 1999). Nükleik asitler ve proteinler, lipitlere göre serbest radikaller ile daha kolay reaksiyona girebildikleri için bu moleküllerdeki hasarlar toksik olan maddenin etkisi konusunda bilgi vermektedir. Besine ilave edilen ornidazol konsantrasyonlarının larvaların orta bağırsağındaki protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu seviyeleri ile GST aktivitesinin yükselttiği tespit edilerek önemli bir sonuç elde edilmiştir.

Reaktif atom ve moleküller paylaşılmamış elektronlarından dolayı serbest radikalleri meydana getirir. Serbest radikallerin hücre zarı ile etkileşmesi sonucunda, hücre zarının yapısında bulunan lipid ve proteinlerin hasara uğramasına bağlı olarak seri halde kimyasal reaksiyonlar meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucunda özellikle MDA ve protein karbonil ürünleri oluştuğu bilinmektedir. Bu ürünlerin miktarındaki artış lipid peroksidasyonunun ve protein oksidasyonunun önemli bir indikatörüdür (Mano et al. 1995, Halliwell 1994, Heinle and Betz 1994). *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında bazı antibiyotikler lipid hidroperoksit miktarını yükseltmektedir. Ayrıca bu antibiyotiklerin oksidatif strese neden olduğuna yönelik yayınlar bulunmaktadır (Büyükgüzel and Kalender 2007, 2009). GST, böceklerin toksik maddelerin etkisini azaltıcı veya yok edici direnç mekanizmaları geliştirmelerini sağlayan önemli bir enzimdir (Parkes et al. 1993, Yu 2004, Sivori et al. 1997, Clark et al. 1985, Singh et al. 2001). GST enzimi, biyotransformasyondan görevli detoksifikasyon enzimi olup yabancı maddeleri glutatyona (GSH; γ -glutamil-sisteinil-glisin) bağlayarak toksik etlilerini azalmasına ve daha polar moleküller haline dönüşmesini sağlamaktadır. Bunun yanı sıra GST hücre içi madde taşınması, prostaglandin gibi önemli biyosentez yollarında görevleri bulunmaktadır (Wilce and Parker 1994). *G. mellonella* ile yapılan bu tezde antibiyotiğin etkisiyle artan MDA ve protein karbonil miktarını azaltmak amacıyla GST aktivitesi artmış olabilir. Omurgalılarda da ROT ve diğer radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmada GST enziminin önemi bilinmekte olup yüksek oksidatif stres durumlarında bu enzimin aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Halliwell and Gutteridge 1999). Böceklerin larvaları toksik maddelerle beslendiğinde orta bağırsaklarında ROT'lar meydana gelmekte olup orta bağırsakta bulunan peritrofik zardaki protein ve lipidlerin oksidasyonuna bağlı oksidatif hasar

oluşmaktadır (Barbehenn and Stannard 2004, Barbehenn et al. 2005). Büyüküzel ve Kalender (2007, 2009) tarafından yapılan bir çalışmada penisilin ve streptomisin *G.mellonella*'nın orta bağırsak GST enziminin aktivitesi artmış olduğu tespit edilmiş ve bu yükselmenin besine ilave edilen antibiyotiklerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Buna benzer bir başka çalışmada da kalitesi düşük doğal besinlerle beslenen bir lepidopter tür *L. dispar*'ın orta bağırsağında antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir (Peric-Mataruga et al. 1997).

BÖLÜM 5

SONUÇ

Büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* larvalarını ergin evreye kadar laboratuvar ortamında yapay besin ile yetiştirmek için besinlere farklı konsantrasyonlarda ilave edilen bir nitroimidazol antibiyotik olan ornidazolun böceğin yaşama oranı, gelişme süresi, eşey oranı, ergin dişi ve erkek ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı ile son evre larvalarının orta bağırsağında MDA ve protein karbonil miktarlarına, detoksifikasyon enzimi GST aktivitesine etkisi araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre ornidazolun *G. mellonella*'nın son evre larvalarının orta bağırsağında oksidatif hasara sebep olarak antioksidan savunma sistemini bozması sonucu böceğin yaşama, gelişimi, ergin özellikleri üzerinde olumsuz etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Ornidazolun en yüksek konsantrasyonundaki oksidatif stres belirteçleri olan MDA ve protein karbonil miktarlarındaki artış ile buna paralel olarak GST enziminin aktivitesi artması böceğin yaşamını devam ettirebilmek için geliştirdiği bir savunma mekanizmasıdır. Bu oksidatif stres parametrelerindeki yükselme böceğin yaşama oranında azalma, gelişim süresinde uzama, yumurta veriminde ve açılma oranında düşmeye neden olmuştur. Bu sonuçlar ornidazolun böceğin biyolojisi üzerindeki olumsuz etkisinde oksidatif stresin önemli rol oynadığını açıkça göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada şu anda geleneksel olarak tarımsal alanlarda kullanılan insektisitlere alternatif bir kimyasal geliştirilmesi açısından da önemli sonuçlar elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adamski Z, Ziemnicki K, Fila K, Žikić R and Štajn A** (2003) Effects of Long-Term Exposure to Fenitrothion on *Spodoptera exigua* and *Tenebrio molitor* Larval Development and Antioxidant Enzyme Activity, *Biol Lett.*, 40: 43-52.
- Ahmad S** (1992) Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemistry Systems Ecology*, 20: 269-296.
- Ahmad S and Pardini R S** (1990) Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology & Medicine*, 8: 401-413.
- Ahmad S, Beilsen M A, Pardini R S**, (1989) Glutathione peroxidase activity in insects: A reassessment, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 12: 31-49.
- Ahmad S, Duval D L, Weinhold L C and Pardini R S** (1991) Cabbage looper antioxidant enzymes: Tissue Specificity. *Insect Biochemistry*, 21: 563-572.
- 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.
- Alonso-Alvarez C, Perez- Rodriguez L, Garcia J T, Vinuela J and Mateo R** (2010) Age and Breeding Effort as Sources of Individual Variability in Oxidative Stress Markers in a Bird Species. *Physiology Biochemistry Zoology*, 83 (1): 110-118.
- Alverson J and Cohen A C** (2002) Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*, 95: 256-260.
- Baguer A J, Jensen J and Krogh P H** (2000) Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere*, 40: 751-757.
- Ballard J W and Melvin R G** (2007) Tetracycline treatment influences mitochondrial metabolism and mtDNA density two generations after treatment in *Drosophila*. *Insect Molecular Biology*, 16: 799-802.
- Barata C, Baird D J, Soares A M V M and Guilhermino L** (2001) Biochemical Factors Contributing to Response Variation Among Resistant and Sensitive Clones of *Daphnia magna* Straus Exposed to Ethyl Parathion, *Ecotox. Environ. Safe.*, 49: 155-163.
- Barbehenn R V and Stannard J** (2004) Antioxidant defense of the midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars. *Journal of Insect Physiology*, 50: 783-790.
- Barbehenn R V, Cheek S, Gasperut A, Lister E and Maben R** (2005) Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midguts of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 969-988.
- Bhavan-Saravana P and Geraldine P** (2001) Biochemical Responses in Tissues of the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on Exposure to Endosulfan, *Pestic. Biochem. Phys.*, 2531: 1-15.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Bone W, Jones N G, Kamp G, Yeung C H and Cooper T G** (2000) Effect of ornidazole on fertility of male rats: inhibition of a glycolysis-related motility pattern and zona binding required for fertilization *in vitro*. *Journal of Reproduction & Fertility*, 118: 127-135.
- Bronskill J** (1961) A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *Journal of the Lepidopterists' Society*, 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*. *Journal of Economic Entomology*, 100: 1533-1541.
- Büyükgüzel E and Kalender Y** (2008) *Galleria mellonella* (L.) Survivorship, Development and Protein Content in Response to Dietary Antibiotics. *Journal of Entomological Science*, 43: 27-40.
- Büyükgüzel E and Kalender Y** (2009) Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*”, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 94: 112-118.
- Büyükgüzel K** (2001a) Positive effects of some gyrase inhibitors on survival and development of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology*, 94: 21-26.
- Büyükgüzel K** (2001b) DNA gyrase inhibitors: Novobiocin enhances the survival of *Pimpla turionellae* larvae reared on an artificial diet but other antibiotics do not. *Journal of Entomologia Experimentalis et Applicata*, 125: 583-587.
- Büyükgüzel K** (2002a) Effects of some antimicrobial agents on the total protein content of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Turkish Journal of Zoology*, 26: 101-109.
- Büyükgüzel K** (2002b) Antimicrobial Agents: Their Combined Effects on Total Protein Content of the Endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Tr. J. of Zoology*, 26, 229-237.
- Büyükgüzel K** (2006) Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: Effect on adult emergence, longevity, fecundity, oxidative and antioxidative response of the *Pimpla turionellae*”. *J. Econ Entomol.*, 99: 1225-1234.
- Büyükgüzel K and İcen E** (2004) Effects of gyrase inhibitors on the total protein content of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet. *Journal of Entomological Science*, 39 (1): 108-116.
- Büyükgüzel K ve Yazgan Ş** (1996) Bazı antibiyotiklerin endoparazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)' nın yaşama ve gelişimine etkileri. *Turkish Journal of Zoology*, 20: 1-7.
- 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*, 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. *Turkish Journal of Zoology*, 26: 111-119.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 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). *Journal of Economic Entomology*, 83: 356-360.
- Cervera A, Maymó A C, Martínez-Pardo R and Garcerá M D** (2003) Antioxidant Enzymes in *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae) Exposed to Cadmium, *Environ Entomol.*, 32: 705-710.
- Charriere J D and Imdorf A** (1997) Protection of honeycombs from moth damage. Swiss Bee Research Center Federal Dairy Research Station. *Communication*, 24: 1-14.
- 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 Biochemistry*, 15: 35-44.
- 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. *Journal of Economic Entomology*, 90: 333-339.
- Dokuzoğuz B, Baykam N, Eroğlu M ve Alpaut S** (1997) Amipli dizanteri tedavisinde seknidazol ve ornidazolun karşılaştırılması. *Klinik dergisi*, 2: 60-62.
- 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*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 41: 18-22.
- Dudziak B** (1975) Studies on the role of microorganisms in the alimentary tract of *Galleria mellonella* larvae. *Ann. Univ. Maria Curie- Sklodowska Vol. 30, No C*, pp. 15-22.
- 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.*, Vol.64, No 1, pp. 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 *Philosamia ricini* (Boisd). *Insect Science and Its Application*, 10: 139-143.
- Felton G Wand Summers C B** (1995) Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29: 187-197.
- Fenske R A, Kedan G, Lu C S, Fisker-Andersen J A and Curl C L** (2002) Assessment of Organophosphorous Pesticide Exposures in the Diets of Preschool Children in Washington State, *J. Exp. Anal. Env. Epid.*, 12: 21-28.
- Ferreiro G R, Badías L C, Lopez-Nigro M, Palermo A, Mudry M, González Elio P and Carballo M A** (2002) DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. *Toxicology Letters*, 132: 109-115.
- Giordano R, Weber E, Waite J, Bencivenga, Krogh P H and Soto-Adames F** (2010) Effect of a high dose of three antibiotics on the reproduction of a parthenogenetic strain of *Folsomia candida* (Isotomidae: Collembola). *Environmental Entomology*, 39 (4): 1170-1177.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Griffiths G W and Back S D** (1974) Effects of antibiotics on intracellular symbiotes in the Pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Cell and Tissue Research*, 148: 287-300.
- Habes D, Morakchi S, Aribi N, Farine J P and Soltani N** (2006) Boric Acid Toxicity to the German Cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in Midgut Structure, and Acetylcholinestrase and Glutathione S-Transferase Activity, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 84: 17-24.
- 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.
- Halliwell B** (1994) Free radicals, antioxidant, and human disease: curiosity. *Cause or Consequence Lancet*, 344: 721-724.
- Halliwell B and Gutteridge J M C** (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn. Oxford University Pres, New York, USA. 936 p.
- Haydak M H** (1936) A food for rearing laboratory insects. *J. Econ. Entomol.*, Vol. 29, No 5, pp. 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.
- He F S, Chen S Y, Tang X Y, Gan W Q, Tao B G and Wen B Y** (2002) Biological Monitoring of Combined Exposure to Organophosphates and Pyrethroids, *Toxicol. Lett.*, 134: 119-124.
- Heinle H and Betz E** (1994) Effects of dietary garlic supplementantation in rat model of atherosclerosis. *Arznei-for*, 44: 614-617.
- Hu J and McDougald L R** (2004) The efficacy of some drugs with known antiprotozoal activity against *Histomonas meleagridis* in chickens. *Veterinary Parasitology*, 121: 233-238.
- Ignoffo C M** (1963) A succesful method for mass rearing cabbage loopers on a semisynthetic diet. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, Vol. 56, pp. 178-182.
- Ivie G W, Bull D L, Beier R C, Pryor N W and Oertli E H** (1983) Metabolic detoxification: Mechanism of insect resistance to plant psoralens. *Science*, 221: 347-351.
- İçen E, Armutçu F, Büyükgüzel K and Gürel A** (2005) Biochemical stress indicators of greater wax moth *Galleria mellonella* L. exposure to organophosphorus insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 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 Radical Biology and Medicine*, 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. *Journal of Economic Entomology*, 82: 1478-1481.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 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.
- Krishnan N and Kodrik D** (2006) Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stres. *Journal of Insect Physiology*, 52 (1): 11-20.
- Krishnan N and Sehnal F** (2006) Compartmentalization of oxidative stress and antioxidant defense in the larval gut of *Spodoptera littoralis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 63: 1-10.
- Krishnan N, Kodrić D, Turanli F and Sehnal F** (2007) Stage- specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology*, 53: 67-74.
- Kurt Ö, Girginkardesler N, Balcioglu I C, Özbilgin A and Ok Ü Z** (2008) A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of dientamoebiasis. CMI, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14: 601-604.
- Laing D R and Hagen K S** (1970) A xenic, partially synthetic diet for the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Can. Entomol.*, Vol. 102, pp. 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.
- Liles J N** (1958) Some effects of dietary penicillin on the german cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Orthoptera: Blattidae). *Ohio Journal of Science*, 58: 84-96.
- 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.*, Vol. 89, No 1, pp. 119-123.
- Lowry O H, Rosebroug N I, Farr A L and Randall R J** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 19: 265.
- 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. *Journal of Endocrinology*, 145: 131-136.
- 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.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 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.
- Öztürk R** (1997) Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu. *Pratikte antibiyotik kullanımı sempozyumu: İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp fakültesi Sürekli Tıp eğitimi etkinlikleri*, İstanbul, s. 27-51.
- Parkes T L, Hilliker A J and Phillips J P** (1993) Genetic and biochemical analysis of Glutathione S-transferase in the oxygen defense system of *Drosophila melanogaster*. *Genome*, 36: 1007-1014.
- 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. *Journal of Insect Physiology*, 43: 101-106.
- Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary M D and Remacle J** (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of Ageing and Development*, 51: 283-297.
- Rajurkar R B, Khan Z H and Gujar G T** (2003) Studies on Levels of Glutathione-S-Transferase, Its Isolation and Purification From *Helicoverpa armigera*, *Current Science*, 85: 1355-1360,
- Schwartz D E, Jordan J-C, Vetter W and Oesterhelt G** (1979) Metabolic studies of ornidazole in the rat, in the dog and in man, *Xenobiotica*, 9: 571-581.
- 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.
- Singh P and House H L** (1970) Antimicrobials safe levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. *Journal of Insect Physiology*, 16: 1769-1782.
- Singh S P, Coronella J A, Benes H, Cochrane B J and Zimniak P** (2001) Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione s-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *European Journal of Biochemistry*, 268: 2912-2923.
- Siva A B, Yeung C-H, Cooper T G and Shivaji S** (2006) Antimicrobial drug ornidazole inhibits hamster sperm capacitation, in vitro, *Reproductive Toxicology*, 22: 702-709.
- 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.
- Snedecor G S and Cochran W G** (1989) *Statistical Method*. 8th, ed. I. A. Ames, Iowa State University Pres.
- Sohal R S, Sohal B H and Orr W C** (1995) Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Radical Biology & Medicine*, 19: 499-504.
- SPSS** (1997) User's manual, version 10. SPSS, Chicago, IL.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 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, *Annual Review of Entomology*, 35: 181-200.
- Timmermann S E, Zangerl A R and Berenbaum M R** (1999) Ascorbic and uric acid responses to xanthotoxin ingestion in a generalist and specialist caterpillar. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 42: 26-36.
- Timmermans M J T N and Ellers J** (2008) *Wolbachia* endosymbiont is essential for egg hatching in a parthenogenetic arthropod. *Evolutionary Ecology*, 23: 931-942.
- Vontas J G, Small G J and Hemingway J** (2001) Glutathione-s-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357: 65-72.
- Waterhouse D F** (1959). Axenic cultures of wax moths for digestion studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol. 77, pp. 283-289.
- Weirich G F, Collins A M and Williams V P** (2002) Antioxidant Enzymes in Thye Honey Bee, *Apis mellifera*, *Apidologie*, 33: 3-14.
- Wilce M C and Parker M W** (1994) Structure and function of glutathione s-transferases. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1205: 1-18.
- Yu S J** (2004) Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Peptide Biochemistry and Physiology*, 80: 113-122.

ÖZGEÇMİŞ

Ercan VURAN 1976'da Bursa Osmangazi İlçesi Bağlı Köyü'nde doğdu; İlkokulu Bağlı Köyü İlkokulunda, ortaokul ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. Bursa Çelebi Mehmet Lisesi'nden mezun olduktan sonra 1994 yılında Ankara Üniversitesi (AÜ) Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girdi, 2000 yılında mezun oldu. Farklı lise ve ilköğretim okullarında Biyoloji Öğretmenliği, Fen-Teknoloji Dersi Öğretmenliği yapmış ve idari görevlerde bulunmuştur. Halen bir ilköğretim okulunda Fen ve Teknoloji Dersi Öğretmenliği yapmaktadır. 2009 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi (BEÜ) Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına başladı.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres : Meşrutiyet Mah. Özmekan Sitesi
A8 Daire 3
Merkez / ZONGULDAK

Tel : (505) 705 49 99

E-posta : evuran@hotmail.com